



**HAL**  
open science

# Mode d'action de l'hepcidine, nouvelle hormone du métabolisme du fer, et son implication dans l'hémochromatose

Lydie Viatte

► **To cite this version:**

Lydie Viatte. Mode d'action de l'hepcidine, nouvelle hormone du métabolisme du fer, et son implication dans l'hémochromatose. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT: . tel-00365791

**HAL Id: tel-00365791**

**<https://theses.hal.science/tel-00365791>**

Submitted on 4 Mar 2009

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

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

UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT  
UFR BIOLOGIE ET SCIENCES DE LA NATURE

Thèse de doctorat de l'Université Paris 7  
*Ecole doctorale GC2ID*

Spécialité: Physiologie du développement et de la  
différenciation cellulaire

Présentée par  
**Lydie Viatte**

***Mode d'action de l'hepcidine, nouvelle hormone  
du métabolisme du fer, et son implication dans  
l'hémochromatose***

Thèse dirigée par le Dr Sophie Vaulont  
Soutenue le 27 février 2006

JURY

Pr Bernard Grandchamp  
Dr Jean-Claude Drapier  
Pr Olivier Hermine  
Dr Jean-Michel Camadro  
Pr Claude Férec  
Dr Marie-Paule Roth

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur



***à RJP***

*Je remercie Virginie Joulin qui, dans un moment difficile, a su s'occuper de moi et me retrouver un laboratoire d'accueil.*

*Je tiens à remercier Gaël Nicolas qui m'a transmis sa passion pour l'hepcidine.*

*Je suis redevable à Sophie Vaultont pour m'avoir accueillie, soutenue, secouée quand il le fallait, conseillée pendant ces quatre années, je la remercie pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir et pour sa confiance.*

*Je tiens à remercier Myriam qui m'a montré de si belles images pendant ces quatre ans et pour nos discussions autour d'un microscope. Je remercie Qing pour m'avoir accompagnée sur ce sujet pendant trois ans.*

*Je tiens à remercier à Benoît, toujours prêt à rendre service, pour sa sympathie et sa bonne humeur. Merci à Jeanne, ma voisine de bureau, qui nous a laissé de jolies souris avant de préparer l'arrivée d'un joli bout de chou à elle. Je remercie Marc, pour son calme et son aide technique, Fabrizio, pour ses « bonjour ! » chaleureux. Merci à toute l'équipe du 4008-4009, les anciens et les nouveaux, qui a fait que ces quatre ans sont passés si vite.*

*Je remercie tout le département GDPM pour la bonne humeur dans les couloirs qui donnait envie de venir tous les jours au labo.*

*Je remercie Axel Kahn pour sa relecture précieuse des articles et les discussions scientifiques.*

*Je tiens à remercier François Canonne-Hergaux pour m'avoir fait découvrir toute la complexité et la subtilité de l'immunodétection. Merci à Carole Beaumont, Bernard Grandchamp et à toute l'équipe de l'ex-unité 409, Constance, Nathalie, Ana, Laurent et tous les autres, d'avoir accepté l'invasion d'une Cochinoise à Bichat.*

*Je tiens à remercier Patrick Mayeux pour ses conseils, son enthousiasme et sa gentillesse.*

*Je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'examiner ma thèse.*

*Je remercie la Fondation Bettencourt-Schueller et ma marraine Ketty Schwartz de m'avoir permis de finir ma thèse dans de bonnes conditions*

*Merci à Gilles pour tout le reste.*

# Table des matières

<i>Liste des abréviations</i> .....	3
<i>Table des illustrations</i> .....	4
Crédits des figures.....	6
<b>Introduction</b> .....	7
<b>1) L'absorption, l'utilisation, le recyclage et le stockage du fer</b> .....	<b>9</b>
L'absorption intestinale de fer .....	9
L'utilisation du fer via le cycle Tf/RTf.....	11
Érythropoïèse et synthèse de l'hémoglobine.....	13
Le recyclage du fer : l'érythrophagocytose.....	20
Le stockage du fer.....	21
<b>2) Molécules impliquées dans le métabolisme du fer</b> .....	<b>25</b>
Protéines de liaison du fer : la transferrine (Tf), la lactoferrine et la lipocaline neutrophile .....	25
Les récepteurs de la transferrine : RTf1 et RTf2.....	27
Ferritine : la protéine de stockage .....	29
Les transporteurs membranaires de fer : DMT1, Nramp1, ferroportine.....	31
Les ferriréductases : Dcytb et Steap3.....	34
Les ferroxidases : la céruloplasmine et l'héphaestine .....	35
Transport de l'hème : l'haptoglobine, l'hémopexine, HCP1 et FLVCR.....	38
L'hème oxygénase (HO) : enzyme de dégradation de l'hème .....	40
Mégaline-cubiline .....	41
IRP (Iron Regulatory Protein) 1 et IRP2.....	41
HFE.....	42
Hémojuvéline (HJV, RGMc) .....	44
<b>3) L'hepcidine : découverte, structure et régulation</b> .....	<b>47</b>
Découverte de l'hepcidine .....	47
Du(des) gène(s) à la protéine hepcidine.....	50
Sites d'expression de l'hepcidine.....	53
Production et détection de l'hepcidine.....	53
Régulation de l'hepcidine .....	55
<b>4) Régulation du métabolisme du fer</b> .....	<b>61</b>
Système IRP/IRE .....	61
Régulation systémique : modèle de la crypte.....	63
<b>5) Hémochromatose héréditaire (HH)</b> .....	<b>65</b>
L'hémochromatose classique.....	65
L'hémochromatose juvénile.....	72

Gènes modificateurs de l'hémochromatose .....	76
<b>6) Hpcidine et désordres du métabolisme du fer .....</b>	<b>78</b>
Hpcidine et hémochromatose héréditaire .....	78
Hpcidine et autres surcharges en fer.....	79
Hpcidine et anémies .....	80
<b><i>Objectifs</i> .....</b>	<b>85</b>
<b><i>Résultats</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>Article 1 : Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis .....</b>	<b>86</b>
Introduction .....	86
Résultats.....	86
Discussion.....	89
<b>Article 2 : Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. ....</b>	<b>91</b>
Introduction .....	91
Résultats.....	91
Discussion.....	93
<b>Article 3 : Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice.....</b>	<b>97</b>
Introduction .....	97
Résultats.....	98
Discussion.....	102
<b>Résultats complémentaires : Caractérisation d'un modèle de souris invalidées pour le gène <i>Hepcl</i> .....</b>	<b>106</b>
Introduction .....	106
Résultats.....	106
Discussion.....	109
<b><i>Discussion</i> .....</b>	<b>111</b>
Régulation par le fer de l'hpcidine via HFE, RTF2 et HJV .....	111
Mode d'action de l'hpcidine .....	117
<b><i>Perspectives et Conclusion</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>124</b>
Régulation du métabolisme du fer .....	124
Hpcidine et thérapeutique .....	125
<b><i>Bibliographie</i> .....</b>	<b>126</b>
<b><i>Annexe : Liste des publications</i>.....</b>	<b>151</b>

## Liste des abréviations

<b>ALA</b> : $\delta$ -aminolevulinate	<b>KO</b> : knock-out
<b><math>\beta</math>2m</b> : $\beta$ 2-microglobuline	<b>LAP</b> : Liver Activator Protein
<b>BFU-E</b> : Burst Forming Unit-Erythroid	<b>LPI</b> : Labile Plasma Iron
<b>BMP</b> : Bone Morphogenetic Protein	<b>LPS</b> : Lipopolysaccharide
<b>C/EBP</b> : CCAAT/Enhancer-Binding Protein	<b>mk</b> : microcytic anemia, anémie microcytaire
<b>CFU-GEMM</b> : Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Megacaryocyte Macrophage	<b>MTP1</b> : Metal Transporter Protein 1 = ferroportine
<b>CFU-E</b> : Colony Forming Unit-Erythroid	<b>NGAL</b> : Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
<b>CMH</b> : Complexe Majeur d4Hitosompatibilité	<b>Nramp</b> : Natural resistance associated macrophage protein.
<b>CO</b> : monoxyde de carbone	<b>NTBI</b> : Non Transferrin Bound Iron, fer non lié à la transferrine
<b>CP</b> : céruloplasmine	<b>nTg</b> : non transgénique
<b>CSH</b> : Cellule Souche Hématopoïétique	<b>Pcm</b> : polycythémique
<b>Dcytb</b> : Duodenal cytochrome b reductase	<b>PHZ</b> : phénylhydrazine
<b>DMT1</b> : Divalent Metal Transporter 1	<b>RTf1</b> : récepteur transferrine 1
<b>EP</b> : érythrophagocytose	<b>RTf2</b> : récepteur transferrine 2
<b>GM-CSF</b> : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor	<b>RTfs</b> : récepteur transferrine soluble ou sérique
<b>GR</b> : Globule Rouge	<b>SCF</b> : Stem Cell Factor
<b>HAMP</b> : Hepcidin AntiMicrobial Peptide	<b>siRNA</b> : small interfering RNA, petits ARN interférents
<b>HH</b> : Hémochromatose Hériditaire	<b>sla</b> : sex linked anemia
<b>HIF</b> : Hypoxia Inducible Factor	<b>SMAD</b> : Homo sapiens mothers against decapentaplegic homolog
<b>HJV</b> : hémojuvéline	<b>STEAP</b> : Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
<b>HNF4</b> : Hepatocyte Nuclear Factor 4	<b>Tf</b> : transferrine
<b>HO</b> : Hème-Oxygénase	<b>Tg</b> : transgénique
<b>Hp</b> : Haptoglobine	<b>TGF-<math>\beta</math></b> : Transforming Growth Factor $\beta$
<b>Hpx</b> : hypotransferrinémique	<b>TIMP</b> : Tissue Inhibitor of MetalloProteinases
<b>HRE</b> : Hypoxia Responsive Element	<b>TNF</b> : Tumour Necrosis Factor
<b>IAP</b> : Intracisternal A Particle	<b>TTR</b> : transthyréline
<b>IFN</b> : interféron	<b>USF</b> : Upstream Stimulatory Factor
<b>IL</b> : interleukine	<b>UTR</b> : Untranslated Region, région non traduite
<b>IRE</b> : Iron Regulated Element	<b>VHL</b> : Von Hippel-Lindau
<b>IREG1</b> : Iron Regulated Protein 1 = ferroportine	
<b>IRP</b> : Iron Regulatory Protein	
<b>kDa</b> : kilo Dalton	
<b>KI</b> : knock-in	

## **Table des illustrations**

<i>Figure 1.</i>	<i>L'absorption intestinale du fer</i> .....	9
<i>Figure 2.</i>	<i>Endocytose du fer lié à la Tf par RTf</i> .....	12
<i>Figure 3.</i>	<i>Érythropoïèse</i> .....	14
<i>Figure 4.</i>	<i>Régulation endocrine de l'érythropoïèse par l'EPO</i> .....	15
<i>Figure 5.</i>	<i>Structure de l'hémoglobine humaine adulte (<math>\alpha_2\beta_2</math>)</i> .....	16
<i>Figure 6.</i>	<i>Synthèse des chaînes de globine</i> .....	17
<i>Figure 7.</i>	<i>Biosynthèse de l'hème</i> .....	19
<i>Figure 8.</i>	<i>Érythrophagocytose et recyclage du fer</i> .....	20
<i>Figure 9.</i>	<i>Structure du foie</i> .....	22
<i>Figure 10.</i>	<i>Entrée et sortie du fer de l'hépatocyte</i> .....	24
<i>Figure 11.</i>	<i>Structure et produits de clivage de RTf1</i> .....	27
<i>Figure 12.</i>	<i>Proportion des sous-unités lourdes (H) et légères (L) composant la ferritine dans différents tissus</i> .....	29
<i>Figure 13.</i>	<i>Expression des différentes isoformes de DMT1 dans les tissus</i> .....	32
<i>Figure 14.</i>	<i>Structure de l'ADNc humain CP et mutations conduisant à l'acéruplasminémie</i> .....	36
<i>Figure 15.</i>	<i>Schéma du rôle potentiel de la Cp dans l'absorption intestinale après phlébotomie</i> .....	37
<i>Figure 16.</i>	<i>Représentation schématique de la structure moléculaire de l'héphaestine murine</i> .....	37
<i>Figure 17.</i>	<i>Diagramme en ruban représentant le complexe HFE-<math>\beta</math>2m-RTf1-Tf</i> .....	43
<i>Figure 18.</i>	<i>Phénotype des souris <i>Usf2</i><sup>-/-</sup></i> .....	48
<i>Figure 19.</i>	<i>Phénotype des souris <i>TTR-Hepc1</i></i> .....	49
<i>Figure 20.</i>	<i>Internalisation et dégradation de la ferroportine-GFP par l'hepcidine</i> .....	50
<i>Figure 21.</i>	<i>Structure tridimensionnelle et séquence de la protéine hepcidine humaine</i> ....	51
<i>Figure 22.</i>	<i>Séquence de l'hepcidine mature de différentes espèces</i> .....	52
<i>Figure 23.</i>	<i>Expression des gènes hepcidine chez la souris au cours du développement hépatique</i> .....	55
<i>Figure 24.</i>	<i>Régulation de l'hepcidine en culture cellulaire par l'ajout de sérum</i> .....	58
<i>Figure 25.</i>	<i>Exemples de tiges-boucles IRE</i> .....	61
<i>Figure 26.</i>	<i>Système de régulation IRP/IRE</i> .....	62
<i>Figure 27.</i>	<i>Modèle de la crypte</i> .....	63
<i>Figure 28.</i>	<i>Mutations et variants de la séquence codant pour HFE représentés sur la protéine HFE</i> .....	66
<i>Figure 29.</i>	<i>Mutation dans le gène <i>TFR2</i> codant pour le récepteur transferrine 2</i> .....	68
<i>Figure 30.</i>	<i>Mutations dans le gène <i>SLC40A1</i> codant pour la ferroportine</i> .....	70

Figure 31.	Mutations du gène codant pour l'hémojuvéline (HJV) .....	73
Figure 32.	Structure du gène codant pour l'hémojuvéline (HJV) .....	74
Figure 33.	Mutations du gène humain de l'hepcidine (HAMP).....	75
Figure 34.	Schéma de régulation du métabolisme du fer via HFE, RTf2, HJV et l'hepcidine .....	79
Figure 35.	Schéma de l'interaction du métabolisme du fer et de l'inflammation.....	82
Figure 36.	Interrelation du fer et de l'hepcidine dans l'étiologie des hémochromatoses et de l'anémie chronique inflammatoire .....	84
Figure 37.	Croisement entre souris TTR-Hepc1 (Tg) et souris KO Hfe .....	88
Figure 38.	Dosage de fer hépatique à 3 semaines des souris Tg Hfe-/- .....	89
Figure 39.	Niveaux protéiques de la ferroportine et de la céruloplasmine dans le foie de souris sous régime riche en fer .....	92
Figure 40.	Localisation des sites putatifs de N-glycosylation et de phosphorylation de la ferroportine .....	95
Figure 41.	Croisement pour obtenir des souris « inductibles hepcidine » .....	98
Figure 42.	Croisement pour obtenir des souris « inductibles Hfe-/- » .....	100
Figure 43.	Fer sérique, fer hépatique et valeurs hématologiques des souris inductibles Hfe-/- traitées trois semaines à la doxycycline .....	101
Figure 44.	Création de la souris knock-out Hepc1 : survie et poids .....	107
Figure 45.	Évolution du phénotype des souris KO Hepc1 avec l'âge .....	108
Figure 46.	Surcharge tissulaire en fer, visualisée par la méthode de Perls.....	109
Figure 47.	Modèle de régulation de l'hepcidine par HFE, RTf2, RTf1 et la Tf au niveau de l'hépatocyte .....	112
Figure 48.	Modèle de régulation de l'hepcidine par HJV au niveau de l'hépatocyte .....	114
Figure 49.	Modèle de régulation via l'hepcidine et la ferroportine .....	118
Figure 50.	Génération de transcrits sans IRE de la ferroportine.....	119
Figure 51.	Résumé des effets de mutations de l'hepcidine sur la fonction de l'hepcidine in vitro et in vivo .....	122
Figure 52.	Régulation systémique du fer : modèle de la crypte et modèle de régulation par l'hepcidine .....	124
Tableau 1.	Exemples de teneur d'aliments riches en fer.....	10
Tableau 2.	Exemples de protéines de mammifères contenant du fer .....	11
Tableau 3.	Les différentes formes d'haptoglobine en fonction du génotype chez l'homme.....	38
Tableau 4.	Principaux ligands de la cubiline et de la mégaline. ....	41
Tableau 5.	Modèles murins et maladies humaines liés à des mutations dans les gènes impliqués dans le métabolisme du fer. ....	46
Tableau 6.	Variations des paramètres sériques lors de l'anémie chronique inflammatoire et l'anémie ferriprive.....	81

## Crédits des figures

- Figure 2** D'après Andrews NC, *NEJM*, 1999.
- Figure 3** A. D'après Testa U, *Leukemia*, 2004. B. D'après Constantinescu SN *et al.*, *TEM*, 1999.
- Figure 4** D'après Zermati Y *et al.*, *Actualités Néphrologiques*, 2003.
- Figure 5** D'après [http://www.people.virginia.edu/~dp5m/phys\\_304/figures/hemoglobin.jpg](http://www.people.virginia.edu/~dp5m/phys_304/figures/hemoglobin.jpg) (consulté le 07/12/2005).
- Figure 6** A. D'après Steensma DP, *Blood*, 2005. B. D'après <http://www.blc.arizona.edu/courses/181summer/14.html> (consulté le 07/12/05).
- Figure 7** D'après Ryter SW & Tyrrell RM, *Free Radical Biology & Medicine*, 2000.
- Figure 8** D'après Pietrangelo A, *NEJM*, 2004.
- Figure 9** D'après Tortora GJ *et al.*, *Principes d'anatomie et de physiologie*, 1994.
- Figure 11** A. D'après Aisen P, *IJBCB*, 2004. B. D'après Kaup M *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2002.
- Figure 12** D'après Harrison PM & Arosio P, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996.
- Figure 13** D'après Hubert N & Hentze MW, *PNAS*, 2002.
- Figure 14** D'après Hellman NE & Gitlin JD, *Annu Rev Nutr*, 2002.
- Figure 15** D'après Cherukuri S *et al.*, *Cell Metabolism*, 2005.
- Figure 16** D'après Kuo YM *et al.*, *Gut*, 2004.
- Figure 17** D'après Cheng Y *et al.*, *Cell*, 2004.
- Figure 18** D'après Nicolas G *et al.*, *PNAS*, 2001.
- Figure 19** D'après Nicolas G *et al.*, *PNAS*, 2002.
- Figure 20** D'après Nemeth E *et al.*, *Science*, 2004.
- Figure 21** A. D'après Ganz T, *Blood*, 2003. B. D'après Beaumont C *et al.*, *Hématologie*, 2003.
- Figure 22** D'après Shi J & Camus AC, *Developmental & Comparative Immunology*, 2005.
- Figure 23** D'après Nicolas G *et al.*, *PNAS*, 2002.
- Figure 24** D'après Pigeon C. *et al.*, *JBC*, 2001.
- Figure 25** D'après Ke Y. *et al.*, *JBC*, 1998.
- Figure 26** D'après Hentze MW *et al.*, *Cell*, 2004.
- Figure 28** D'après Robson KJH *et al.*, *J Med Genet*, 2004.
- Figure 29** D'après Roetto A *et al.*, *BPRCH*, 2005.
- Figure 30** D'après Devalia V *et al.*, *Blood*, 2002.
- Figure 32** D'après Roetto A *et al.*, *BPRCH*, 2005.
- Figure 34** D'après Vaulont S *et al.*, *JCI*, 2005.
- Figure 35** D'après Weiss G, *NEJM*, 2005.
- Figure 36** D'après Papanikolaou G *et al.*, *Nat Genet*, 2004.
- Figure 40** D'après McKie AT & Barlow DJ, *Pflugers Arch*, 2004.
- Figure 47** D'après Frazer DM & Anderson GJ, *Blood Cells Mol Dis*, 2003.
- Figure 50** D'après Mok H *et al.*, *Development and disease*, 2004.
- Figure 51** D'après Nemeth E *et al.*, *Blood*, 2006.
- Figure 52** D'après Pietrangelo A, *NEJM*, 2004.
- Tableau 4** D'après Verroust PJ & Kozyraki R, *Médecine/Sciences*, 2003
- Tableau 6** D'après Weiss G, *NEJM*, 2005



## Introduction\*

«On a beau avoir une santé de fer, on finit toujours par rouiller.» [Jacques Prévert]



Mars est le dieu de la guerre et du fer car ce métal, résistant et robuste, était utilisé pour les armes et armures. Ainsi, pour ce qui contient du fer, on utilise l'adjectif « martial », on parlera donc d'une surcharge martiale lorsque le fer s'accumule dans l'organisme.

Le fer constitue le cœur de notre planète Terre. Au niveau de l'organisme, cet élément est essentiel au fonctionnement de nombreuses enzymes qui utilisent sa capacité à se lier au soufre. Il permet également de fixer l'oxygène sur l'hémoglobine des globules rouges. Il est donc au centre du fonctionnement de notre organisme.

Le fer est présent sous deux formes : le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), insoluble, et le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), soluble. Cette dernière forme est très réactive, elle peut s'avérer agressive, comme le dieu qui représente le fer, et entraîne la formation de radicaux libres par la réaction de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ). C'est pourquoi, dans l'organisme, en situation physiologique, le fer libre  $\text{Fe}^{2+}$  est rare. On le retrouve le plus souvent oxydé et lié à des protéines : dans la circulation, lié à la transferrine et dans la cellule, lié à la ferritine.

En l'absence de réelle voie d'excrétion du fer (les pertes de fer se font par la desquamation et les saignements), l'organisme doit réguler finement son entrée de fer afin de compenser juste la perte de fer quotidienne, soit 2 mg sur les 20 mg disponibles dans une alimentation normale. Pendant 40 ans, ce mécanisme de régulation du métabolisme du fer est resté inconnu. De même, les protéines permettant l'entrée du fer au niveau du duodénum ne sont connues que depuis peu.

Le laboratoire dans lequel j'ai commencé ma thèse venait de mettre en évidence que l'hepcidine, un peptide isolé sur la base de ses propriétés antimicrobiennes, jouait un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du fer et représentait probablement le régulateur recherché depuis plusieurs années. J'ai donc voulu, au cours de ma thèse, connaître les mécanismes d'action de cette nouvelle hormone du métabolisme du fer. Je me suis plus particulièrement intéressée au rôle que pouvait jouer l'hepcidine dans la cause la plus fréquente de surcharge

---

\* Illustration : Mars, Dieu de la guerre. Diego Rodriguez de Silva y Velázquez. Huile sur toile. 1640. 179 x 95 cm. Museo del Prado, Madrid.

en fer innée chez l'homme : l'hémochromatose héréditaire liée à HFE. Pour cela, j'ai utilisé les modèles murins transgéniques développés par le laboratoire et créé de nouveaux modèles adaptés aux nouvelles questions qui se posaient.

Après l'exposition du voyage du fer à travers l'organisme, je vous détaillerai les données existantes sur les protéines impliquées dans ce métabolisme. Nous verrons ensuite comment se maintient l'homéostasie du fer et les désordres métaboliques observés quand ces mécanismes sont perturbés.

# 1) L'absorption, l'utilisation, le recyclage et le stockage du fer

## L'absorption intestinale de fer

Le fer alimentaire est absorbé au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle, le duodénum. Le duodénum est constitué de villosités et de cryptes. Les cellules de la villosité, les entérocytes, sont responsables de l'absorption intestinale du fer. Elles sont issues de la différenciation de cellules souches situées au niveau de la crypte et acquièrent leurs propriétés absorbantes au cours de leur migration le long de la villosité. Les entérocytes sénescents sont exfoliés dans la lumière intestinale (Figure 1). On estime que l'épithélium intestinal se renouvelle ainsi en 3 à 5 jours.

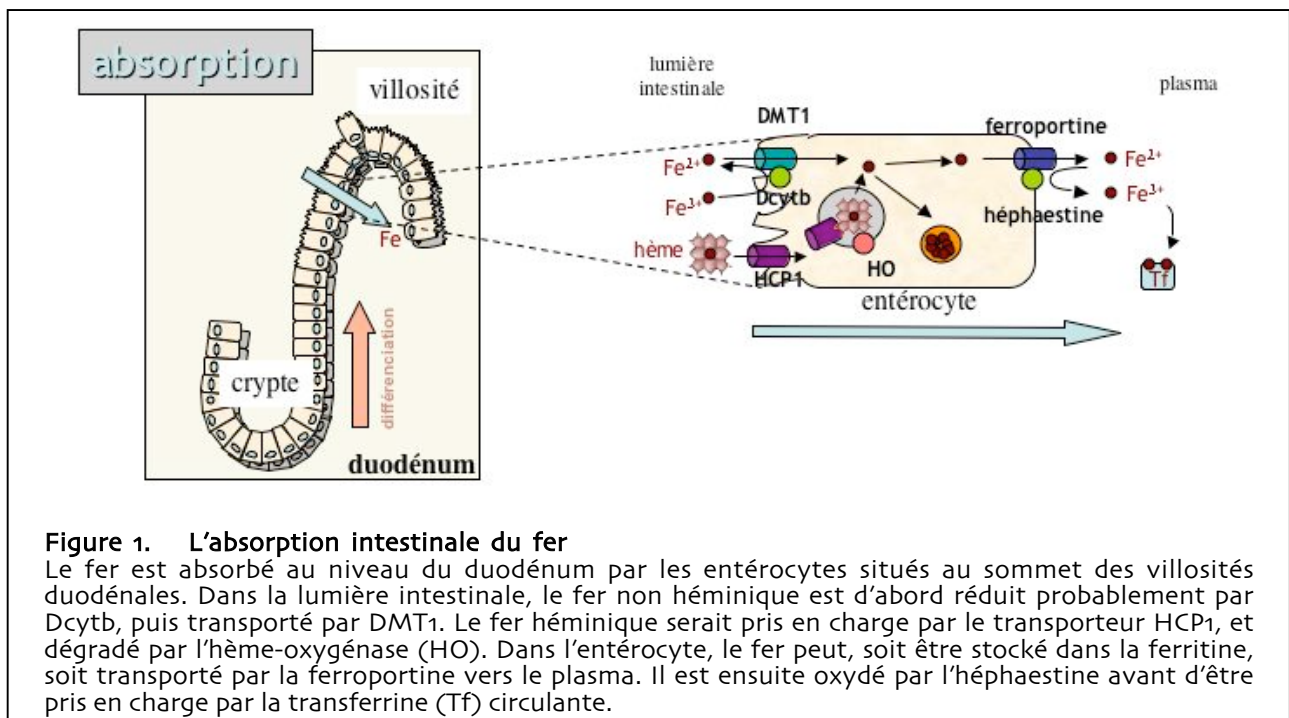


Figure 1. L'absorption intestinale du fer

Le fer est absorbé au niveau du duodénum par les entérocytes situés au sommet des villosités duodénales. Dans la lumière intestinale, le fer non hémique est d'abord réduit probablement par Dcytb, puis transporté par DMT1. Le fer hémique serait pris en charge par le transporteur HCP1, et dégradé par l'hème-oxygénase (HO). Dans l'entérocyte, le fer peut, soit être stocké dans la ferritine, soit transporté par la ferroportine vers le plasma. Il est ensuite oxydé par l'héphaestine avant d'être pris en charge par la transferrine (Tf) circulante.

Le contenu en fer des aliments est très variable (Tableau 1). Dans les pays développés, le régime alimentaire contient en moyenne 10 à 20 mg de fer par jour. Sur ces 10 à 20 mg seuls 10% seront ensuite absorbés au niveau du duodénum. Cette faible proportion est due d'une part à une régulation de l'absorption en fonction des besoins (voir plus loin) et d'autre part à la biodisponibilité du fer qui est très variable suivant les aliments.

Le fer présent dans l'alimentation est soit lié à l'hème<sup>1</sup> (forme hémique), facilement assimilable (15 à 35% sont absorbés), soit sous forme non hémique, essentiellement dans les végétaux, plus difficile à absorber (2 à 20 % absorbés). Le régime normal chez l'homme est constitué majoritairement de fer non hémique, le fer hémique provenant surtout de la myoglobine et de l'hémoglobine trouvées dans les viandes. Dans les deux cas, le fer est oxydé ( $Fe^{3+}$ ). L'absorption du fer non hémique peut-être facilitée par la présence dans le bol

<sup>1</sup> J'utilise le terme d'hème pour désigner à la fois la forme réduite  $Fe^{2+}$ -protoporphyrine IX et la forme oxydée  $Fe^{3+}$ -protoporphyrine IX (hémine).

alimentaire d'acide ascorbique ou inhibée par les tannins (dans le thé, le café, le vin) ou l'acide phytique (dans les légumes, le riz).

Aliment	Contenu en mg de fer/100 g
Foie de porc	19
Levure de bière sèche	17,3
Cacao	12,5
Caviar	11,8
Foie de mouton	10,9
Lentilles	8,6
Soja	8,4
Jaune d'oeuf	7,2
Persil	6,2
Haricots blancs	6,1
Moules	5,8
Abricots secs	5,5
Huîtres	5,5
Amandes, noisettes	4,5
Sardines	3,5
Noix	3,1
Épinards	3,1
Côte de boeuf	3,1
Jambon	2,5
Vin	0,3 à 0,5
Lait de vache	0,04

Tableau 1. Exemples de teneur d'aliments riches en fer

Le fer non héminique est dans un premier temps réduit par la réductase Dcytb (Duodenal cytochrome b)<sup>2</sup> puis transporté à travers la membrane apicale de l'entérocyte par le transporteur transmembranaire DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) (Figure 1). L'implication de Dcytb dans l'absorption intestinale de fer a récemment été remise en cause par la création de souris knock-out (KO) Dcytb qui ne présentent pas de déficience en fer[140] (voir Tableau 5). Les réserves en fer non altérées chez ces souris pourraient s'expliquer soit par une compensation de l'activité réductase par la production endogène d'ascorbate (cette production est spécifique de la souris, on ne la retrouve pas chez l'homme), soit par la présence de molécules antioxydantes dans le régime alimentaire des souris, soit enfin par la présence d'une autre réductase qui reste à identifier.

L'absorption du fer héminique se fait probablement via un récepteur spécifique situé à la membrane apicale de l'entérocyte, HCP1 (Heme Carrier Protein 1), qui a été identifié très récemment par une équipe anglaise[341]. L'hème fixé à son récepteur serait transloqué à l'intérieur de la cellule puis dégradé par l'enzyme hème-oxygénase (HO). Le fer ainsi libéré rejoindrait le pool de fer internalisé via DMT1 (Figure 1).

Une fois dans la cellule, le fer peut être stocké dans la ferritine ou transporté de nouveau au pôle basolatéral vers la circulation sanguine par le transporteur transmembranaire

<sup>2</sup>Pour plus d'informations sur chaque molécule citée, veuillez vous référer au chapitre « Molécules impliquées dans le métabolisme du fer »

ferroportine. Dans le sang, la transferrine (Tf) qui peut lier deux atomes de fer permet de véhiculer le fer dans tout l'organisme. Pour cela, le fer doit être préalablement oxydé par la ferroxidase héphaestine située sur la membrane basolatérale de l'entérocyte (Figure 1, pour revue sur l'absorption intestinale de fer, voir[241, 260]).

Des souris déficientes pour les protéines impliquées dans ce transport basolatéral du fer du duodénum (souris *sla*, pour sex linked anemia, mutées pour l'héphaestine[373], souris KO spécifique dans le duodénum de la ferroportine[74]) présentent toutes une anémie. En effet, comme nous le verrons, la moelle osseuse qui produit les globules rouges est le premier organe affecté par une déficience en fer. Dans ces souris, l'anémie est accompagnée d'une surcharge en fer entérocytaire qui confirme leur implication dans l'export du fer de l'entérocyte (voir aussi Tableau 5)

### L'utilisation du fer via le cycle Tf/RTf

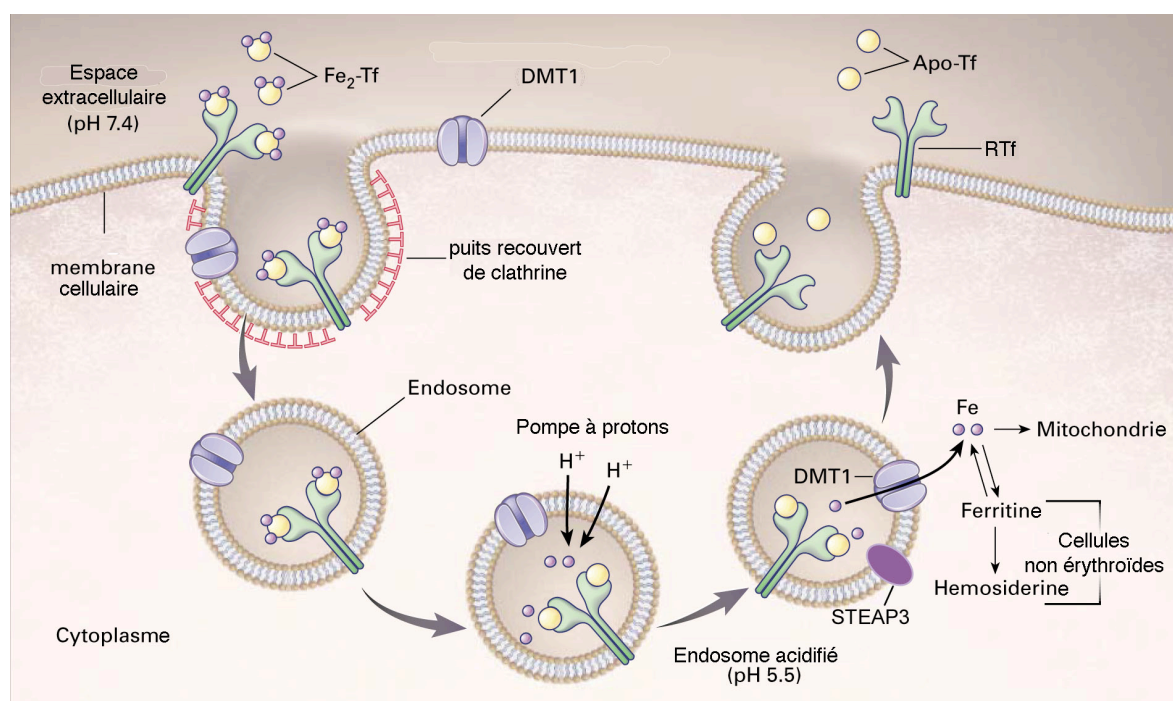
Le fer lié à la transferrine (holotransferrine, holoTf ou Tf-Fe<sub>2</sub>) est capté par les cellules via le récepteur à la transferrine 1 (RTf1). Les cellules utilisent ce fer pour synthétiser de nombreuses protéines contenant un ou plusieurs atomes de fer. Ces protéines sont impliquées dans divers mécanismes cellulaires, mais les propriétés liées au cycle d'oxydoréduction du fer en font un métal de choix pour permettre le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, la catalyse, le transport et le stockage de l'oxygène ou bien le transport du NO (Tableau 2).

	Protéines à hème	Protéines Fe-S	Autres protéines contenant du Fe
Fonctions	<b>Catalyse</b> catalases, protéine hème-thiolate, peroxydases <b>Transfert d'électrons</b> cytochromes <b>Transport et stockage d'O<sub>2</sub></b> globines <b>Transport de NO</b> nitrophorine	<b>Catalyse</b> oxydoréductases, aconitases <b>Transfert d'électrons</b> ferredoxines, protéine Rieske	<b>Transport et stockage du fer</b> ferritines, transferrines <b>Catalyse</b> oxygénases
Types de centre fer	<b>Hème a</b> Ex : cytochrome c oxydase <b>Hème b</b> Ex : globines, nitrophorine, cytochromes b <b>Hème c</b> Ex : cytochromes c <b>Hème d</b> Ex : catalases, cytochromes d <b>Hème d1</b> Ex : cytochrome cd1 nitrite réductase <b>Hème o</b> Ex : cytochrome o oxydase <b>Hème P460</b> Ex : hydroxylamine oxydoréductase	<b>[2Fe-2S]</b> Ex : ferrochélatase, adrenodoxine, protéine Rieske <b>[4Fe-4S]</b> Ex : endonucléase III, aconitases	

**Tableau 2. Exemples de protéines de mammifères contenant du fer**  
 Pour les protéines Fe-S, voir la revue[172].

Le complexe Tf/RTf1[45] pénètre dans la cellule par endocytose, le fer est libéré du complexe dans l'endosome tardif à la faveur d'un pH acide, puis est transféré de l'endosome

vers le cytosol probablement grâce au transporteur DMT1[97] (Figure 2). Très récemment, par l'étude de souris anémiques *nm1504*, a été identifiée une ferriréductase endosomale qui serait responsable de la réduction du fer lié à la Tf avant le transport transmembranaire de ce fer par DMT1 dans les précurseurs érythroïdes : STEAP3 (pour Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate)[291]. La Tf libérée de son fer, l'apo-transferrine (apoTf), et son récepteur sont ensuite tous deux recyclés à la surface cellulaire (Figure 2 et pour revue[151]). Le recyclage est un phénomène complexe faisant intervenir un grand nombre de molécules. L'une d'entre elles vient d'être clairement identifiée grâce au clonage positionnel du gène responsable du phénotype de souris mutantes dites déficientes en hémoglobine, les souris *hbd*. Le gène en question code pour une protéine impliquée dans l'exocytose des vésicules, Sec151[228]. Sa mutation chez la souris entraîne un phénotype particulier de déficit relatif en fer dans le proérythroblaste sans déficit en fer systémique[393]. Le rôle exact joué par la protéine mutante Sec151 dans l'acquisition de ce phénotype reste à déterminer[228, 392].



**Figure 2. Endocytose du fer lié à la Tf par RTf**

L'holotransferrine ( $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ ) est reconnue par le récepteur de la transferrine (RTf) (en vert) à la surface de la cellule. Le complexe RTf- $\text{Fe}_2\text{-Tf}$  subit une endocytose dans une vésicule recouverte de clathrine. Dans l'endosome, à la faveur d'un pH acide, le fer se dissocie de la transferrine. Le fer serait réduit ensuite par une ferriréductase, probablement STEAP3 dans les précurseurs érythroïdes, puis transportée vers le cytosol par DMT1. Le récepteur et l'apo-transferrine (Apo-Tf) sont finalement recyclés par fusion de la vésicule à la membrane plasmique de la surface cellulaire.

L'interaction de la Tf avec son récepteur est utilisée dans un grand nombre de cellules (en particulier les cellules tumorales qui prolifèrent beaucoup). Elle ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes et est maintenant utilisée pour la délivrance de drogues/médicaments à l'intérieur des cellules[227]. Par exemple, le gallium  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  émet un rayonnement gamma qui lui confère des propriétés anti-tumorales et ce métal est capable de se lier à la Tf qui le transporte jusqu'aux cellules cibles.



D'autres formes d'acquisition du fer par les cellules ont été décrites :

- acquisition du fer non lié à la Tf (Non Transferrin Bound Iron, NTBI)[17, 166]
- acquisition de l'holoTf par une voie indépendante de RTf1[354]
- acquisition de la ferritine médiée par un récepteur[119]
- enfin, la découverte de la capacité de la molécule NGAL à transporter du fer pourrait également être une nouvelle forme d'acquisition du fer, essentiellement en situation d'inflammation[402].

### **Érythropoïèse et synthèse de l'hémoglobine**

L'organe consommant la plus grande quantité de fer (80% du fer transporté par la Tf) est la moelle osseuse où se déroule l'érythropoïèse. Elle a ainsi besoin de 20 mg de fer par jour pour pouvoir produire les 200 milliards de nouveaux globules rouges nécessaires au transport et au stockage de l'oxygène.

#### ◆ Érythropoïèse

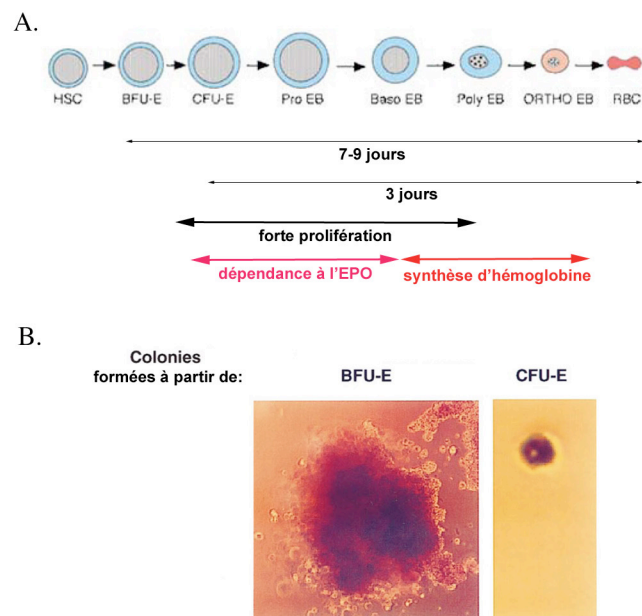
À partir des quelques cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse sont formés plusieurs lignages cellulaires en fonction des signaux et facteurs de croissance reçus par les CSH (conduisant à la formation de lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, polynucléaires, plaquettes, globules rouges). Je ne parlerai ici que de la différenciation érythroïde, l'érythropoïèse, qui est la plus grande consommatrice de fer pour son incorporation dans l'hémoglobine.

On peut définir trois stades d'érythropoïèse au cours du développement :

- l'érythropoïèse primitive qui a lieu dans les îlots sanguins du sac vitellin (au 7<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire chez la souris). Cette érythropoïèse est indépendante d'un signal érythropoïétine (EPO) et conduit à la formation de larges érythroblastes possédant un noyau, appelés mégaloïdocytes ;
- l'érythropoïèse définitive est marquée par une forte prolifération des progéniteurs érythroïdes dans le foie fœtal (10<sup>ème</sup> jour de gestation chez la souris) ;
- l'érythropoïèse adulte qui se caractérise par la migration des CSH du foie fœtal vers la moelle osseuse.

Les CSH s'engagent dans une voie de différenciation myéloïde pour former un progéniteur multipotent appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Megacaryocyte Macrophage). L'engagement de ce progéniteur multipotent dans la voie érythroïde dépend d'une combinaison de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1. Les CFU-GEMM se différencient alors en progéniteurs restreints érythroïdes précoces (BFU-E pour Burst Forming Unit-Erythroid, nommés ainsi pour leur capacité à générer de larges colonies érythroïdes in vitro, voir [Figure 3B](#)) puis en progéniteurs érythroïdes tardifs (CFU-E pour Colony Forming Unit-Erythroid, nommés ainsi pour leur capacité à générer de petites colonies érythroïdes in vitro, voir [Figure 3B](#)). Les progéniteurs érythroïdes subissent ensuite une forte prolifération associée à la différenciation en

érythroblastes jusqu'au stade érythroblaste polychromatophile. La maturation des érythroblastes polychromatophiles vers le stade réticulocyte n'est pas accompagnée d'une forte prolifération. La phase finale de maturation consiste à expulser le noyau et dégrader les organelles intracellulaires. Au cours de la maturation, les précurseurs érythroïdes voient leur taille diminuer, leur contenu en hémoglobine augmenter et leur chromatine se densifier. La diminution de la taille se poursuit lors de la sénescence des globules rouges (GR appelés aussi hématies ou érythrocytes) (Figure 3A). Ainsi, un GR jeune, un réticulocyte, a une taille plus grande qu'un GR sénéscent, ce qui se manifeste par une augmentation de la taille globulaire moyenne (MCV pour Mean Cellular Volume) lorsque l'érythropoïèse est accrue (pour revue, voir[352]). À l'inverse, en cas d'érythropoïèse inefficace, la taille des GR est plus petite car peu de réticulocytes sont formés, on parle d'anémie microcytaire. La forme d'un réticulocyte puis d'un érythrocyte normal est celle d'un disque biconcave, ils ont peu d'organelles internes et sont essentiellement composés d'hémoglobine.



**Figure 3. Érythropoïèse**

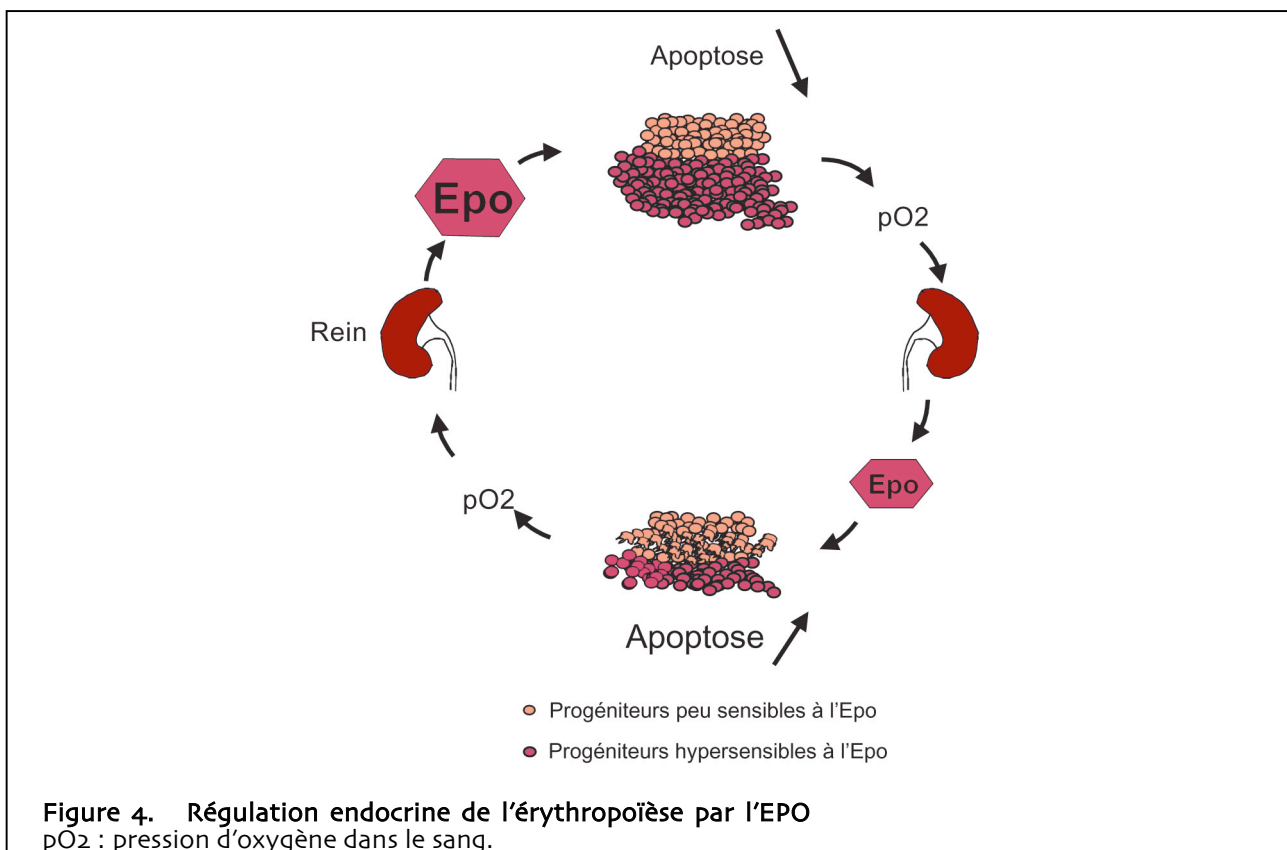
A. Les stades de l'érythropoïèse sont figurés par des cellules uniques avec leur morphologie présumée. HSC : Cellule souche hématopoïétique ; BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroid ; CFU-E : Colony Forming Unit-Erythroid ; Pro EB : Pro-érythroblaste ; Baso EB : érythroblaste basophile ; Poly EB : érythroblaste polychromatophile ; ORTHO EB : érythroblaste orthochromatophile ; RBC : Red Blood Cell, érythrocyte ou globule rouge.

B. Photos des colonies formées à partir de progéniteurs BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) ou CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) en culture semi-solide.

L'érythropoïèse est finement régulée de façon à ce que le nombre de GR produits soit en adéquation avec les besoins en oxygène des tissus périphériques. En effet, une production insuffisante de GR conduit à l'anémie et une production trop importante de GR, appelée polyglobulie, entraîne une augmentation de la viscosité du sang pouvant conduire à des thromboses. Cette régulation est essentiellement basée sur un équilibre entre prolifération-survie et apoptose. Les deux régulateurs positifs majeurs de l'érythropoïèse sont le Stem Cell Factor (SCF) et l'érythropoïétine (EPO). Le SCF, fabriqué de façon constitutive par les cellules stromales de la moelle osseuse, se lie à son récepteur C-kit et induit la survie et la

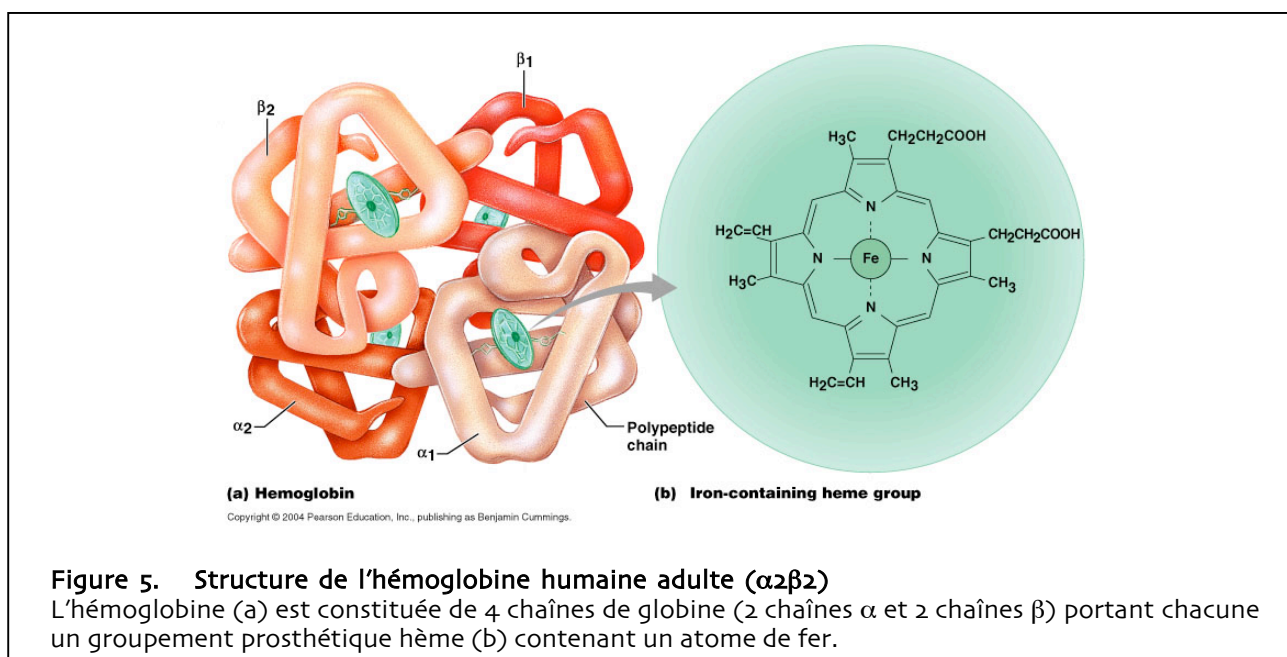


prolifération des progéniteurs érythroïdes en synergie avec notamment le GM-CSF et l'interleukine (IL)-3. L'EPO est le régulateur principal de l'érythropoïèse qui permet lui aussi de protéger les progéniteurs érythroïdes de la mort par apoptose. L'EPO est produite par les cellules interstitielles du cortex rénal et sa production est finement contrôlée par la tension en oxygène qui dépend elle-même du nombre de GR produits. Il existe une véritable régulation endocrine de l'érythropoïèse via l'EPO entre les reins et la moelle osseuse (Figure 4). Ainsi une forte corrélation est retrouvée entre le taux d'hémoglobine et le taux d'EPO. Le rein est la principale source d'EPO, c'est pourquoi un sujet ayant subi une néphrectomie est incapable d'augmenter son érythropoïèse face à une situation d'anémie. L'EPO peut également être produite par dans le foie par les hépatocytes et cellules de Ito. L'étude de la régulation de l'EPO par la teneur en oxygène a conduit à l'identification des facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor). HIF est un dimère constitué de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est régulée par l'hypoxie : en normoxie, HIF- $\alpha$  se lie à la protéine VHL (von Hippel-Lindau) et est rapidement dégradée par le protéasome après ubiquitination ; en hypoxie, HIF- $\alpha$  est stabilisée et peut alors se lier à la sous-unité  $\beta$  et d'autres protéines comme p300 pour se fixer sur les HRE (Hypoxia Responsive Element) présents dans le promoteur de ses gènes cibles. L'érythropoïèse est aussi régulée positivement (système rénine angiotensine, IL-3, IL-6) ou négativement (Tumour Growth Factor (TGF)- $\beta$ , caspases) par d'autres facteurs.

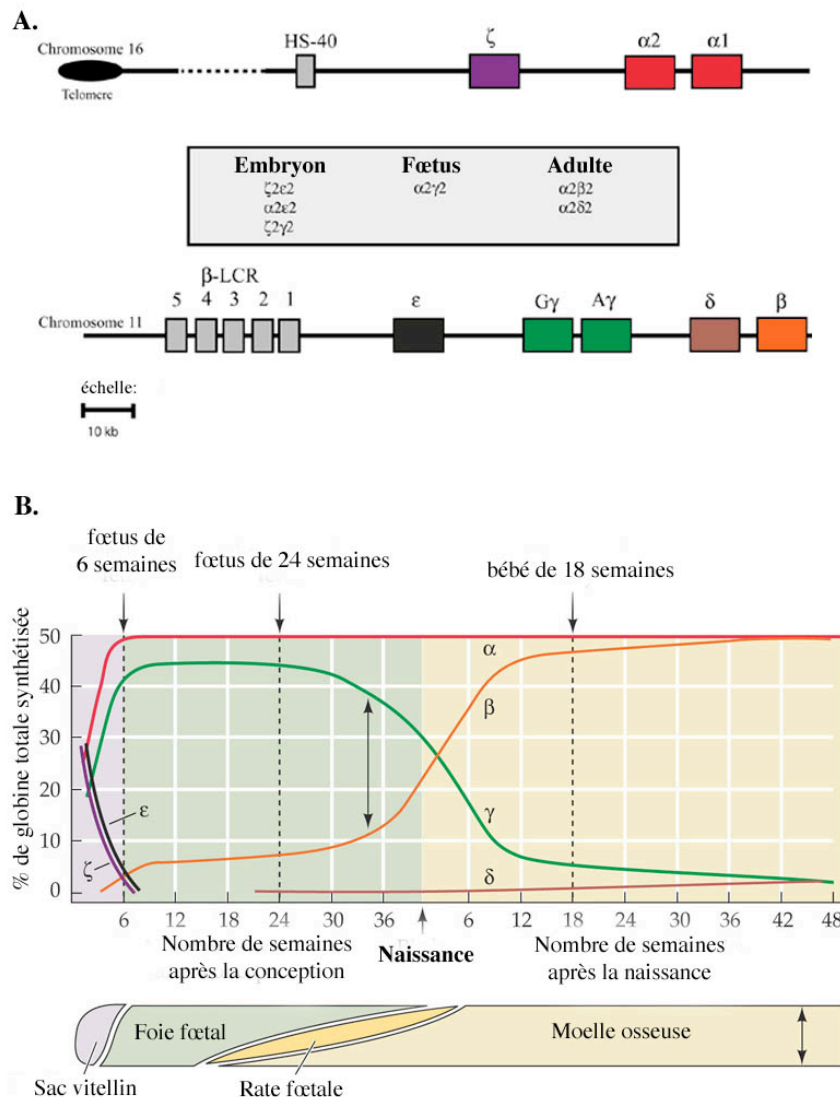


### ◆ Synthèse de l'hémoglobine

Le fer consommé par la moelle osseuse sert essentiellement à la synthèse d'hème, groupement prosthétique de l'hémoglobine responsable de la fixation de l'oxygène (Figure 5). L'hémoglobine des GR circulant représente environ 60 à 70% du fer total présent dans l'organisme. La synthèse de l'hémoglobine nécessite en effet la production coordonnée de l'hème et des globines qui la constituent (Figure 5). Les érythroblastes acquièrent le fer à partir de la Tf (voir chapitre précédent), ils possèdent pour cela une grande quantité de RTf à leur surface.



Les gènes codant pour les chaînes de globines sont organisés chez l'homme en deux clusters : le locus  $\alpha$  qui contient le gène embryonnaire  $\zeta$  et les deux gènes adultes  $\alpha$ , et le locus  $\beta$  qui contient les gènes  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  (Figure 6A). L'hémoglobine change en effet de composition au cours du développement à la suite des changements d'expression (« switch ») des gènes codant pour les chaînes de globines pendant les trois stades d'érythropoïèse (Figure 6B). Un premier switch a lieu lors de la transition de l'érythropoïèse embryonnaire (sac vitellin) à l'érythropoïèse définitive (foie fœtal) : le gène de l'hémoglobine fœtale est exprimé au détriment de celui de l'hémoglobine embryonnaire. Le deuxième switch, entre l'hémoglobine fœtale et adulte, a lieu pendant la période périnatale. Ces régulations d'expression de gènes sont dépendantes du LCR (Locus Control Region) présent en amont du cluster  $\beta$  globine et d'HS40 (zone d'hypersensibilité à la DNase I) en amont du cluster  $\alpha$  globine (Figure 6A). Au cours du développement et de la différenciation érythropoïétique, les gènes sont exprimés séquentiellement : les gènes exprimés précocement sont ceux situés près du LCR et les gènes adultes se trouvent en 3' (pour plus de détails, voir[346]).



LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Seventh Edition, Figure 14.8 Differential Expression in the Globin Gene Family  
© 2004 Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman & Co.

### Figure 6. Synthèse des chaînes de globine

A. Les deux clusters de gènes codant pour les globines sont situés sur les chromosomes 16 et 11. La composition des hémoglobines embryonnaires, fœtales et adultes est donnée dans le cadre entre les clusters

B. Graphique représentant les quantités des différentes chaînes de globines au cours du développement. Le lieu de synthèse des globines est indiqué en dessous

La synthèse de l'hème est partagée dans deux compartiments de la cellule, le cytosol et la mitochondrie (Figure 7). La première étape a lieu dans la mitochondrie : à partir de glycine et de succinylCoA, l'ALA ( $\delta$ -aminolevulinate) synthase forme l'ALA. Cette enzyme est présente sous deux formes, une forme érythroïde, eALAS ou ALAS2, qui présente la particularité d'être sensible au fer via le système IRE/IRP (voir chapitre « Système IRP/IRE ») et une forme ubiquiste, ALAS1 dont l'expression génique est réprimée par l'hème. Cette étape est l'étape limitante de la biosynthèse de l'hème (Figure 7). Des mutations

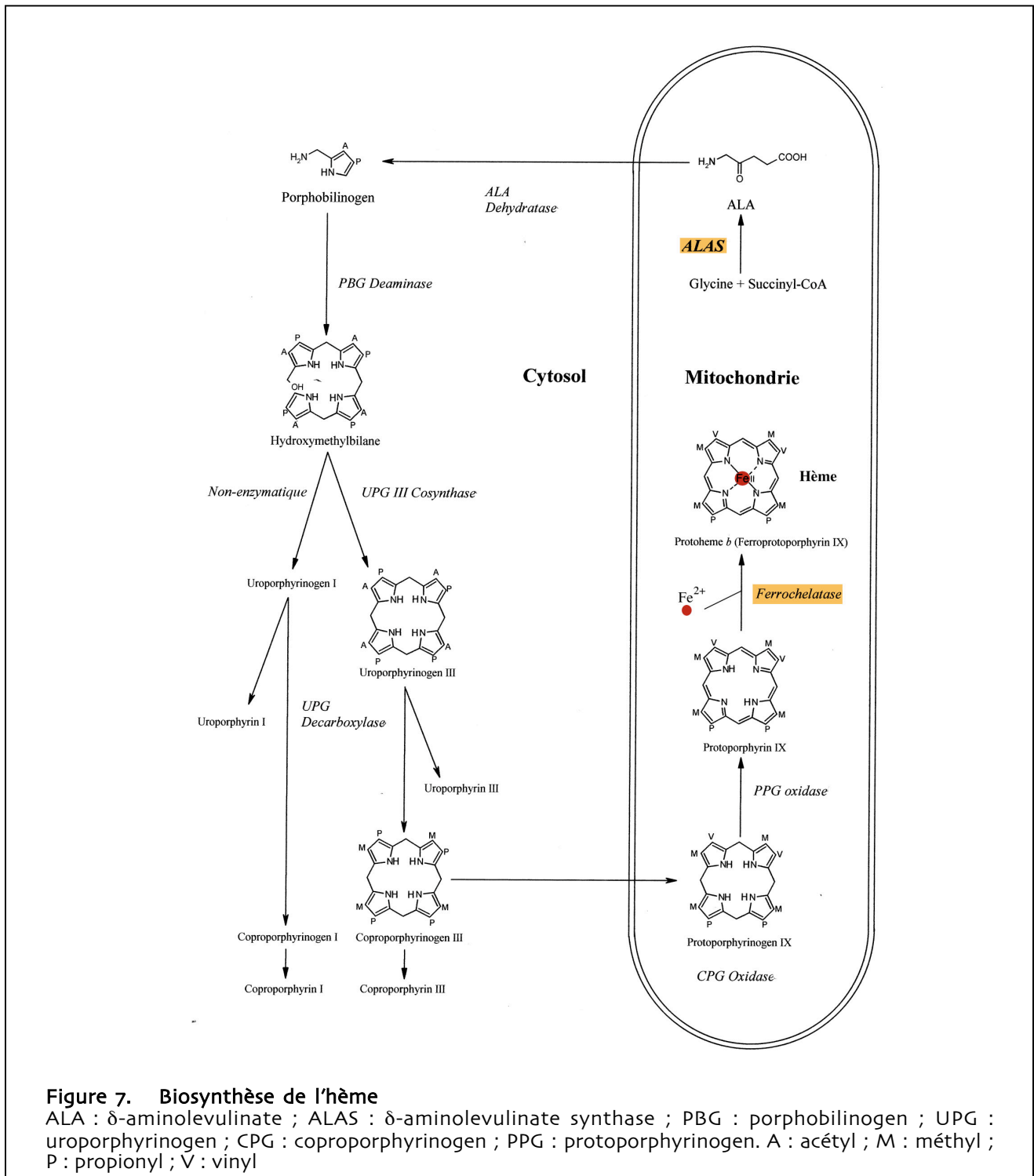
du gène *eALAS* situé en Xp11.21 entraînent chez l'homme une anémie sidérolastique<sup>3</sup> liée au chromosome X. Chez ces patients, le fer ne peut être incorporé dans l'hème et s'accumule dans la mitochondrie (OMIM n°301300).

L'ALA est ensuite exporté de la mitochondrie. L'assemblage du tetrapyrrole et la décarboxylation des chaînes auxiliaires ont lieu dans le cytosol. Les étapes finales de synthèse de l'hème se déroulent dans la mitochondrie avec notamment l'incorporation du fer par la ferrochélatase (Figure 7).

Des mutations dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les étapes finales de la synthèse de l'hème conduisent à l'accumulation de porphyrines. Il existe ainsi plusieurs formes de porphyries liées à la déficience de différentes enzymes : les porphyries les plus fréquentes sont liées à des mutations dans le gène codant pour l'uroporphyrinogène décarboxylase, c'est la porphyrie cutanée (OMIM n°176100) et à des mutations dans le gène de la ferrochélatase, c'est la porphyrie érythropoïétique (OMIM n°177000). Dans les deux cas, l'accumulation de porphyrines dans la peau ou dans les tissus sous-jacents entraîne une photosensibilisation accrue.

---

<sup>3</sup> Les anémies sidérolastiques sont un groupe hétérogène d'affections acquises et innées qui se caractérisent par la présence de sidérolastes dans la moelle osseuse. Les sidérolastes sont des GR immatures contenant des mitochondries surchargées en fer (sous la forme de ferritine mitochondriale). La forme la plus courante d'anémie sidérolastique innée est due à des mutations dans le gène *ALAS2* ou *eALAS*. La forme la plus courante d'anémie sidérolastique acquise est le syndrome myelodysplasique.



**Figure 7. Biosynthèse de l'hème**

ALA : δ-aminolevulinat ; ALAS : δ-aminolevulinat synthase ; PBG : porphobilinogen ; UPG : uroporphyrinogen ; CPG : coproporphyrinogen ; PPG : protoporphyrinogen. A : acétyl ; M : méthyl ; P : propionyl ; V : vinyl

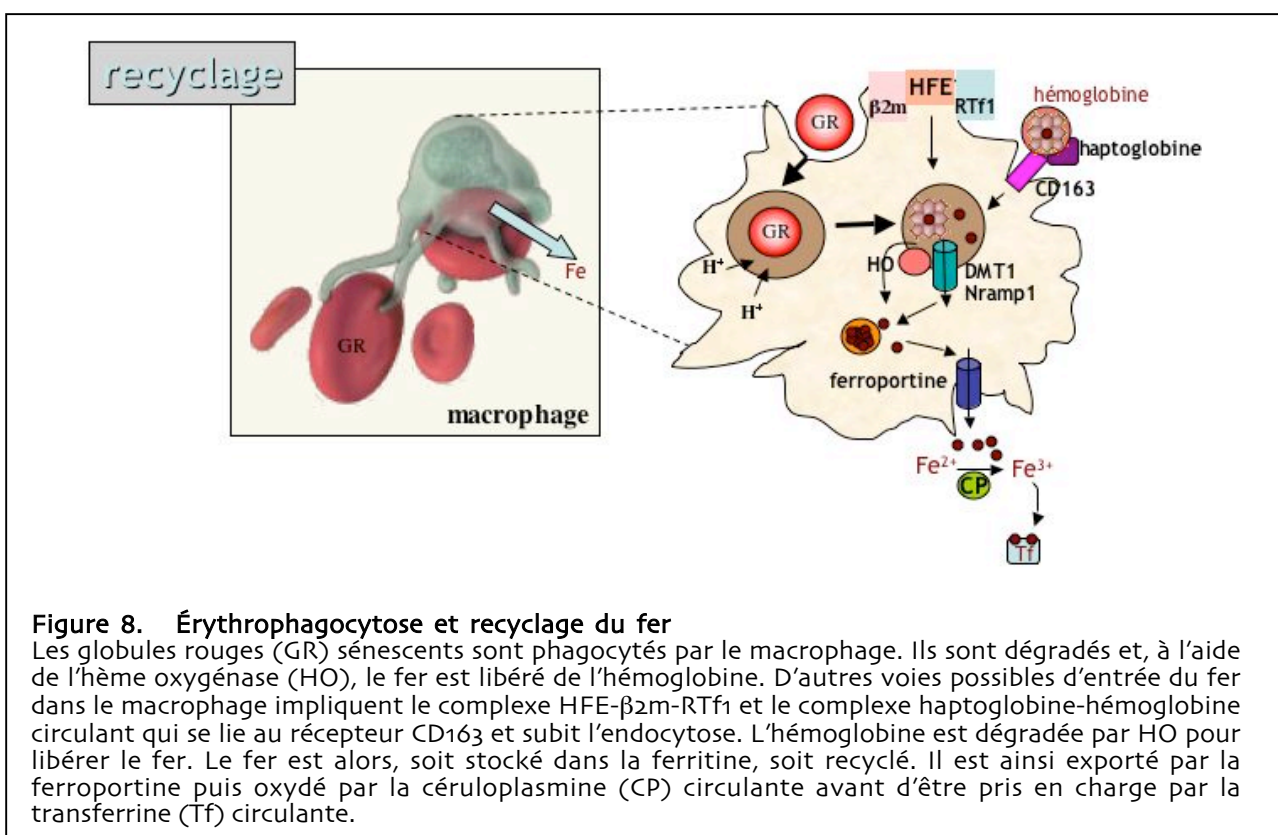
Il est à noter que récemment a été identifié un exporteur de l'hème, appelé FLVCR (pour Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor), qui pourrait jouer un rôle important dans le contrôle du contenu en hème des précurseurs érythroïdes[316]. Son rôle exact reste néanmoins à définir. De plus, des transcrits de la ferroportine, exporteur du  $\text{Fe}^{2+}$ , ont été retrouvés très récemment dans des lignées érythroïdes[50]. La présence d'exporteurs de différentes formes de fer dans les précurseurs érythroïdes suggèrent que ces cellules sont capables de faire sortir du fer en excès et d'éviter ainsi la formation de radicaux libres à l'intérieur de la cellule. Cette capacité des précurseurs érythroïdes à faire sortir du fer est

assez inattendue car on considère habituellement que ces cellules consomment tout le fer qu'elles contiennent pour la synthèse d'hémoglobine.

En cas de déficience en fer, la synthèse d'hémoglobine est perturbée, les GR produits contiennent alors moins d'hémoglobine qui leur donne leur couleur, on parle alors d'anémie hypochrome.

### Le recyclage du fer : l'érythrophagocytose

Nous l'avons vu, les érythrocytes circulants contiennent une grande quantité de fer (presque 2 g sur les 4 g totaux de l'organisme). Afin que ce fer puisse être réutilisé par l'organisme, les macrophages phagocytent les globules rouges sénescents, dont la durée de vie est de 120 jours chez l'homme, et exportent ensuite le fer, c'est l'érythrophagocytose (EP) (Figure 8).



Les GR sénescents sont reconnus par les macrophages grâce à :

- l'externalisation de la phosphatidylsérine à la surface des GR ;
- la peroxydation des lipoprotéines membranaires suite au stress oxydatif ;
- la perte de résidus sialiques ;
- la formation de néoantigènes de sénescence.

Le GR sénescents, phagocyté par le macrophage, se retrouve dans l'érythrophagolysosome. Le complexe enzymatique formé par la NADPH-cytochrome c réductase, l'hème-oxygénase-1 (HO-1) et la biliverdine réductase dégrade l'hème en CO (monoxyde de carbone), fer et bilirubine. Les souris KO *HO-1* ne sont pas capables de

recycler le fer des GR, suggérant un rôle essentiel d'HO-1 dans l'EP. Toutefois, on remarque que, dans ces souris, l'hème est quand même dégradé en fer, peut-être par compensation par HO-2[315] (voir Tableau 5).

Deux hypothèses sont émises quant à la destinée du fer suite à la dégradation de l'hème: il serait soit transféré au cytosol via un transporteur Nramp (Natural resistant associated macrophage protéin)1 ou 2 (c'est-à-dire DMT1), soit, l'hème ayant diffusé à travers la membrane plasmique de l'érythrophagolysosome, le fer serait libéré directement dans le cytosol. Le fer est ensuite stocké dans la ferritine et/ou exporté dans la circulation par la ferroportine où il peut de nouveau se fixer à la Tf après oxydation par la céruloplasmine (CP) (pour revue[19, 188]) (Figure 8). Il semble y avoir deux phases de sortie du fer des macrophages après EP :une phase rapide dans les quelques heures qui suivent l'EP et qui fait sortir deux tiers du fer et une phase plus lente qui impliquerait le déstockage du fer de la ferritine[94]. L'EP permet ainsi de recycler le fer principalement pour réalimenter en fer l'érythroïèse. Afin d'étudier les mécanismes encore peu connus intervenant dans l'EP, l'équipe de F. Canonne-Hergaux a récemment mis au point un modèle d'étude de l'EP en utilisant des macrophages, différenciés à partir de moelle osseuse de souris, incubés avec des GR murins dont la concentration intracellulaire de calcium a été augmentée[67].

L'érythrophagocytose a lieu essentiellement dans la pulpe rouge de la rate mais pas seulement. En effet, des souris ayant subi une splénectomie ne voient pas la durée de vie de leur GR augmenter laissant suggérer que les macrophages de la moelle osseuse et les cellules de Kupffer (macrophages du foie) sont capables de compenser la perte des macrophages spléniques pour l'EP[13].

Ce sont ainsi 80 à 90% des GR qui sont éliminés par voie extravasculaire par les macrophages tissulaires. Les 10 à 20% restant subissent une hémolyse intravasculaire qui entraîne la libération d'hémoglobine dans le sang. Cette hémoglobine se lie à l'haptoglobine circulante. Le complexe haptoglobine-hémoglobine est ensuite capté par les macrophages qui possèdent un récepteur spécifique de l'haptoglobine, le CD163 (Figure 8), et par les hépatocytes par un mécanisme encore inconnu[84]. Ainsi, très peu d'hémoglobine libre est retrouvée dans le sang. Il peut arriver néanmoins que dans des situations de forte hémolyse (par exemple dans les thalassémies<sup>4</sup>), l'hémoglobine ne puisse être entièrement titrée par l'haptoglobine. L'hémoglobine se dissocie alors dans le sang et peut être filtrée par le glomérule via le récepteur mégaline-cubiline ou dégradée après liaison avec des protéines de transport de l'hème par le foie (voir ci-dessous).

### **Le stockage du fer**

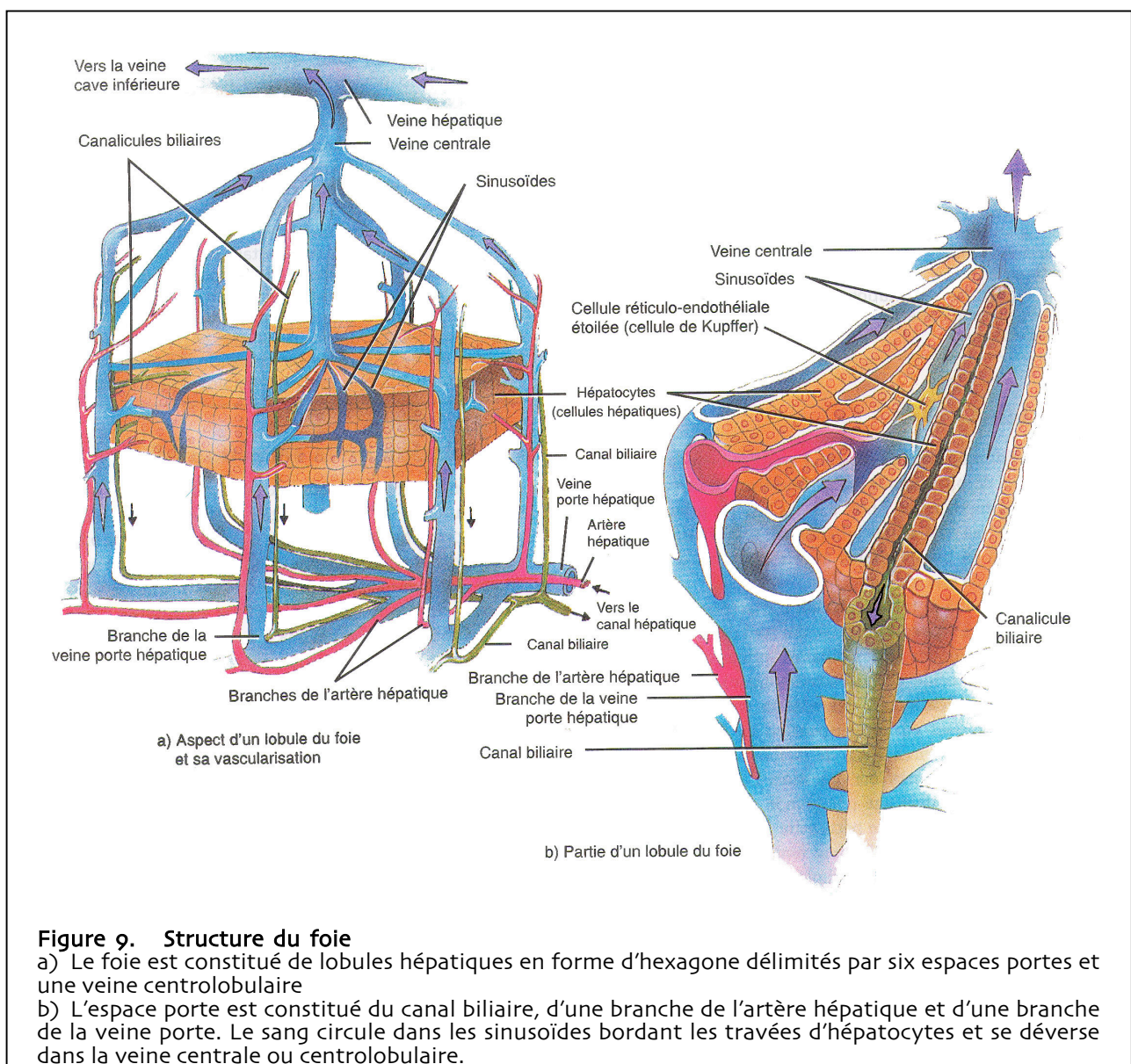
Le site majeur de stockage du fer est le foie (1 g). Le foie est un organe qui assure de multiples fonctions vitales : synthèse et sécrétion de la bile, métabolisme des sucres, des

---

<sup>4</sup> La thalassémie est une maladie génétique hétérogène due à des mutations dans les gènes codant pour la globine. La thalassémie est à mode de transmission autosomique récessif. Lorsque que les gènes mutés codent pour la chaîne  $\alpha$  globine, on parle d' $\alpha$ -thalassémie. De la même manière, on parle de  $\beta$ -thalassémie pour des patients mutés pour la chaîne  $\beta$ [335]. La précipitation des chaînes de globine non appariées entraîne la production de GR anormaux qui subissent rapidement une hémolyse.



lipides et des protéines de détoxification, stockage de la vitamine B12... Le foie reçoit deux systèmes vasculaires afférents : le sang arrive au foie par la veine porte hépatique qui contient les éléments digérés au niveau du duodénum et par l'artère hépatique, riche en oxygène (O<sub>2</sub>). Le sang passe à travers les lobules hépatiques et le sang efférent est acheminé par les sinusoides vers la veine centrolobulaire. La bile produite par les hépatocytes dans les canalicules biliaires suit un chemin inverse et est récoltée par les canaux biliaires pour être stockée puis sécrétée par la vésicule biliaire. Il existe ainsi un gradient d'O<sub>2</sub> entre l'espace porte composé de la veine porte, de l'artère hépatique et du canal biliaire, riche en nutriments et oxygène, et la veine centrolobulaire (Figure 9a). Le parenchyme hépatique est formé d'hépatocytes. Entre les travées d'hépatocytes, dans les sinusoides, on trouve les macrophages du foie, appelés cellules de Kupffer (Figure 9b), des cellules endothéliales et les cellules de Ito (impliquées dans la synthèse du collagène).



**Figure 9. Structure du foie**

a) Le foie est constitué de lobules hépatiques en forme d'hexagone délimités par six espaces portes et une veine centrolobulaire

b) L'espace porte est constitué du canal biliaire, d'une branche de l'artère hépatique et d'une branche de la veine porte. Le sang circule dans les sinusoides bordant les travées d'hépatocytes et se déverse dans la veine centrale ou centrolobulaire.

Le foie est capable d'accumuler le fer lié à la ferritine pour empêcher la circulation d'une trop grande quantité de fer libre. Ce fer lié à la ferritine est facilement mobilisable et les



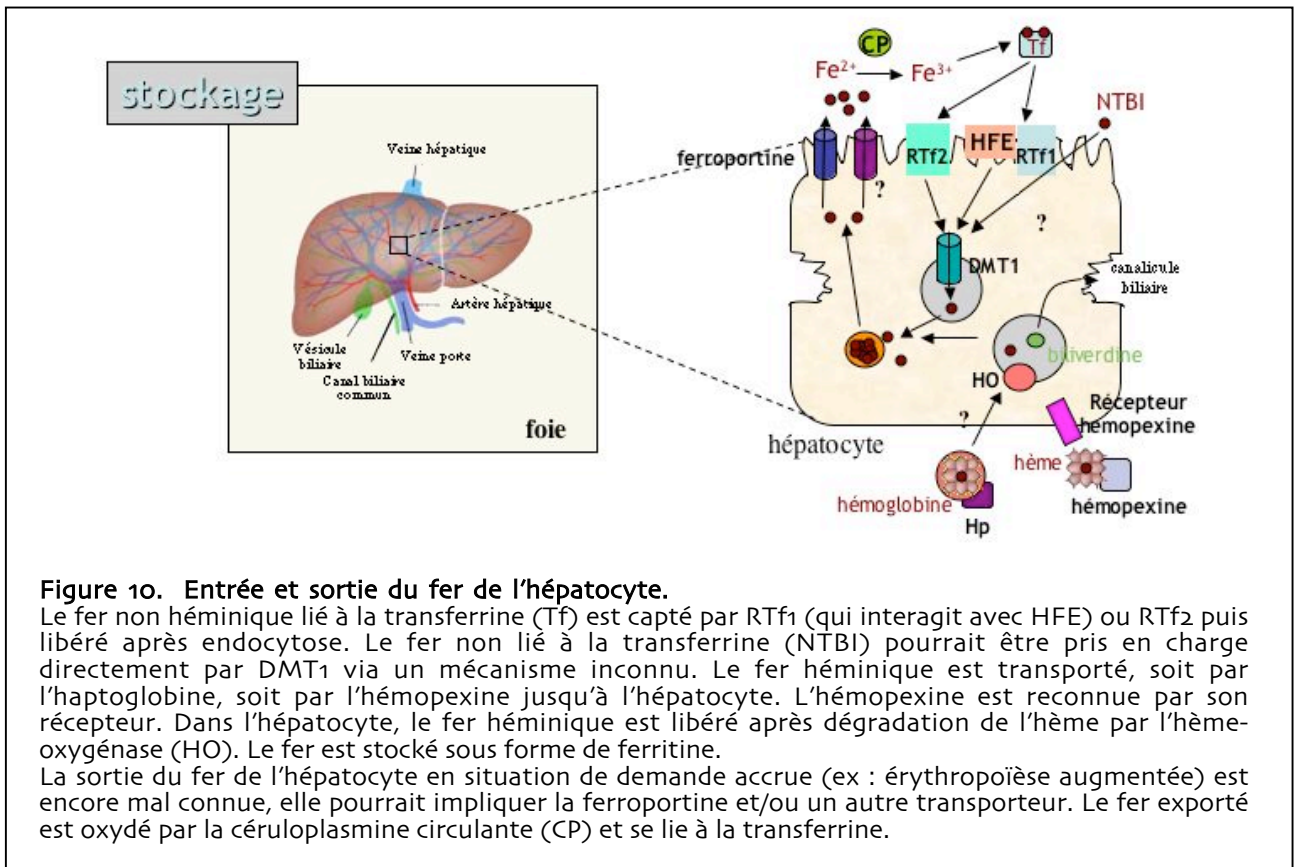
réerves hépatiques sont utilisées en cas de carence en fer (suite à une perte importante de sang ou à un régime pauvre en fer).

Le fer parvient jusqu'au foie par l'espace porte principalement sous la forme d'holoTf. Mais, nous l'avons vu, les hépatocytes sont capables de récupérer les complexes haptoglobine-hémoglobine par une voie encore inconnue. L'hémoglobine complexée à l'haptoglobine et l'hème lié à l'albumine puis à l'hémopexine par le récepteur à l'hémopexine sont pris en charge par l'hépatocyte, mais les mécanismes sont mal connus. L'hémoglobine et l'hème sont ensuite dégradés par l'hème oxygénase. La bilirubine produite sera ensuite sécrétée dans la bile (Figure 10).

Une autre forme de fer, non lié à la transferrine et appelé NTBI (Non Transferrin Bound Iron), peut également être récupérée par les hépatocytes. Cette dernière forme de fer est très toxique et ne serait présente qu'en cas de surcharge martiale pathologique une fois la capacité de liaison de la transferrine dépassée comme lors d'une hémochromatose (voir chapitre « Hémochromatose héréditaire »)[212].

Les molécules impliquées dans l'entrée et la sortie du fer de l'hépatocyte ne sont pas clairement établies (Figure 10). Pour le captage du fer par l'hépatocyte, on pense que le NTBI serait transporté à travers la membrane par le transporteur DMT1[49, 360]. Se pose le problème, dans ce cas, de l'environnement permettant ce transport car DMT1 est connu pour n'agir qu'à la faveur d'un pH acide. De plus, la surcharge en fer observée dans des souris KO pour le gène codant pour DMT1 suggère que DMT1 n'est pas essentiel au transport de NTBI de l'hépatocyte[139] (voir Tableau 5). Le fer lié à la Tf serait capté, lui, par le récepteur transferrine 2 (RTf2). Ce dernier a une affinité beaucoup moins forte pour l'holoTf que son homologue RTf1 mais il est présent en grande quantité dans les hépatocytes. Il a également été montré que bien que l'ARNm RTf2 soit insensible au fer, les taux de protéine RTf2 sont augmentés par le fer[65, 173, 322], contrairement à RTf1 (régulé, lui, négativement par le fer via le système IRE/IRP, voir « Système IRP/IRE »). Une autre différence est que RTf2, contrairement à RTf1, ne semble pas interagir avec HFE[390].

En cas de carence en fer ou lorsque des patients atteints d'hémochromatose sont phlébotomisés (voir plus loin), le foie est capable de mobiliser ses réserves afin de satisfaire les besoins accrus en fer pour l'érythropoïèse. La ferroportine est le seul exporteur de fer cellulaire connu à ce jour et représente donc un candidat potentiel pour l'export de fer des hépatocytes (Figure 10). Ainsi, l'absence de ferroportine dans des souris KO ferroportine conduit à une accumulation de fer dans l'hépatocyte[74].



### Figure 10. Entrée et sortie du fer de l'hépatocyte.

Le fer non héminique lié à la transferrine (Tf) est capté par RTf<sub>1</sub> (qui interagit avec HFE) ou RTf<sub>2</sub> puis libéré après endocytose. Le fer non lié à la transferrine (NTBI) pourrait être pris en charge directement par DMT1 via un mécanisme inconnu. Le fer héminique est transporté, soit par l'haptoglobine, soit par l'hémopexine jusqu'à l'hépatocyte. L'hémopexine est reconnue par son récepteur. Dans l'hépatocyte, le fer héminique est libéré après dégradation de l'hème par l'hème-oxygénase (HO). Le fer est stocké sous forme de ferritine.

La sortie du fer de l'hépatocyte en situation de demande accrue (ex : érythropoïèse augmentée) est encore mal connue, elle pourrait impliquer la ferroportine et/ou un autre transporteur. Le fer exporté est oxydé par la céruloplasmine circulante (CP) et se lie à la transferrine.

Outre les hépatocytes, les cellules de Kupffer constituent, comme les autres macrophages tissulaires, des réservoirs potentiels de fer du fait de leur capacité d'EP (voir ci-dessus).

## 2) Molécules impliquées dans le métabolisme du fer

### Protéines de liaison du fer : la transferrine (Tf), la lactoferrine et la lipocaline neutrophile

#### ◆ Transferrine (Tf) (pour revue, voir[129])

La transferrine a été découverte en 1946 dans le plasma et a d'abord été appelée sidérophiline pour son affinité pour le fer. Elle est composée de 679 acides aminés qui forment deux lobes, un lobe N terminal et un lobe C terminal. Chaque lobe peut lier un ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ). La conformation de la protéine est sensible au pH : à pH acide, le site de liaison du fer s'ouvre, facilitant la libération du fer. Le gène présente un grand nombre de polymorphismes tolérés dans la population avec 3 isotypes majeurs nommés B, C et D.

La transferrine est principalement produite à l'âge adulte par les hépatocytes (6500 molécules de Tf par cellule chez le rat[163]). Il existe également d'autres sites d'expression du gène *Tf* : le cerveau (83 molécules / cellule) et les testicules (114 molécules / cellule)[163]. Pendant le développement fœtal, le gène *Tf* est fortement exprimé dans le muscle et les tissus non-hépatiques et non-nerveux puis l'expression diminue lors du développement postnatal. À l'inverse, dans le cerveau, le gène *Tf* est faiblement exprimé à la naissance et l'expression augmente avec l'âge jusqu'à atteindre un plateau à l'âge adulte[222].

Seule l'expression hépatique de *Tf* est modulée par le contenu en fer chez le rat : un régime pauvre en fer augmente la transcription de *Tf* dans le foie sans modifier l'expression extra-hépatique[163]. De même, la synthèse de Tf est induite par traitement aux glucocorticoïdes ou aux œstrogènes. La Tf est également une protéine de la réponse inflammatoire, elle est diminuée par les cytokines. Enfin, s'ajoute à ces régulations une régulation positive en situation d'hypoxie grâce à la présence de deux sites de liaison à HIF<sup>5</sup> dans le promoteur *Tf*[332].

L'absence de Tf circulante chez des patients est très rare (seulement 8 patients recensés dans 6 familles différentes), c'est l'atransferrinémie[149] (OMIM n°209300) caractérisée par une anémie microcytaire associée à une surcharge en fer tissulaire. Les patients sont traités par des transfusions sanguines. Il existe un modèle murin reproduisant ce phénotype, la souris hypotransferrinémique *hpx*[22]. Chez la souris *hpx*, la faible quantité de Tf circulante est due à une mutation naturelle conduisant à un défaut d'épissage. Le transcrit issu de ce gène muté est très instable[161, 359]. Les souris meurent avant le sevrage d'anémie sévère. L'étude de ces souris a permis de comprendre quel pourrait être l'histoire naturelle de la maladie. En absence de Tf, les précurseurs érythroïdes ne sont pas approvisionnés en fer, ce qui entraîne l'anémie. La surcharge en fer associée est due, d'une part à l'accumulation du fer

---

<sup>5</sup> HIF est un régulateur-clé en situation d'hypoxie. C'est un dimère HIF $\alpha$ /HIF $\beta$ . HIF $\alpha$  n'est pas présent dans une cellule en situation normoxique car elle hydroxylée permettant sa liaison avec la protéine VHL qui entraîne son ubiquitination puis sa dégradation dans le protéasome. En situation d'hypoxie, HIF $\alpha$  n'est pas hydroxylée et peut interagir avec p300 et HIF $\beta$ . Ce complexe HIF/p300 se lie aux Hypoxia Responsive Element (HRE) présents dans de nombreux gènes, en particulier le gène de l'EPO (voir paragraphe « Erythropoïèse »).

non lié à la transferrine (NTBI pour Non Transferrin Bound Iron) dans les organes, et, d'autre part, à une augmentation de l'absorption intestinale de fer pour compenser l'anémie[56]. Ce modèle est très utilisé pour distinguer les régulations liées à l'apparition d'une anémie, des régulations consécutives à une déficience en fer des tissus puisque ces souris sont surchargées en fer.

◆ Lactoferrine (pour revue, voir[85])

La lactoferrine fait partie de la famille des transferrines (pour revue, voir[205]). Elle est capable de lier le fer avec plus d'affinité que la Tf. Elle est retrouvée dans le lait, les sécrétions muqueuses, la sueur et les granules des neutrophiles. Le gène du récepteur de la lactoferrine est exprimé par les lymphocytes et cette expression est associée à l'activation des lymphocytes. Ainsi, la lactoferrine joue un rôle important dans la réponse immunitaire en régulant la prolifération et l'activation des lymphocytes mais aussi des cellules Natural Killer et des monocytes. La lactoferrine a de plus une activité antibactérienne. Mais elle ne semble pas avoir de rôle essentiel dans le métabolisme du fer car en absence de lactoferrine (souris KO lactoferrine) aucune perturbation du métabolisme du fer n'est observée[387].

◆ Lipocaline neutrophile (NGAL ou 24p3)

Les lipocalines forment une famille de petites molécules solubles avec une structure tridimensionnelle conservée (8 feuillets  $\beta$  anti-parallèles, 3 à 10 hélices à l'extrémité N-terminale et une hélice  $\alpha$  en C-terminal)[403]. La lipocaline neutrophile NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) est une protéine de 25kDa. Elle est présente dans les granules de neutrophiles et dans les cellules épithéliales en réponse à des signaux inflammatoires. NGAL a été initialement impliquée dans la différenciation cellulaire, la tumorigénèse et l'apoptose. Son rôle dans ces différents mécanismes reste à ce jour mal connu. En 2002, une équipe américaine a permis d'établir que NGAL est capable de se lier à des sidérophores<sup>6</sup> contenant du  $Fe^{3+}$  et chargés négativement. Contrairement à la Tf et à la lactoferrine, NGAL n'est pas capable de se lier aux ions fer directement car ils sont chargés positivement. La liaison de NGAL à des sidérophores serait spécifique aux sidérophores de type catecholate[127]. Ainsi, NGAL produite dans une situation d'inflammation serait capable de détourner le fer utilisé par les bactéries et essentiel à leur survie, elle aurait par cette propriété une action complémentaire à la lactoferrine.

Chez la souris, la protéine Ngal est retrouvée dans un compartiment intracellulaire de progéniteurs épithéliaux du rein différent de celui où l'on retrouve la Tf[402]. Des études de transport du complexe lipocaline neutrophile-sidérophore ont montré qu'il existait un récepteur pour NGAL au niveau des cellules épithéliales du rein[402]. Le récepteur murin de Ngal vient tout juste d'être cloné[71]. Le gène de ce récepteur semble être exprimé dans un grand nombre de tissus et sa surexpression dans des cellules confirment le rôle de Ngal dans

---

<sup>6</sup> Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire produites par les microorganismes pour chélater le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) avec une très haute affinité et être ensuite captées par des récepteurs spécifiques.

le transport de fer et l'apoptose[71]. Ces deux rôles seraient exclusifs en fonction de la liaison ou non de Ngal avec un complexe contenant du fer[71].

Des souris KO *Ngal* (ou *lipocalin 2*) sont normales et viables quand elles sont élevées dans un environnement sans pathogènes ce qui suggère que la lipocaline n'aurait pas de rôle en situation non pathologique. En effet, le rôle de NGAL dans la liaison du fer en situation physiologique impliquerait l'existence de sidérophores endogènes à l'organisme ce qui, jusqu'à maintenant, reste à montrer. Lorsque les souris KO *Ngal* sont infectées par une bactérie (*E coli* H9049), elles présentent une bactériémie et une mortalité plus élevées que les souris contrôles, confirmant leur rôle antibactérien[102].

### Les récepteurs de la transferrine : RTf1 et RTf2

#### ◆ RTf1 (pour revue, voir[4])

Le récepteur de la transferrine (codé par le gène *TFR1*) est formé de deux sous-unités de 90 kDa chacune. Une tige relie la partie globulaire extracellulaire de la partie membranaire de la protéine (Figure 11A). Cette région est un site de clivage : après protéolyse par une sérine protéase, différents fragments de RTf1 sont produits. La partie extracellulaire libérée dans le plasma, est appelée le RTf sérique ou soluble (RTfs)[177] (Figure 11B). Cette forme soluble circule dans le plasma liée à la Tf. Sa fonction est inconnue, mais un rôle régulateur du RTfs a été proposé permettant l'ajustement de l'absorption intestinale de fer et le relargage du fer macrophagique[61]. L'intérêt du dosage du RTfs dans le bilan martial est sujet à controverse[48]. Certains l'utilisent comme indicateur de l'érythropoïèse et des réserves en fer[20]. La quantité de RTf1 sérique serait proportionnelle à la quantité de RTf1 présents à la surface des cellules, en particulier des précurseurs érythroïdes. Lorsque l'activité érythroïde augmente, et par là le nombre d'érythroblastes, la quantité de RTfs augmente. De même, en présence d'une carence en fer, la quantité de RTfs s'élève.

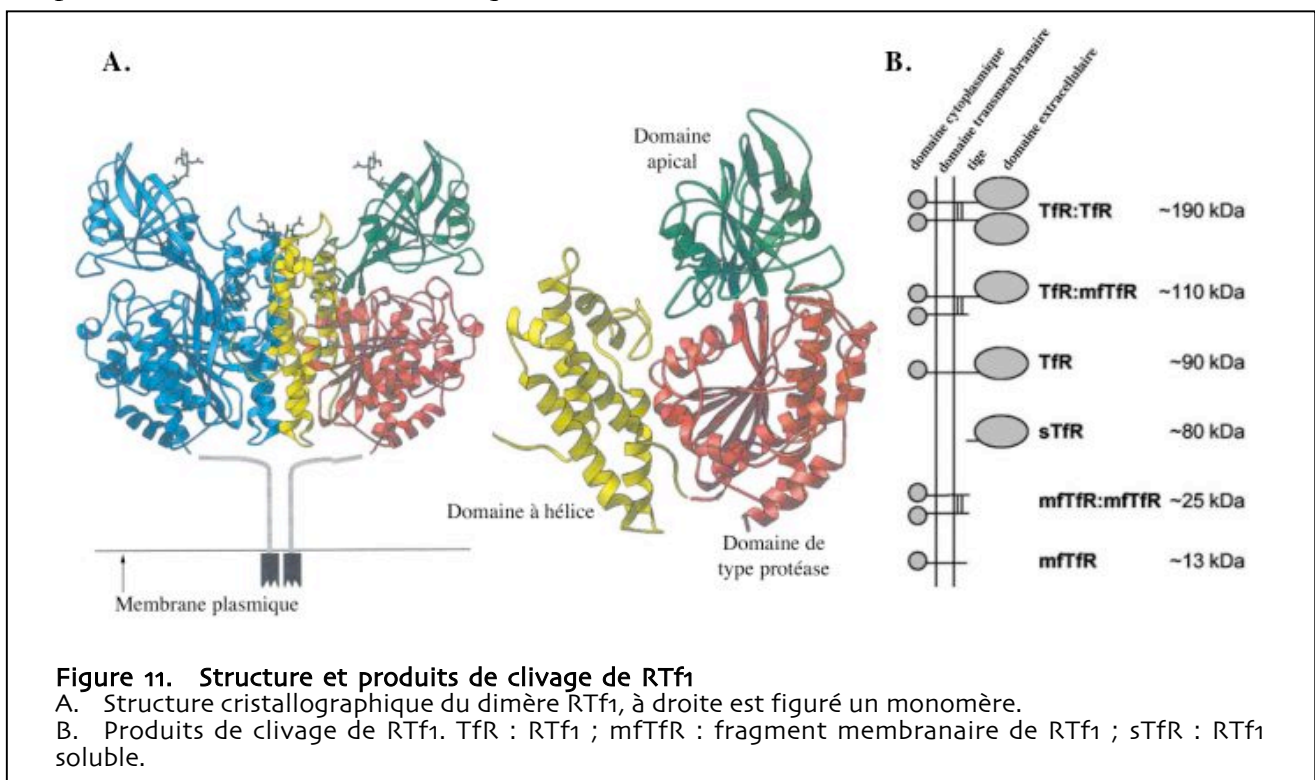


Figure 11. Structure et produits de clivage de RTf1

A. Structure cristallographique du dimère RTf1, à droite est figuré un monomère.

B. Produits de clivage de RTf1. TfR : RTf1 ; mTfR : fragment membranaire de RTf1 ; sTfR : RTf1 soluble.

L'augmentation de la production de RTf1 en situation de privation de fer est liée à la présence de séquences de régulation sur la partie 3' non traduite de l'ARNm, les IRE (Iron Responsive Element): en absence de fer, les IRP (Iron Regulatory Protein) se lient aux IRE et stabilisent l'ARNm RTf1 ce qui entraîne une augmentation de protéines produites (voir chapitre « Système IRP/IRE »). La quantité de RTf1 est également sensible à l'état prolifératif de la cellule : plus une cellule prolifère, plus elle possède de grandes quantités de RTf1 à sa surface[294, 363].

Le gène codant pour RTf1 est exprimé dans les globules rouges, les précurseurs érythroïdes, les hépatocytes, les monocytes et les cellules formant la barrière hémato-encéphalique.

À pH 7,4, RTf1 ne se lie qu'à la Tf liée à un ou deux atomes de fer. Chaque sous-unité de RTf1 est capable de se lier à HFE, HFE entrant en compétition avec l'holoTf pour la liaison à RTf1[122, 333] (voir paragraphe « HFE »).

L'acquisition du fer par les cellules via le cycle Tf-RTf1 (voir chapitre « L'utilisation du fer via le cycle Tf/RTf ») joue un rôle central dans le développement car une absence de RTf1 entraîne une létalité embryonnaire chez la souris au stade E10.5-E12.5[223]. L'étude de souris chimères créées à partir de cellules ES sans RTf1 injectées dans des blastocystes de génotype sauvage pour le gène *TfR1*, a permis d'établir que ce rôle semble essentiel surtout pour la production de cellules hématopoïétiques[274]. En effet, ces chimères n'ont pas de cellules *TfR1*<sup>-/-</sup> dans les tissus hématopoïétiques (moelle osseuse, rate, thymus) car de telles cellules ne survivent pas, alors que les autres tissus contiennent des cellules sans RTf1.

#### ◆ RTf2 (pour revue, voir[362])

Le gène codant pour RTf2 (*TFR2*), cloné en 1999 par Kawabata *et al.*[178], est à l'origine de deux transcrits, une forme  $\alpha$  de 2,9 kb et une forme  $\beta$  de 2,5kb. Il est probable que la forme  $\beta$  qui ne possède pas les exons 1, 2 et 3, représente une forme intracellulaire soluble du récepteur. La forme  $\alpha$  est majoritairement exprimée dans le foie et également dans les précurseurs érythroïdes et les cellules duodénales (cryptes et villosités)[65, 135, 179], alors que la forme  $\beta$  est faiblement exprimée dans tous les tissus[178]. RTf2 est également exprimé par un grand nombre de lignées cellulaires dérivées de tumeurs solides de différents tissus[65].

Plusieurs équipes ont montré que la quantité de protéine RTf2 était augmentée *in vitro* par traitement de lignées cellulaires à l'holoTf[65, 173, 322] mais pas après traitement au fer non lié à la Tf[173, 322]. De plus, *in vivo*, lors d'une surcharge en fer expérimentale (régime riche en fer) ou pathologique (souris KO *Hfe*, souris thalassémiques), les taux de RTf2 sont également augmentés[322]. Cette augmentation de quantité de protéine RTf2 n'est pas liée à une augmentation de l'ARNm[173, 322] mais serait due à une augmentation de la demi-vie de la protéine[173]. Cette régulation de RTf2 par le fer est différente de celle de RTf1. En effet, l'ARNm RTf2, contrairement à celui de RTf1, ne possède pas de séquence IRE (voir chapitre « Système IRP/IRE »). D'autre part, alors que RTf1 est régulé négativement par le fer, la surcharge en fer augmente la quantité de RTf2.

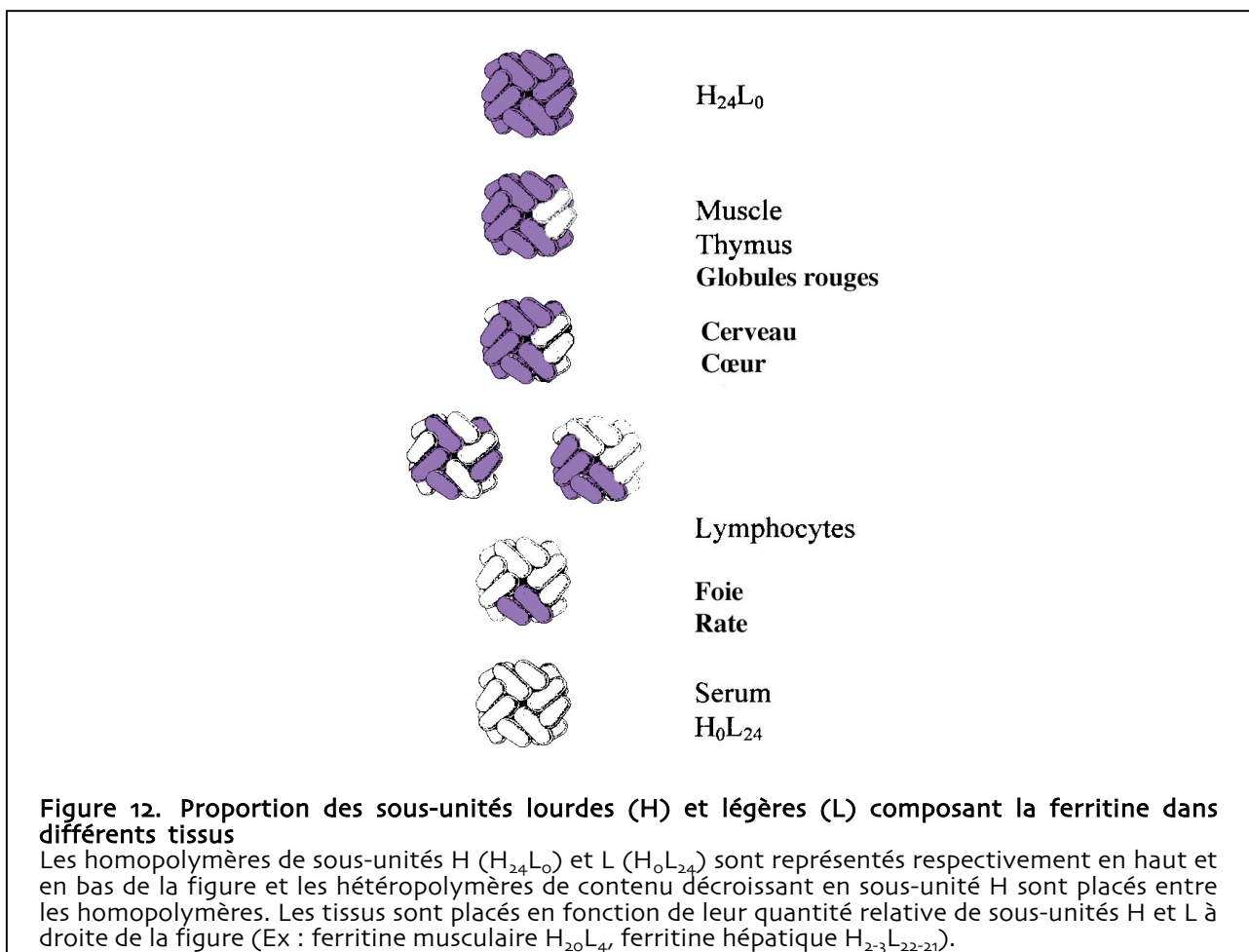
RTf2 est homologue à RTf1 (45% d'identité et 66% de similarité dans le domaine extracellulaire) mais lie l'holoTf avec une affinité 25 fois plus faible.[178, 390]. Enfin, RTf2 n'est pas capable de lier la protéine HFE.

L'implication de RTf2 dans l'hémochromatose héréditaire[35] (voir chapitre « Hémochromatose héréditaire ») suggère que RTf2 aurait un rôle de régulation de l'homéostasie du fer via la régulation de l'expression du gène hepcidine[180, 278] (voir chapitre « Hepcidine et désordres du métabolisme du fer »).

### Ferritine : la protéine de stockage

(voir revues[11, 145])

La ferritine a été cristallisée en 1937 à partir de rate de cheval (c'était la deuxième protéine cristallisée après la peroxydase de raifort). La ferritine est formée de 24 sous-unités de types H (heavy, chaîne lourde) et/ou L (light, chaîne légère) (Figure 12). Chaque molécule de ferritine de 450 kDa peut séquestrer jusqu'à 4500 atomes de fer.



Seules les sous-unités H sont capables d'oxyder le fer, produisant à chaque oxydation du peroxyde d'hydrogène, composé réactif qui pourrait être à l'origine de la formation de l'hémosidérine (voir ci-dessous). Les sous-unités L seraient capables de former des centres de nucléation de fer plus facilement et donc de stocker plus de fer. Les cellules contenant de la ferritine riche en sous-unités L sont celles qui sont chargées du stockage du fer (hépatocytes,

macrophages) (Figure 12). Les ferritines riches en sous-unités H se retrouvent dans le cœur et le cerveau (Figure 12).

La ferritine sérique, souvent utilisée en clinique pour évaluer les stocks en fer ou l'état inflammatoire, est composée essentiellement de sous-unités L dont une partie est glycosylée. Elle est sécrétée par les hépatocytes et les macrophages, mais son mode de sécrétion est encore mal connu. En effet, la ferritine ne contient pas de site consensus de type peptide signal guidant la protéine dans la voie de sécrétion. Une étude récente dans des lignées hépatomateuses tend à montrer que la ferritine sérique est issue du même transcrite que la ferritine cytoplasmique et que, c'est au moment de la traduction de cet ARNm unique, sous la dépendance d'un facteur sérique non encore identifié, que se constitue un pool de protéines à destinée cytoplasmique et un pool de protéines à destinée de sécrétion[121].

Enfin, il existe une forme mitochondriale de la ferritine impliquée dans l'accumulation de fer retrouvée dans les anémies sidéroblastiques (voir paragraphe « Erythropoïèse et synthèse de l'hémoglobine »)[219]. Cette troisième ferritine codée par un gène de l'ADN nucléaire, possède le même site ferroxidase que la ferritine H et un site d'export vers la mitochondrie (voir revue[220]).

L'hémosidérine se trouve dans les tissus surchargés en fer, elle est issue de la dégradation de la ferritine dans des lysosomes. Les lysosomes contenant de l'hémosidérine sont appelés sidérosomes. C'est l'hémosidérine que l'on détecte lorsqu'on fait une coloration de Perls au bleu de Prusse<sup>7</sup>.

L'ARNm de la ferritine contient dans sa région 5'UTR un IRE (Iron Responsive Element). Cet élément de régulation est reconnu par les protéines IRP (Iron Regulatory Proteins) produites en situation de déficience en fer qui se fixent sur l'IRE, empêchant la traduction de la ferritine (voir chapitre « Système IRP/IRE »). La ferritine H est également augmentée par le fer par une activation de la transcription de son gène[391].

Les cytokines inflammatoires entraînent une production plus importante de ferritine par augmentation de la transcription du gène codant pour la ferritine H et de la traduction des ARNm des ferritines H et L[331, 358]. Ainsi, une augmentation de la ferritine sérique n'est pas forcément liée à une augmentation des réserves en fer, mais peut traduire, dans les syndromes inflammatoires, une action directe des cytokines sur la synthèse de ferritine.

Enfin, il est à noter que l'expression du gène codant pour la ferritine H est diminuée par l'oncogène c-myc[395].

Des mutations dans l'IRE de la ferritine L, ont été retrouvées chez des patients atteints du syndrome cataracte hyperferritinémie[18] (OMIM n°600886 et revue[39]). Chez ces patients, la ferritine L est produite de façon constitutive et son accumulation dans le cristallin entraîne une cataracte. D'autres mutations de la ferritine L ont été décrites comme responsables de troubles neurologiques apparaissant à l'âge adulte. Ces troubles

---

<sup>7</sup> Le principe de la coloration de Perls est basé sur la libération du fer de la partie protéique par un traitement acide. Les ions ferriques réagissent alors avec le ferrocyanure de potassium pour donner un précipité couleur bleu de Prusse.



neurologiques sont associés à une surcharge martiale dans le cerveau appelée « neuroferritinopathie »[57] (OMIM n°606159 et revue[221]). Dans ce cas, une ferritine L anormale est produite conduisant à l'accumulation de fer soluble toxique dans le cerveau. Des mutations dans l'IRE de la ferritine H sont associées à une surcharge martiale multiviscérale (foie, cœur, rate, moelle osseuse) à transmission dominante[176] (OMIM n°134770).

L'absence de ferritine H chez la souris entraîne une létalité embryonnaire, montrant que les deux sous-unités L et H ne sont pas redondantes[91]. Les souris hétérozygotes *FtH+/-* n'ont pas de perturbations du métabolisme du fer, mais, chez ces souris, on retrouve une plus grande quantité de ferritine L probablement suite à un mécanisme de compensation via un changement local du fer intracellulaire[92]. Récemment, une équipe suisse a développé un modèle KO conditionnel de la ferritine H afin de pallier la létalité embryonnaire et d'étudier le rôle de cette ferritine dans différents tissus[60]. La délétion est obtenue par excision d'un fragment génomique de la ferritine H par une recombinase Cre inducible par l'interféron (IFN) (*Mx-Cre*). À 10 semaines, ces souris qui n'ont pas de ferritine H dans le foie et la rate et qui ont une diminution des transcrits dans plusieurs autres organes, ont une diminution du fer splénique et hépatique[60]. Enfin, la diminution des stocks en fer n'entraîne pas dans ces souris d'altération des paramètres hématologiques[60].

### **Les transporteurs membranaires de fer : DMT1, Nramp1, ferroportine**

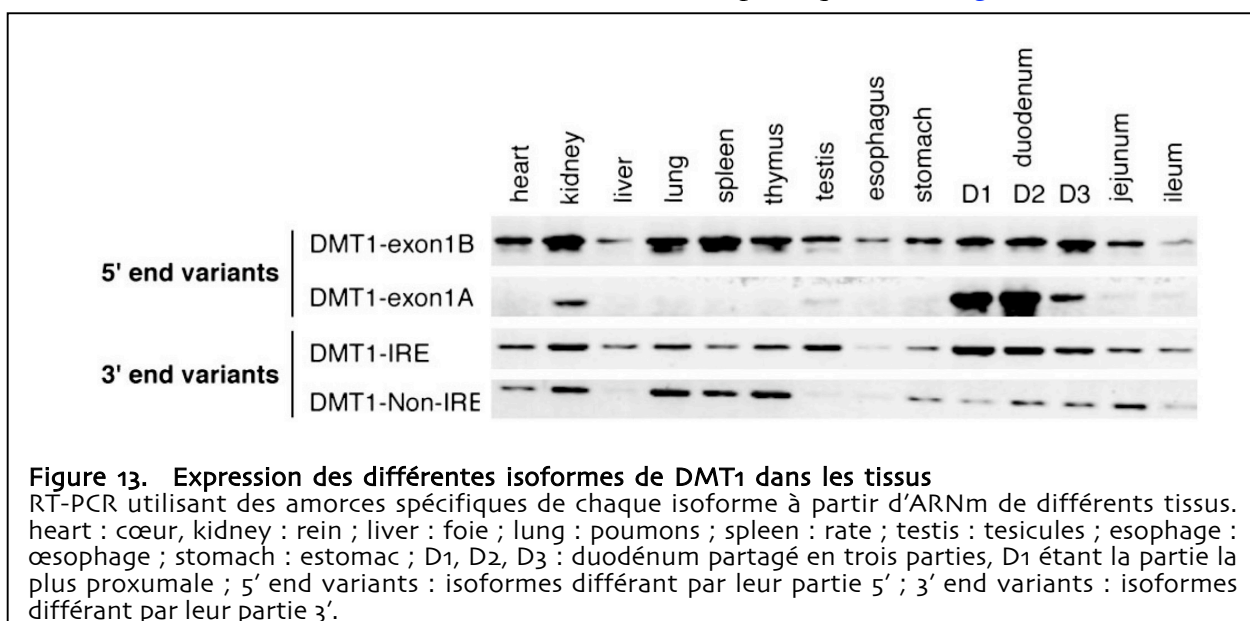
#### ◆ DMT1 (pour revue, sur DMT1 et Nramp1, voir[240])

DMT1 pour Divalent Metal Transporter 1 est appelé aussi Divalent Cation Transporter 1 (DCT1)[138], Nramp2 (Natural resistance associated macrophage protein 2[137] car il est homologue à 78% à Nramp1 (voir plus bas)) et Slc11a2 (Solute carrier family 11 de la famille des transporteurs d'ions métal divalents couplés aux protons). DMT1 est une protéine à 12 domaines transmembranaires permettant le transport d'un grand nombre de cations divalents (au moins *in vitro*) :  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , grâce à un gradient de protons. Cette protéine ne peut donc transporter le fer qu'à la faveur d'un pH acide (lumière duodénale contenant des sucs gastriques ou endosome acidifié). Elle n'est pas capable de transporter le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ce qui nécessite la présence d'une ferriréductase en amont de DMT1 (voir paragraphe sur « les ferriréductases ») car le  $\text{Fe}^{2+}$  soluble est rare car toxique.

DMT1 est un transporteur présent de façon ubiquiste, mais dont l'ARNm est présent en grande quantité dans le duodénum de souris déficientes en fer et dans le rein.

Il existe quatre isoformes de DMT1. Deux isoformes dues à la présence ou non en 3'UTR d'un Iron Responsive Element (IRE). Lorsque l'IRE est présent, l'ARNm DMT1 est soumis à une régulation post-transcriptionnelle par le fer via les IRP (Iron Regulatory Protein) : en absence de fer, l'ARNm DMT1+IRE (isoforme portant l'IRE) est stabilisé et la protéine produite en plus grande quantité (voir chapitre « Système IRP/IRE »). Les deux autres isoformes sont dues à l'utilisation d'un promoteur alternatif conduisant à la formation de premiers exons différents appelés exon 1A et exon 1B[159]. La présence de l'exon 1A, au lieu de l'exon 1B dans l'ARNm, participerait à la régulation par le fer de DMT1. Les mécanismes d'une telle régulation sont encore inconnus.

L'expression de ces quatre isoformes (DMT1 1A +IRE, DMT1 1A -IRE (isoforme sans IRE), DMT1 1B +IRE, DMT1 1B -IRE) est tissu spécifique[159] (Figure 13).



Le rôle de DMT1 a pu être mis en évidence par l'étude de mutants naturels chez la souris et le rat : la souris *mk* (pour microcytic anemia) et le rat Belgrade (*b*) présentent une anémie microcytaire hypochromique sévère et peu d'animaux survivent jusqu'au sevrage. Il a été montré que dans ces deux modèles rongeurs existe une mutation du gène codant pour DMT1 convertissant la glycine située en position 185 (en prenant la numérotation de l'isoforme 1B) en arginine (G185R)[96, 97]. La substitution G185R entraîne une mauvaise localisation de DMT1 dans l'entérocyte, DMT1 se retrouvant à l'intérieur de la cellule au lieu d'être à la surface apicale[36]. La mutation n'affecte pas seulement la fonction de DMT1 au niveau du duodénum puisque l'administration de fer parentérale ne restaure pas la déficience en fer des globules rouges montrant ainsi le rôle primordial de DMT1 dans l'acquisition du fer par les précurseurs érythroïdes (voir chapitre « L'utilisation du fer via le cycle Tf/RTf »)[115]. La création de souris KO *Slc11a2* conditionnel tissu spécifique utilisant la technique Cre/LoxP a permis de confirmer le rôle primordial de DMT1 dans l'absorption intestinale de fer et dans le cycle Tf-RTf1 des précurseurs érythroïdes[139]. En revanche, la présence d'une surcharge en fer dans ces souris indique que DMT1 n'est pas essentiel pour l'entrée du fer dans l'hépatocyte[139] et remet en cause le rôle de DMT1 dans l'acquisition du NTBI par les hépatocytes suggéré par l'équipe de D. Trinder[49, 360].

Récemment ont été décrits des patients présentant des mutations dans le gène *SLC11A2*[167, 258]. Ces patients ont une anémie sévère et, contrairement aux modèles *mk* et *Belgrade*, une surcharge tissulaire en fer. Il semble que, chez ces patients, le déficit de DMT1 au niveau duodénil soit compensé par d'autres voies d'entrée du fer (augmentation de l'absorption du fer hémique par exemple) et que l'anémie s'explique par une érythropoïèse inefficace. La surcharge en fer associée est probablement liée au stockage du fer non utilisé par les précurseurs érythroïdes. Cette hypothèse est renforcée par l'expérience de transplantation de cellules souches hématopoïétiques KO *Slc11a2* dans une souris irradiée

portant le gène sauvage : un défaut uniquement au niveau hématopoïétique suffit à reproduire à la fois l'érythropoïèse inefficace et la surcharge en fer hépatique[139].

#### ◆ Nramp1

Nramp1 (Natural resistant associated macrophage protein 1) tient son nom du fait que des souris mutées pour ce gène présentent une susceptibilité accrue aux infections par des pathogènes intracellulaires[371]. Nramp1, récemment renommée Slc11a1 (de la même famille que Nramp2 alias DMT1), est une protéine très hydrophobe de 56 kDa, formant 12 domaines transmembranaires, présente exclusivement dans les monocytes et macrophages[371]. Nramp1 est localisée dans les lysosomes et les endosomes tardifs et recrutée rapidement à la membrane des phagosomes matures. La transfection d'une lignée de macrophages dépourvue de Nramp1 endogène (lignée RAW264.7) avec des constructions portant la séquence codante de Nramp1 a permis de démontrer son rôle de transporteur de fer au niveau du phagosome[198, 414]. Ce transport pourrait se faire dans les deux sens (vers l'intérieur du phagosome ou vers le cytosol) en fonction du pH.

#### ◆ Ferroportine (pour revue, voir[252])

Découverte indépendamment par trois groupes différents, elle a hérité de trois noms différents : Ferroportin1 ou ferroportin[73], Ireg1 (Iron regulated protein 1)[249], MTP1 (Metal Transporter Protein 1)[1], pour s'appeler par la suite Slc11a3 (solute carrier family 11 member 3) et Slc40a1 (solute carrier family 40 member 1). C'est à ce jour le seul exporteur cellulaire de fer connu.

Sa topographie (de 9 à 12 domaines transmembranaires)[1, 70, 73, 232, 249, 252] et sa présence sous forme de dimère[63] ou monomère[311] sont encore sujettes à controverse. La ferroportine est retrouvée dans le duodénum à la membrane basolatérale des entérocytes[1, 73, 249], faiblement dans les hépatocytes[1, 73], dans les macrophages de la rate[1, 400], des poumons[400] et du foie[1, 73], dans le placenta[73, 249], dans le cerveau[1, 32], dans le rein[1, 73] et dans le cœur[1].

La ferroportine, comme la ferritine, porte un IRE dans la partie 5'UTR de son ARNm (voir chapitre « Système IRP/IRE »). Il a été montré, qu'in vitro cet IRE est fonctionnel dans trois lignées cellulaires : HepG2 (lignées hépatomateuse), CaCo2 (lignée de carcinome intestinal) et U937 (lignée lympho-monocytaire)[239]. Très récemment, il a été décrit, dans les cellules érythroïdes, l'existence de transcrits alternatifs de la ferroportine avec des formes ne possédant pas d'IRE. Selon les auteurs, la présence de ces formes dépourvues d'IRE pourrait expliquer l'absence de régulation de la ferroportine par le fer dans ces cellules[50].

Il semble admis que la ferroportine est produite en plus grande quantité dans un macrophage traité au fer, via une augmentation des taux d'ARNm et une augmentation de la traduction, comme attendue, par le système IRP/IRE[189, 401]. En revanche, dans le duodénum, la ferroportine semble répondre essentiellement à une régulation systémique plus qu'à un stimulus local[37, 43]. En effet, dans le duodénum, la ferroportine est augmentée et non diminuée en situation de déficience en fer[105, 249]. Cette régulation systémique de la ferroportine a été élucidée récemment par la découverte du rôle de l'hepcidine : l'hepcidine

est capable de lier la ferroportine et conduit à son internalisation et sa dégradation *ex vivo*[277]. Ces résultats ont, par la suite été reproduits par une autre équipe [77] et la diminution des taux protéiques de ferroportine par l'hepcidine a été retrouvée *in vitro* dans les macrophages[66, 190].

Le traitement de macrophages au lipopolysaccharide (LPS), entraînant une réaction inflammatoire, conduit à la diminution du taux d'ARNm codant pour la ferroportine[400]. Cette diminution de la transcription par un mécanisme encore inconnu pourrait expliquer en partie la rétention de fer dans les macrophages des patients ayant une inflammation (voir chapitre « Hpcidine et désordres du métabolisme du fer »).

Des mutations dans le gène *SLC40A1* entraînent l'apparition d'une hémochromatose adulte à transmission dominante (voir chapitre « Hémochromatose héréditaire »).

Des souris KO *Slc40a1* ont été créées en utilisant le système Cre/LoxP permettant une délétion conditionnelle du gène[74]. La délétion totale du gène codant pour la ferroportine dans tous les tissus conduit en effet à une létalité embryonnaire 7,5 jours après la conception (stade E7.5), démontrant le rôle essentiel de la ferroportine au niveau du développement. Des souris exprimant le gène *Slc40a1* uniquement dans l'endoderme extraembryonnaire et le placenta (par l'utilisation d'une souris *Meox2-Cre* qui exprime la Cre dans tous les autres organes) sont en effet viables à la naissance. Après la naissance, l'absence de ferroportine conduit à l'apparition d'une anémie ferriprive avec accumulation du fer dans les entérocytes, les macrophages et les hépatocytes. La délétion spécifique du gène dans les entérocytes conduit, elle, à une anémie ferriprive avec accumulation du fer dans le duodénum, mais le fer ne s'accumule pas dans le foie ou la rate. Cette anémie est restaurée par l'administration de fer parentérale. Cet ensemble d'expériences montre le rôle essentiel de la ferroportine comme exporteur de fer des cellules du parenchyme et des macrophages.

### **Les ferriréductases : Dcytb et Steap3**

#### ◆ Dcytb

La réductase Dcytb (Duodenal Cytochrome b ou Cybrd1) a été clonée en 2001[250]. Dcytb est une protéine membranaire présente à la surface apicale des entérocytes. Elle est également présente dans le foie et la rate[207]. Elle contient deux sites potentiels de fixation de l'hème. Elle est homologue au cytochrome b561. La quantité de Dcytb est augmentée dans le duodénum de souris anémiques (modèle *hpx*, voir paragraphe « transferrine ») et en situation d'hypoxie[250], ou de souris en régime pauvre en fer[105, 251].

Le rôle de Dcytb dans l'absorption intestinale a été récemment remis en cause par la création de souris KO pour ce gène[140]. Ces souris ne présentent en effet pas d'anémie ou de diminution des réserves en fer comme on pouvait s'y attendre et tel que l'on peut l'observer chez les animaux mutés pour le transporteur DMT1[96, 97, 139] (voir ci-dessus).

#### ◆ Steap3

Steap 3 pour Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3 (aussi appelée pHyde, TSAP6 et Dudulin2) a été identifiée par l'étude des souris mutantes *nm1504* comme

la ferriréductase endosomale impliquée dans la capture du fer après endocytose de l'holoTf. Les souris *nm1504* ont un phénotype pléiotropique (alopécie, infertilité mâle, hydrocéphalie, anémie hypochromique microcytaire) due à une large délétion génomique (41,6 Mb)[290]. Le gène responsable de l'anémie, *Steap3*, a été identifié par clonage positionnel et son rôle direct a été démontré par des expériences de restauration de l'anémie des souris *nm1504* par l'apport de *Steap3* sauvage[291]. Cette protéine est une protéine transmembranaire contenant deux histidines capables de lier une molécule d'hème et elle possède une activité ferriréductase NAD(P)H dépendante. Elle est synthétisée dans les tissus hématopoïétiques et dans le foie adulte. Dans le foie des souris *nm1504*, le déficit en *Steap3* est probablement compensé par d'autres réductases.

### **Les ferroxidases : la céruloplasmine et l'héphaestine**

#### ◆ Céruloplasmine (CP, pour revue, voir[150])

La céruloplasmine est une ferroxidase circulante produite par le foie. La CP circulante facilite, par sa fonction d'oxydation du fer, la sortie du fer des cellules. Purifiée en 1948 par Holmberg et Laurell, la céruloplasmine est une protéine de couleur bleu ciel (« caeruloplasmine » vient de caeruleus, bleu ciel en latin) présentant une activité p-phenylenediamine oxydase. Sa couleur vient des trois atomes de cuivre qu'elle contient essentiels à son activité ferroxidase. Cette activité n'a été reconnue qu'en 1960 par l'équipe de Curzon[58] puis par celle de Osaki, Johnson et Frieden[293]. La demi-vie de la CP est de 5,5 jours dans le sang.

Dans l'hépatocyte, deux transcrits de 3,7 et 4,2 kb sont issus du gène codant pour la céruloplasmine (Figure 14) et sont ensuite traduits pour former la protéine de 1046 acides aminés sécrétée dans le sang. Les sources extrahépatiques de CP sont moins abondantes, il s'agit de la rate et des poumons. De plus, dans le cerveau et les testicules, la CP est produite sous une forme ancrée à la membrane par un groupement GPI[103, 303]. Cette forme de CP pourrait jouer un rôle dans le transport du fer à travers les barrières séparant le compartiment sanguin du cerveau et des cellules germinales. La CP est également détectable dans le sac vitellin et le foie fœtal.

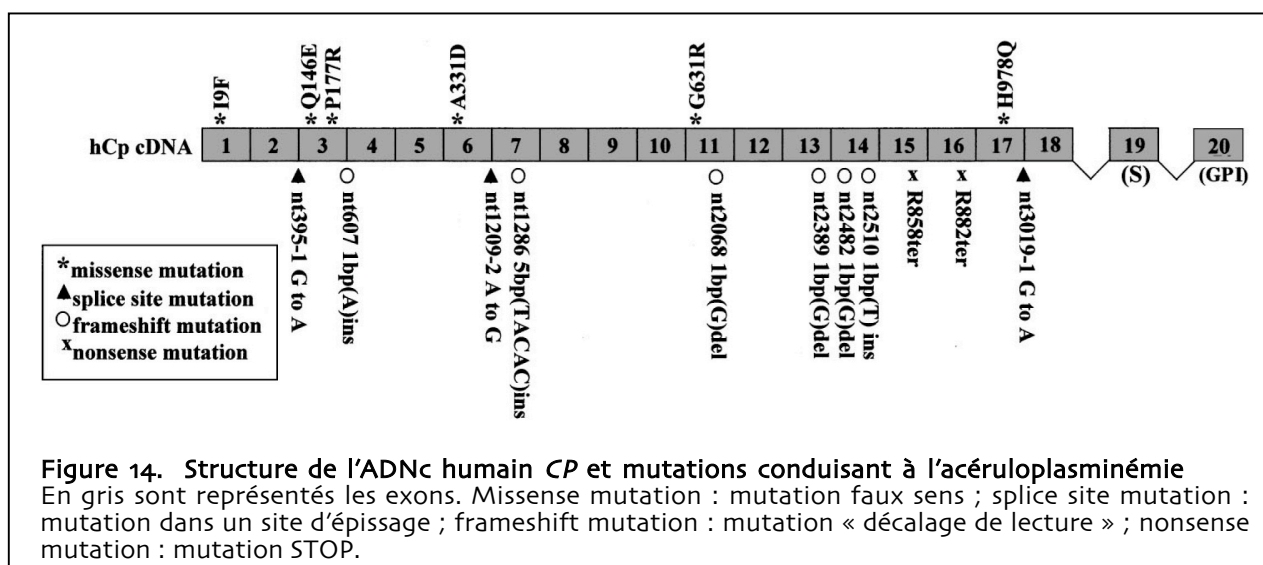
Il a été décrit l'existence possible de récepteurs de la CP sur l'endothélium hépatique[350] et les cellules de Kupffer[72]. La nature et le rôle exacts de ces récepteurs restent néanmoins à définir. Ces récepteurs pourraient être impliqués dans la clairance de la CP.

Le taux sérique de CP est augmenté lors d'une inflammation suite à l'augmentation de la transcription du gène dans les hépatocytes, la CP est à ce titre une protéine de la phase aiguë de l'inflammation[125]. La synthèse de CP est également augmentée par les oestrogènes. La présence d'un élément de réponse à HIF dans le promoteur du gène indique que la CP est induite en situation d'hypoxie (voir note de bas de page n°5)[271].

Des faibles taux de CP sont détectés chez des patients atteints de la maladie de Wilson[337]. Cette maladie est due à une mutation dans le gène codant pour une ATPase responsable du transport du cuivre dans le réseau Golgi (*ATP7B*, OMIM n°277900). En

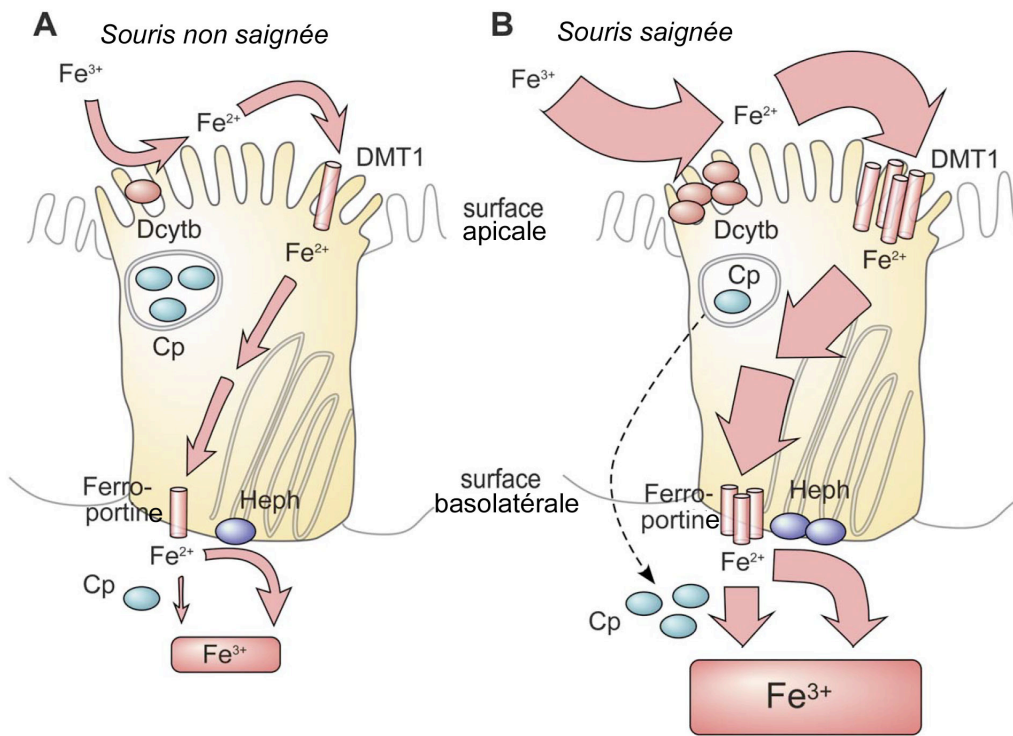
absence de cette ATPase, le cuivre ne peut être incorporé dans la CP. Il en résulte une accumulation du cuivre dans le foie et le cerveau conduisant à l'apparition de cirrhose et de troubles neurologiques. Les dépôts de cuivre au niveau de l'œil se manifestent par la présence d'anneaux dits de Kayser-Fleischer sur la cornée.

L'absence de CP circulante détectable, ou acéruplasminémie (OMIM n°604290, voir revue[262]), est une maladie rare à transmission autosomique récessive due à des mutations dans le gène *CP* (Figure 14) et qui a pour conséquence une dégénérescence de la rétine, des troubles neurologiques (ataxie, dysarthrie), le déclenchement d'un diabète et une accumulation de fer dans le cerveau (tronc cérébral, cervelet, rétine), le pancréas et le foie (dans les macrophages et les hépatocytes). Il est à noter que, contrairement aux patients atteints d'hémochromatose, la surcharge martiale dans le foie des patients atteints d'acéruplasminémie n'est pas associée à une dysfonction hépatique (absence de fibrose).



L'absence de céruloplasmine par délétion génétique chez la souris entraîne l'accumulation du fer dans les hépatocytes et les macrophages, confirmant le rôle essentiel de la CP pour l'export du fer de ces cellules[144, 304, 398]. Dans les souris KO *Cp*, l'accumulation de fer dans le cerveau, caractéristique de l'acéruplasminémie, est présente[304] ou non[144] selon le fond génétique des souris (C57BL/6J ou black Swiss-Webster).

Récemment, l'hypothèse d'un rôle de la céruloplasmine dans l'absorption intestinale de fer en situation d'anémie a été proposée par l'étude de souris KO *Cp* ayant subi des saignées[46]. De façon surprenante, ces souris parviennent à relarguer du fer du foie et de la rate en absence de *Cp*, remettant en question la dépendance à la CP pour l'export du fer des hépatocytes et des macrophages[46]. Enfin, ces souris ne sont pas capables de restaurer leur taux d'hémoglobine malgré le relargage du fer par le foie et la rate[46]. Les auteurs proposent un rôle de la *Cp* au niveau de l'export de fer des entérocytes dans ces souris dont les besoins en fer pour l'érythropoïèse sont augmentés par les phlébotomies. Dans les entérocytes qui n'expriment pas le gène *Cp*, la céruloplasmine serait captée de la circulation vers l'intérieur de l'entérocyte et réexportée à la lamina propria après saignée pour permettre au fer de sortir (Figure 15).

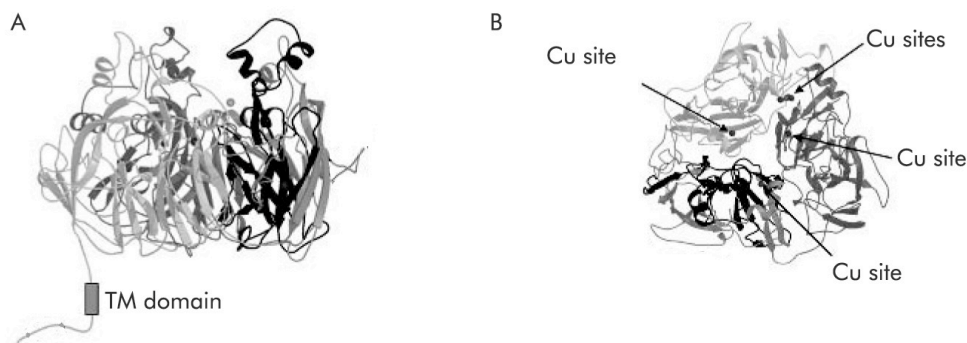


**Figure 15. Schéma du rôle potentiel de la Cp dans l'absorption intestinale après phlébotomie**

A. Dans une souris normale, l'oxydation du fer, après export par la ferroportine, se fait essentiellement par l'héphaestine présente à la membrane basolatérale de l'entérocyte. Les entérocytes seraient capables de capturer la Cp circulante et de la stocker dans un pool intracellulaire.  
 B. Après phlébotomie, l'absorption intestinale de fer est augmentée et le pool intracellulaire de céruloplasmine est utilisé, la Cp exportée vers la base de l'entérocyte pour augmenter la capacité de l'entérocyte à exporter son fer.

◆ Héphaestine (pour revue, voir[7])

L'héphaestine est une protéine homologue à la céruloplasmine mais, elle n'est pas sécrétée, elle est intégrée à la membrane plasmique : elle possède un passage membranaire en position C terminale[373] (Figure 16). Son nom vient du dieu grec Héphaïstos, dieu de la forge.



**Figure 16. Représentation schématique de la structure moléculaire de l'héphaestine murine**

A. Vue latérale.

B. Vue du dessus. En noir est figurée la région délétée chez les souris *sla*. TM domain : domaine transmembranaire ; Cu site : domaine de liaison aux atomes de cuivre.

Le gène codant pour l'héphaestine (*Heph*), porté par le chromosome X, est fortement exprimé dans l'intestin grêle et faiblement dans le colon. Il est faiblement exprimé dans le



cerveau, la rate, les poumons et le placenta[104, 373]. L'héphaestine n'est pas présente dans les cellules de la crypte, et, dans l'entérocyte, la protéine héphaestine est localisée dans un compartiment supranucléaire qui pourrait servir de réserve[104] et à la membrane basolatérale[201]. À la membrane basolatérale, elle permettrait l'oxydation du fer exporté par la ferroportine et ainsi la fixation du fer oxydé à la Tf.

La découverte de l'héphaestine s'est faite par l'étude de souris *sla* (pour sex linked anemia), mutation apparue après irradiation[373] (Figure 16). Ces souris présentent une anémie ferriprive associée à une surcharge en fer des entérocytes. L'étude génétique de ces souris a montré que le gène *Heph* est délété de 582 bases conduisant à la production d'une protéine tronquée[373]. Cette protéine tronquée, n'est plus présente à la membrane basolatérale de l'entérocyte mais uniquement dans le compartiment intracellulaire supranucléaire[201].

L'héphaestine, comme la ferroportine, semble être régulée au niveau protéique par un stimulus systémique plutôt que par les quantités de fer intracellulaires[43]. Elle ne possède pas d'IRE dans son ARNm. Dans la souris *sla*, qui est anémique et dont les entérocytes sont surchargés en fer, l'héphaestine est augmentée[43, 373] comme chez les souris en régime pauvre en fer[44, 104] alors que des souris traitées par un régime riche en fer expriment autant le gène *Heph* que des souris contrôles[43].

Aucune mutation dans le gène *HEPH* n'a été décrite à ce jour chez des patients atteints d'anémie ferriprive sévère.

### Transport de l'hème : l'haptoglobine, l'hémopexine, HCP1 et FLVCR

#### ◆ Haptoglobine

L'haptoglobine est une protéine de la réponse inflammatoire aiguë. Elle est synthétisée par le foie et induite par des cytokines telles l'IL-6, l'IL-1 et le tumour necrosis factor (TNF). C'est une  $\alpha$ 2-sialoglycoprotéine composée d'une chaîne clivée en deux chaînes, la chaîne  $\alpha$  amino-terminale et la chaîne  $\beta$  carboxy-terminale. Il existe deux formes majeures de chaînes  $\alpha$ :  $\alpha^1$  et  $\alpha^2$ . La fréquence de l'allèle codant pour la chaîne  $\alpha^1$  est variable selon les populations. La chaîne  $\alpha^2$  est capable de se multimériser entraînant l'existence d'un nombre variable de formes d'haptoglobine chez les personnes portant cet allèle. Il existe donc un polymorphisme conduisant à différents phénotypes d'haptoglobine (Tableau 3).

Génotype :	Hp1-1 ( $\alpha^1/\alpha^1$ )	Hp2-1 ( $\alpha^2/\alpha^1$ )	Hp2-2 ( $\alpha^2/\alpha^2$ )
	$(\alpha^1\beta)_2$	$(\alpha^1\beta)_2$ $(\alpha^1\beta)_2 + (\alpha^2\beta)_n$ $n = 0, 1, 2, \dots$	$(\alpha^2\beta)_n$ $n = 0, 1, 2, \dots$

Tableau 3. Les différentes formes d'haptoglobine en fonction du génotype chez l'homme



L'haptoglobine a pour fonction de complexer l'hémoglobine circulante car l'hémoglobine libre, comme le fer libre, est très réactive et entraîne la formation de radicaux libres et la peroxydation des lipides. L'haptoglobine, contrairement à la transferrine ou l'hémopexine, n'est pas recyclée mais dégradée après endocytose.

Il semble que les formes d'haptoglobine Hp2-2 ont une capacité diminuée de liaison à l'hémoglobine (due à une concentration plasmatique plus faible en Hp), mais qu'elles se lient avec une meilleure affinité à leur récepteur CD163 (due à la multivalence des formes Hp2-2) (voir ci-dessous). Outre sa fonction de liaison à l'hémoglobine, l'haptoglobine est également capable d'agir en tant qu'agent bactériostatique, d'inhiber la synthèse de prostaglandines et l'angiogénèse (voir la revue[365]). Les souris déficientes en haptoglobine[229], présentent une accumulation de fer dans le rein (probablement liée au captage de l'hémoglobine libre par le récepteur mégaline-cubiline) avec l'âge. Lorsque les souris KO haptoglobine sont traitées par un agent hémolytique, la phénylhydrazine (PHZ), la survie des souris est diminuée, et le stress oxydant augmenté par l'absence d'haptoglobine. Ainsi ces expériences montrent le rôle essentiel de l'haptoglobine pour complexer l'hémoglobine et éviter les dommages liés à cette hémoglobine libre.

Le récepteur de l'haptoglobine a récemment été cloné[197], il s'agit d'un récepteur de la famille SRCR (Scavenger Receptor Cystein Rich), appelé CD163. Le gène codant pour le récepteur de l'haptoglobine est exprimé uniquement par les monocytes et les macrophages tissulaires. Il ne semble pas être exprimé par les hépatocytes, posant la question du mode d'acquisition du complexe haptoglobine-hémoglobine par ces cellules. Le CD163 est induit, comme l'haptoglobine par l'IL-6 mais également par l'IL-10 et les glucocorticoïdes. La protéine est en revanche produite en moins grande quantité lorsqu'on mime l'inflammation par traitement des macrophages au LPS et l'IFN $\gamma$ . Ce récepteur n'est pas capable de lier l'haptoglobine ou l'hémoglobine libre, ce qui explique qu'en absence d'haptoglobine, l'hémoglobine soit anormalement distribuée dans les tissus (voir revue[132]).

#### ◆ Hémopexine

L'hémopexine, comme l'haptoglobine, est une protéine inflammatoire de phase aiguë. C'est une glycoprotéine protéine plasmatique de 60kDa synthétisée par le foie composée d'une seule chaîne polypeptidique de 439 acides aminés. Son affinité pour l'hème est très forte, la plus forte des protéines plasmatiques. Le complexe hémopexine-hème est reconnu par un récepteur spécifique produit principalement par les hépatocytes. Après endocytose et catabolisme de l'hème, l'hémopexine et son récepteur sont recyclés (voir revue[356]).

#### ◆ HCP1

HCP1 (Heme Carrier Protein 1) a été identifié très récemment l'équipe d'A. McKie par hybridation soustractive faite à partir d'ARN de duodénum et d'iléon de souris *hpx* (voir paragraphe sur la Tf) comme un récepteur de l'hème spécifique situé à la membrane apicale

de l'entérocyte[341]<sup>8</sup>. En effet, le gène *Hcp1* est exprimé dans les entérocytes de l'intestin grêle, mais il n'est pas exprimé dans l'iléon, ce qui a permis son identification. HCP1 qui est détectée à la membrane apicale des entérocytes, aurait 9 domaines transmembranaires. La protéine HCP1 est homologue aux transporteurs bactériens des tétracyclines métalliques à 12 domaines transmembranaires. Cette homologie est probablement liée à la similarité de structure entre l'hème et la tétracycline. La surexpression d'*HCP1* augmente l'acquisition d'hème par les cellules de façon dépendante de la température et saturable. Ce transport d'hème est aboli par traitement des cellules avec des siRNA dirigés contre HCP1. Enfin, les taux d'ARNm *Hcp1* seraient augmentés chez des souris en hypoxie[341].

#### ◆ FLVCR

Le récepteur FLVCR (pour Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor) est utilisé par un virus qui provoque une aplasie des GR chez les félins, avec absence de CFU-E et de progéniteurs érythroïdes. Cette protéine est présente à la surface des progéniteurs érythroïdes, mais l'expression de son gène est réprimée dans la phase terminale de l'érythropoïèse. Cette perméase a été identifiée très récemment comme permettant l'export de l'hème des progéniteurs érythroïdes[316]. Le traitement d'une lignée érythroïde (cellules K562) par des anticorps bloquants dirigés contre FLVCR a montré que la présence de FLVCR est essentielle à la différenciation de cette lignée[316]. Le rôle de FLVCR dans les progéniteurs érythroïdes n'est pas complètement connu, mais il pourrait agir pour prévenir l'accumulation toxique d'hème. La forte expression du gène codant pour cet exporteur de l'hème dans des lignées cellulaires intestinale (CaCo2) et hépatique (HepG2) laisse à supposer qu'il pourrait jouer un rôle dans ces types cellulaires[316].

#### **L'hème oxygénase (HO) : enzyme de dégradation de l'hème**

L'hème oxygénase est une enzyme membranaire qui permet de dégrader l'hème en monoxyde de carbone (CO), en fer ( $Fe^{2+}$ ) et biliverdine. Il existe trois isoformes d'hème oxygénase. L'hème-oxygénase 2 (HO-2) est constitutivement active et présente de façon majoritaire dans tous les organes sauf dans la rate. Produite en grande quantité dans le cerveau, elle semble jouer un rôle important de protection des neurones contre le stress oxydant et le CO produit par la dégradation de l'hème sert de neurotransmetteur. Ainsi, une déficience en HO-2 chez la souris entraîne d'importantes anomalies du système nerveux central et périphérique[406]. L'hème-oxygénase 3 (HO-3) ne semble pas avoir d'activité catalytique. C'est donc l'hème-oxygénase 1 (HO-1) présente en grande quantité dans le macrophage qui participe à l'érythrophagocytose (voir plus haut)[83]. Elle est induite au cours de l'EP, par l'hème et également par le stress cellulaire. Des souris KO *HO-1* présentent ainsi une accumulation de fer dans le macrophage[315]. Yachie *et al.* rapportent qu'une déficience en HO-1 chez un garçon de 6 ans est associée à un retard de croissance et une anémie hémolytique sévères. Le rein et le foie de ce patient est surchargé en fer[396].

---

<sup>8</sup> HCP1 est la dernière molécule identifiée par cette équipe par l'hybridation soustractive d'ADNc d'intestin de souris *hpx*. Cette méthode a permis à l'équipe d'A. McKie d'identifier deux autres molécules impliquées dans l'absorption intestinale du fer : Dcytb et la ferroportine.

## Mégaline-cubiline

(pour revues, voir[194, 367, 368])

La cubiline est une protéine de 460 kDa sans domaine transmembranaire capable de se lier à la vitamine B12 dans l'intestin, l'ApoA1, l'HDL et l'albumine dans le rein et le sac vitellin. Elle a également pour ligand la transferrine et l'hémoglobine dans le rein (Tableau 4). L'affinité de la cubiline est la même pour l'apo- et l'holoTf. La cubiline interagit avec la mégaline qui peut, elle aussi, se lier à d'autres molécules (Tableau 4). La mégaline, par son domaine transmembranaire, permet l'ancrage à la membrane du complexe mégaline-cubiline-ligand puis son internalisation.

CUBILINE	MÉGALINE
<b>Transporteurs sériques</b>	
Facteur intrinsèque gastrique/vitamine B <sub>12</sub>	Retinol binding protein/vitamine A
Transferrine/Fer	Transcobalamine II/vitamine B <sub>12</sub>
DBP (vitamin D-binding protein)/vitamine D	DBP/vitamine D
<b>Lipoprotéines</b>	
Apolipoprotéine AI (ApoA1) et HDL (high density lipoprotein)	Apo B, Apo E, Apo J
<b>Autres protéines</b>	
Albumine	Albumine
Receptor associated protein	Receptor associated protein
Chaînes légères des immunoglobulines	Chaînes légères des immunoglobulines
Hémoglobine	Hémoglobine
Clara cell secretory protein	
<b>Médicaments ou toxines</b>	
Aminoglycosides	Aminoglycosides Trichosantine

Tableau 4. Principaux ligands de la cubiline et de la mégaline.

Alors que la présence de la mégaline est détectée dans plusieurs cellules épithéliales, la cubiline est retrouvée dans un nombre plus restreint d'organes (intestin grêle, sac vitellin, cytotrophoblaste, tubule proximal du rein). Ce complexe serait responsable de la clairance de l'hémoglobine libre du sang vers le rein lors d'une hémolyse.

Le complexe mégaline-cubiline est retrouvé à la surface apicale du tubule proximal dans le rein. Des souris KO mégaline présentent une accumulation de la Tf liée à la cubiline à la surface apicale des tubules rénaux[394]. Une fois prise en charge par la mégaline-cubiline, la Tf n'est pas recyclée comme après liaison à RTf mais dégradée dans les lysosomes.

## IRP (Iron Regulatory Protein) 1 et IRP2

(pour revue, voir [82])

Chez les mammifères, deux protéines IRP ont été identifiées. IRP1 aussi appelée aconitase cytosolique 1 (ACO1) possède un complexe fer-soufre (Fe-S). IRP2 (ou IREB2 pour IRE-Binding protein 2) est homologue à 79% à IRP1, mais ne possède pas d'activité aconitase ni de complexe Fe-S.

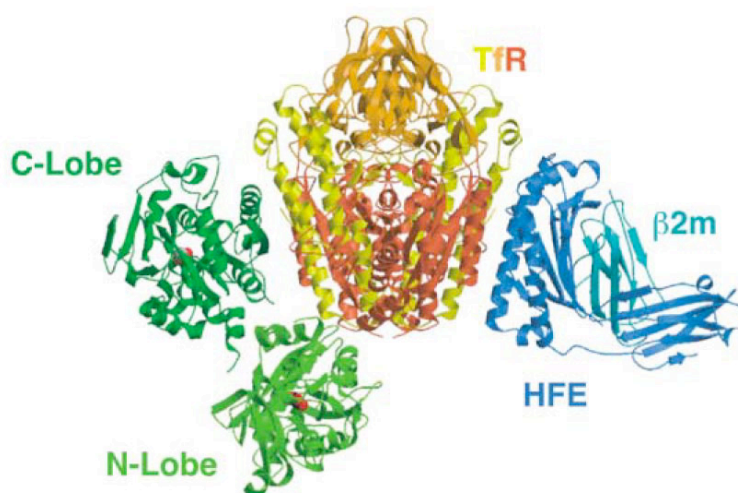
Ces protéines reconnaissent des éléments de régulation présents en 5' ou 3' UTR de l'ARNm de leurs gènes cibles (TfR1, DMT1, ferritines H et L, ferroportine, eALAS, aconitase mitochondriale). L'interaction des IRP avec un IRE en 5'UTR empêche la traduction de l'ARNm alors que l'interaction des IRP avec un IRE situé en 3' UTR stabilise l'ARNm. Quand le fer est abondant dans la cellule le complexe Fe-S d'IRP1 peut se former et IRP1 a alors une activité aconitase. Lorsque le fer vient à manquer le complexe est déstabilisé et la protéine acquiert une activité de liaison aux IRE. En présence de fer ou d'hème, IRP2 est dégradée par le protéasome (voir chapitre « Système IRP/IRE ») (Figure 26).

Outre le fer, des expériences *in vitro* ont montré que les IRP sont sensibles à l'hypoxie, au stress oxydant et à des stimuli inflammatoires suggérant un rôle plus large que celui de régulateurs du métabolisme du fer (voir revues[82, 151]).

L'absence totale d'IRP chez la souris (souris *Irp1*<sup>-/-</sup> *Irp2*<sup>-/-</sup>) provoque une létalité embryonnaire montrant le rôle essentiel des IRP dans le développement embryonnaire[345]. Les souris *Irp2*<sup>-/-</sup> exprimant seulement le gène *Irp1* présentent une anémie microcytaire modérée et une distribution altérée du fer dans les organes, probablement due à une diminution des taux de TfR1 et une augmentation de la ferritine par perte de régulation post-transcriptionnelle dans les précurseurs érythroïdes[52, 112]. Il a également été décrit dans un modèle *Irp2*<sup>-/-</sup> une atteinte cérébrale due à une accumulation de fer dans le cerveau chez ces souris[209], mais ce phénotype n'est pas reproduit dans un autre modèle d'inactivation du gène *Irp2*[111, 152]. Les souris *Irp1*<sup>-/-</sup> n'ont pas de phénotype détectable laissant supposer qu'IRP2 est capable de compenser pour la fonction d'IRP1 en conditions physiologiques[255].

## HFE

Le gène *HFE* est situé sur le chromosome 6 en position p22.2. Il code pour une protéine membranaire atypique de la famille des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Comme toutes les protéines du CMH I, HFE a besoin de se lier à la  $\beta$ 2-microglobuline pour se replier correctement et pour se retrouver à la surface des cellules. Mais il semble, d'après sa structure tridimensionnelle, qu'elle soit incapable de présenter un peptide comme les autres molécules du CMH I[213]. La protéine HFE est également capable de se lier à RTf1 et interfère entre la liaison de RTf1 et Tf-Fe<sub>2</sub>[122, 333] (Figure 17), mais le rôle fonctionnel de cette interaction au niveau de la captation du fer reste très controversé[38].



**Figure 17. Diagramme en ruban représentant le complexe HFE-β2m-RTf1-Tf**

En vert est figurée la Tf et ses deux lobes N terminal et C terminal ; en jaune-rouge-orange, RTf1 ; en bleu HFE ; en bleu clair la β2-microglobuline. Les parties hydrophobes membranaires ne sont pas représentées.

L'ARNm du gène *HFE* est présent en grande quantité dans l'intestin grêle et dans le foie[87, 147, 156, 407], il est faiblement détecté dans les tissus lymphoïdes[87, 147, 156]. La protéine est retrouvée dans les cryptes des villosités duodénales, colocalisant avec RTf1[375]. Dans le foie, on pensait pendant un certain temps que la présence de la protéine HFE était restreinte aux cellules de Kupffer et aux cellules épithéliales biliaires[134, 301] puis, probablement suite à la production de meilleurs anticorps, il est maintenant admis que HFE est également présente dans les hépatocytes[156, 407]. Enfin, dans le placenta, HFE colocalise avec RTf1 à la membrane apicale des syncytiotrophoblastes, mais le rôle de HFE dans le placenta reste à déterminer[300].

Aujourd'hui, même si le rôle de la protéine HFE n'est pas encore complètement établi, on pourra retenir que l'activité de la protéine est complexe et dépendante du type cellulaire. Dans les cellules qui n'exportent pas le fer (HeLa, HEK293) la surexpression de *HFE* entraîne une diminution du fer intracellulaire par diminution de l'entrée du fer (compétition avec l'holoTf pour la fixation avec le RTf1)[76, 89, 318, 333]. À l'inverse, dans les cellules qui exportent naturellement le fer via l'exporteur ferroportine (lignée HT29 de type duodénale[62], macrophages ou lignée THP-1 de type macrophagique[76, 265]), la surexpression de *HFE* augmente le pool intracellulaire de fer en inhibant l'export du fer. Ce rôle de HFE serait indépendant de sa liaison avec RTf1.

Des mutations de ce gène, empêchant la liaison de HFE avec la β2-microglobuline et la présence de HFE à la surface cellulaire, sont à l'origine de l'hémochromatose héréditaire, maladie de surcharge martiale multiviscérale (voir chapitre « Hémochromatose héréditaire »). Ce rôle dans l'hémochromatose héréditaire a été confirmé par la génération de souris KO *Hfe* et de souris KI (knock-in) portant la mutation C282Y impliquée dans 80% des cas d'hémochromatose héréditaire. Ces souris reproduisent en effet toutes les caractéristiques de la maladie humaine exceptées les complications hépatiques (fibrose, cirrhose, hépatocarcinome)[16, 153, 224, 410]. Il est en effet connu que la souris est une espèce résistante à la carcinogenèse du foie[90].

## Hémojuvéline (HJV, RGMc)

L'étude par clonage positionnel d'une forme sévère de l'hémochromatose, l'hémochromatose juvénile (voir aussi chapitre « hémochromatose juvénile »), a permis l'identification en 2003 de l'hémojuvéline. Le gène *HJV* (également appelé *HFE2*), qui code pour cette protéine a une longueur de 4,3 kb et est situé en position 1q21. Par le jeu d'épissages alternatifs, le gène *HJV* est à l'origine de cinq ADNc différant par leur partie 5'.

La séquence protéique de l'hémojuvéline contient un peptide signal, un motif RGD (motif retrouvé dans les protéines de l'adhésion), un domaine partiel de type VanWillebrand Factor et un domaine transmembranaire. Cette protéine appartient à la famille des Repulsive Guidance Molecule (RGM). À ce titre, elle est également appelée RGMc[297]. Il existe deux autres protéines de cette famille chez l'homme, RGMa et RGMb, ces molécules jouent un rôle important dans le contrôle de la fermeture du tube neural et du développement de la rétine lors de l'embryogenèse[264, 286].

L'ARNm codant pour l'hémojuvéline est présent en grandes quantités dans le muscle squelettique, le foie fœtal, le foie adulte et le cœur[297]. L'insertion d'une cassette LacZ dans l'exon 2 du gène murin *Hjv* a permis de montrer que, dans le foie, l'ARNm *Hjv* semble être exprimé dans les hépatocytes périportaux[287]. La présence de la protéine hémojuvéline dans les différents tissus n'a fait l'objet que d'une étude ne confirmant pas la présence de la protéine aux sites d'expression du gène[323].

Les niveaux d'ARNm *Hjv* chez la souris semblent insensibles au traitement par le fer et par l'érythropoïétine, mais ils sont diminués par une inflammation induite par le LPS[196].

L'hémochromatose juvénile liée à une absence d'HJV a été reproduite grâce à la création de modèles murins KO *Hjv*[158, 287]. Ces souris déficientes en hémojuvéline présentent, comme attendu, une surcharge en fer massive dans le foie et divers organes à l'exception de la rate, mais les modèles murins ne semblent pas développer les mêmes complications endocriniennes et cardiaques retrouvées chez les patients (voir chapitre « hémochromatose juvénile »).

Comme les autres protéines de la famille RGM, l'hémojuvéline membranaire serait capable d'interagir avec la néogénine[408]. La néogénine est une protéine membranaire dont le gène est exprimé de façon ubiquiste et qui fait partie de la famille DCC (Deleted in Colorectal Cancer)[181] impliquée dans la morphogenèse de l'épithélium de la glande mammaire, du tube neural et dans la formation des somites (pour revue sur néogénine et RGM voir[245]). Zhang *et al.* [408] ont montré que l'interaction d'HJV avec la néogénine pouvait augmenter l'entrée de fer à l'intérieur de cellules transfectées par des vecteurs portant les séquences codantes pour ces protéines. De plus, lorsque HJV présente la mutation G320V, celle-ci n'est plus capable d'interagir avec la néogénine et les auteurs ne retrouvent plus les modifications du fer intracellulaires observées avec l'HJV sauvage[408].

Le rôle exact de l'hémojuvéline est encore peu connu mais la diminution voire l'absence d'hepcidine dans les cas de déficience en hémojuvéline associée à la surcharge en

fer, fait penser qu'elle serait impliquée dans la régulation de l'hepcidine par le fer dans le foie (voir chapitre « Hpcidine et désordres du métabolisme du fer »).

Une étude récente a permis d'identifier un site d'autoclivage dans le domaine RGM de la protéine séparant ainsi une forme soluble qui pourrait être sécrétée d'une forme membranaire[408]. Des travaux menés par l'équipe de T. Ganz en collaboration avec la société Xenon genetics ont mis en évidence un rôle majeur de cette forme soluble d'HJV dans la régulation de l'hepcidine[230]. Dans un premier temps, l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre l'hémojuvéline sur une lignée hépatocytaire et l'étude de l'expression du gène endogène de l'hepcidine a permis de montrer que l'hémojuvéline a un rôle de régulation positif sur ce gène. En effet, la déplétion en hémojuvéline par les siRNA entraîne une diminution du taux d'ARNm hepcidine confirmant les résultats obtenus dans les souris KO. Ensuite, l'analyse par western blot des lysats cellulaires versus le milieu d'incubation a montré qu'il existe bien deux formes, une membranaire et une soluble de l'hémojuvéline. Les auteurs ont retrouvé la présence de la forme soluble d'hémojuvéline dans le sérum de volontaires sains et cette forme soluble est présente en moins grande quantité dans le milieu de culture de cellules traitées au fer. Enfin, le traitement d'hépatocytes par cette forme soluble d'hémojuvéline montre que, contrairement à la forme membranaire, elle est capable de réprimer l'expression du gène hepcidine. Les auteurs de cet article pensent tirer avantage de cette découverte en utilisant à l'avenir cette forme soluble d'hémojuvéline comme répresseur de l'hepcidine dans des situations où celle-ci est trop synthétisée comme dans l'anémie inflammatoire (voir chapitre « Hpcidine et désordres du métabolisme du fer »).



nom du gène	modèle murin phénotype	maladie humaine phénotype
<b>β2-micro-globuline</b>	Souris KO <i>β2m</i> [64] Surcharge en fer	
<b>céruloplasmine</b>	Souris KO <i>Cp</i> [144, 398] Surcharge en fer multiviscérale lente	<b>Acéruoplasminémie</b> [261] OMIM n° 604290 Troubles neurologiques, diabète, surcharge en fer
<b>Dcytb</b>	Souris KO <i>Cybrd1</i> [140] Pas de phénotype évident	
<b>DMT1</b>	Souris <i>mk</i> [96], souris KO <i>Slc11a2</i> [139], rat <i>Belgrade</i> [97] Anémie hypochrome microcytaire	<b>Mutation du gène <i>SLC11A2</i></b> [258] OMIM n° 206100 Anémie hypochrome microcytaire
<b>ferritine H</b>	Souris KO <i>FtH</i> [91] Létalité embryonnaire	<b>Mutation ferritine H</b> [176] OMIM n° 134770 Surcharge en fer
<b>ferritine L</b>		<b>Syndrome hyperferritinémie-cataracte</b> [18, 123] OMIM n° 134790 Cataracte, pas de surcharge en fer <b>Neuroferritinopathie</b> [57] OMIM n° 606159 Troubles neurologiques, surcharge en fer cérébrale
<b>ferroportine</b>	Souris KO <i>Slc40a1</i> [74] KO total : létalité embryonnaire KO dans l'intestin : anémie ferriprive avec rétention de fer dans l'intestin	<b>Hémochromatose type 4</b> [266, 288] OMIM n° 606069 Surcharge en fer multiviscérale, faible tolérance aux phlébotomies
<b>haptoglobine</b>	Souris KO haptoglobine[229] Diminution de la viabilité et sensibilité accrue au stress oxydant	
<b>hème-oxygénase 1</b>	Souris KO <i>HO-1</i> [315, 405] Anémie ferriprive et surcharge en fer hépatique et rénale Souris surexpression <i>HO-1</i> poumons[259] Protection contre l'hypoxie	<b>Déficiences en HO-1</b> [396] OMIM n° 141250 Retard de croissance et anémie hémolytique sévères
<b>hémouvéline</b>	Souris KO <i>Hjv</i> [158, 287] Surcharge en fer multiviscérale sévère épargnant les macrophages	<b>Hémochromatose juvénile</b> [297] OMIM n° 608374 Surcharge en fer multiviscérale sévère épargnant les macrophages, atteintes cardiaques et endocriniennes
<b>hémopexine</b>	Souris KO hémopexine[355] Sensibilité accrue à l'hémolyse	
<b>hepcidine</b>	Souris KO <i>Usf2</i> [280], souris KO <i>Hepc1</i> [218] (voir « Résultats complémentaires ») Surcharge sévère multiviscérale épargnant les macrophages Souris TTR- <i>Hepc1</i> [281], Souris Tet ON <i>Hepc1</i> (voir « Article 3 ») Anémie hypochrome microcytaire Souris TTR- <i>Hepc2</i> [234] Pas de phénotype	<b>Hémochromatose juvénile</b> [329] OMIM n° 606464 Surcharge en fer multiviscérale sévère épargnant les macrophages, atteintes cardiaques et endocriniennes
<b>héphaestine</b>	Souris <i>sla</i> [373] Anémie hypochrome microcytaire avec surcharge en fer des entérocytes	
<b>HFE</b>	Souris KO <i>Hfe</i> [16, 153, 224, 410], souris KI <i>Hfe</i> [224] Surcharge multiviscérale épargnant les macrophages	<b>Hémochromatose classique</b> [87] OMIM n° 235200 Surcharge multiviscérale épargnant les macrophages
<b>IRP1</b>	Souris KO <i>Irp1</i> [255], souris KO <i>Irp1</i> conditionnel[110] Pas de phénotype	
<b>IRP2</b>	Souris KO <i>Irp2</i> [209], souris KO <i>Irp2</i> conditionnel[110] Anémie microcytaire	
<b>RTf1</b>	Souris KO <i>Tfr1</i> [223] létalité embryonnaire	
<b>RTf2</b>	Souris KI <i>Tfr2</i> [99], souris KO <i>Tfr2</i> [381] Surcharge en fer multiviscérale épargnant les macrophages	<b>Hémochromatose classique</b> [35] OMIM n° 604720 Surcharge multiviscérale épargnant les macrophages
<b>transferrine</b>	Souris <i>hpx</i> [161] Anémie et surcharge tissulaire en fer	<b>Atransferrinémie</b> [149] OMIM n° 209300 Anémie et surcharge tissulaire en fer

Tableau 5. Modèles murins et maladies humaines liés à des mutations dans les gènes impliqués dans le métabolisme du fer.

### 3) L'hepcidine: découverte, structure et régulation

#### Découverte de l'hepcidine

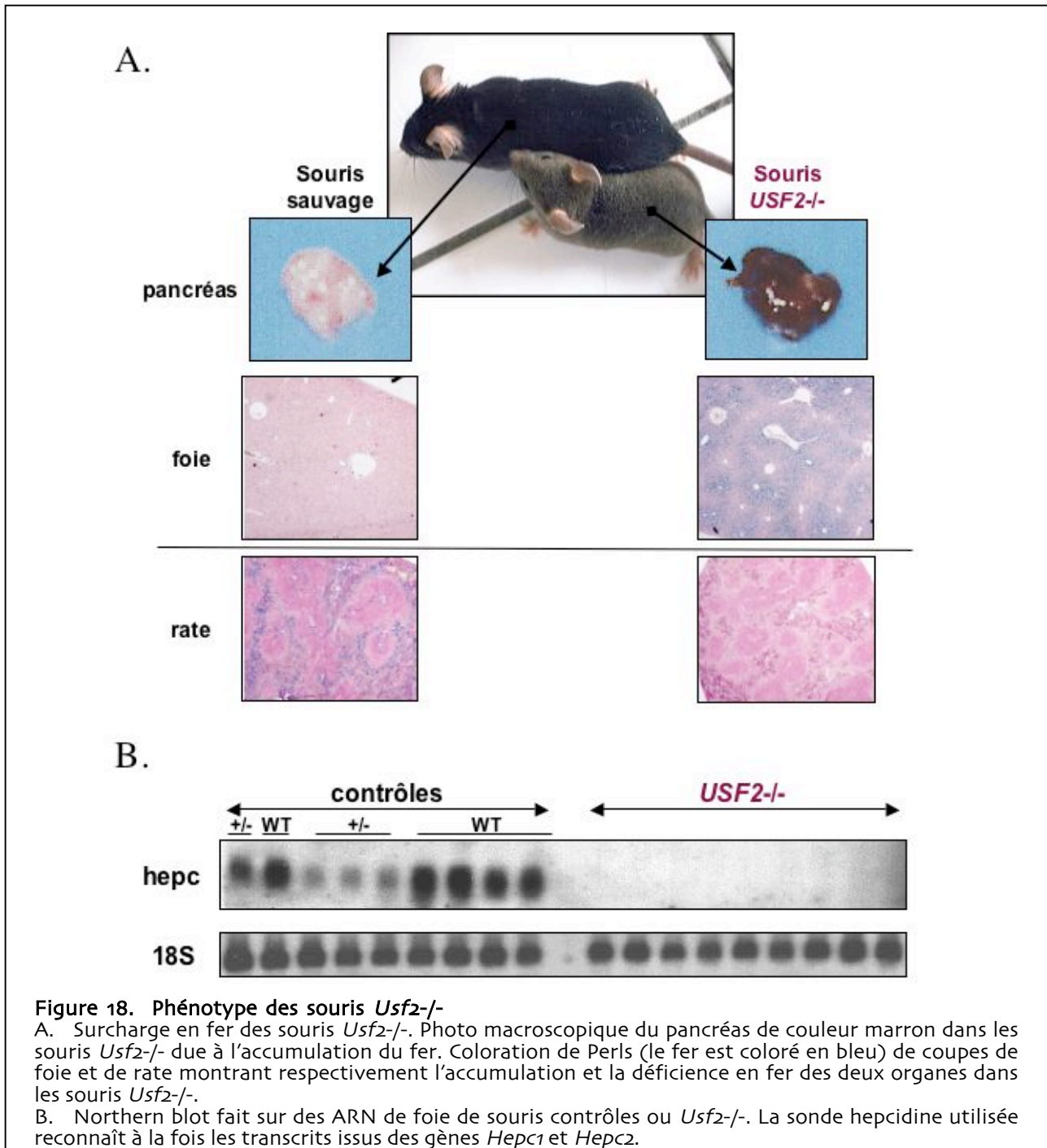
En 2001, l'hepcidine a été purifiée, au même moment, par deux laboratoires, pour ses propriétés antimicrobiennes dans le sang[195] et l'urine[299] de volontaires sains. Ces deux laboratoires cherchaient à identifier de nouveaux peptides antimicrobiens<sup>9</sup> chez l'homme car ces molécules pourraient être une alternative face à la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques. L'hepcidine tient son nom de son site de production majeur, « hep » pour hépatocyte, et « idine » de son activité bactéricide. La fonction antimicrobienne de l'hepcidine n'est prouvée qu'*in vitro*, son rôle dans l'immunité innée *in vivo* reste à démontrer.

Le laboratoire dans lequel je travaille a fait, peu après les premières purifications de l'hepcidine, la découverte du rôle du peptide dans le métabolisme du fer par l'étude de souris KO *Usf2*[280]. Ces souris avaient été créées pour étudier le rôle du facteur de transcription USF2 *in vivo*. Alors que ce facteur de transcription ubiquiste n'avait pas de rôle connu dans le métabolisme du fer, ces souris présentaient, de façon inattendue, une surcharge en fer multiviscérale avec une absence de fer dans les macrophages du foie et de la rate (Figure 18A) associée à une létalité périnatale. La distribution du fer dans ces souris faisait penser à la surcharge martiale d'une hémochromatose génétique. Le laboratoire a donc recherché si les gènes connus à l'époque pour déclencher une hémochromatose étaient perturbés. Il n'a pas été trouvé de différence d'expression de *Hfe* et *TfR2* dans les souris *Usf2*<sup>-/-</sup> pouvant expliquer la surcharge. Afin d'identifier le ou les gènes responsables de la surcharge en fer, une banque soustractive réalisée à partir du foie de ces souris a été réalisée. L'étude de cette banque a mis au jour l'absence de transcrits hepcidine chez ces souris (Figure 18B). Les gènes codant pour l'hepcidine chez la souris (*Hepc1* et *Hepc2*) sont situés en aval à quelques kb du gène *Usf2*. L'absence de transcrits hepcidine étaient probablement due à la présence de la cassette de sélection dans le gène *Usf2*. On sait maintenant que, selon le site d'insertion des cassettes de sélection utilisées pour l'inactivation génique, ces cassettes peuvent modifier l'état de la chromatine des gènes adjacents et perturber leur expression. L'étude d'un modèle KO *Usf2* créé par une équipe à Houston a pu confirmer l'absence de rôle d'USF2 dans le métabolisme du fer : les souris KO *Usf2* de Houston qui expriment bien les gènes hepcidine présentent une létalité périnatale mais pas de surcharge en fer, permettant ainsi d'attribuer à l'hepcidine la responsabilité de la surcharge en fer et la faible viabilité des souris à l'absence en *Usf2*[281]. Au moment de la découverte de l'absence de l'hepcidine chez les souris *Usf2*<sup>-/-</sup>, une publication est parue établissant un lien entre l'hepcidine et le métabolisme du fer[310]. L'équipe rennaise auteur de cet article cherchait à identifier des gènes régulés par une surcharge en fer. Pour cela, ils ont traité des souris par des régimes à teneur croissante en fer

---

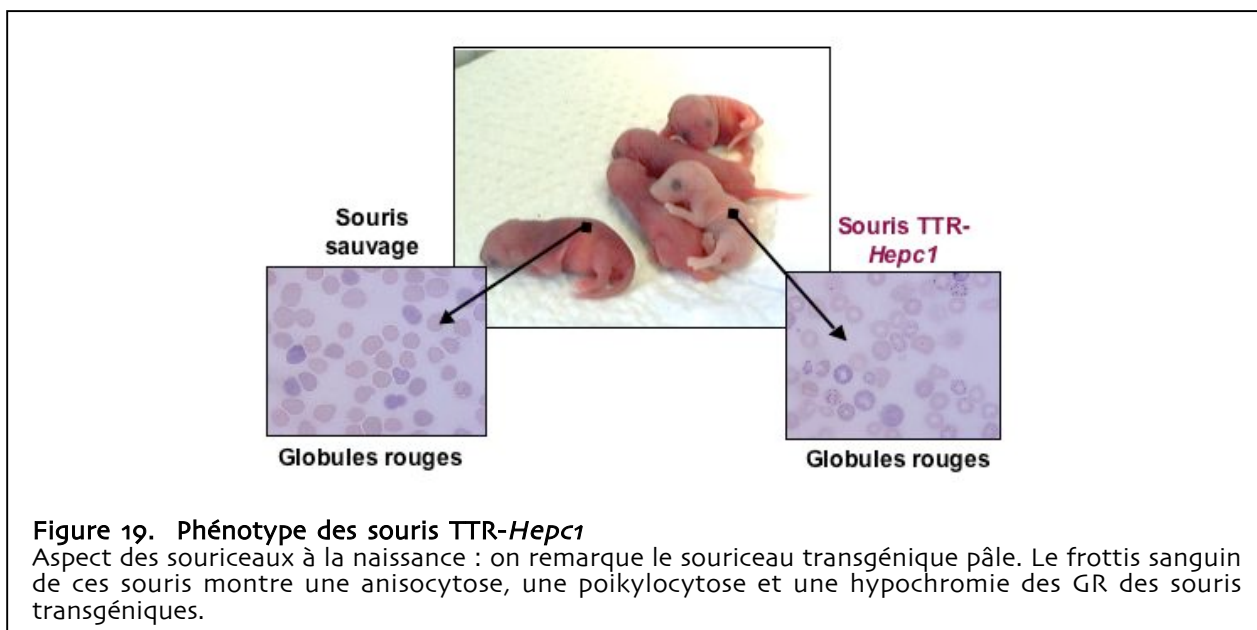
<sup>9</sup> Les peptides antimicrobiens sont un élément encore peu connu de la réponse immunitaire innée. Ils agissent en perturbant l'intégrité des membranes cellulaires des pathogènes. Chez l'homme et les autres mammifères, on retrouve deux sortes de peptides antimicrobiens : les défensines et les cathélicidines (pour une revue sur les défensines, voir[113]). Chez l'homme, on classe les défensines en défensines  $\alpha$  et  $\beta$  selon leur structure tridimensionnelle. Ces défensines sont plus généralement sécrétées aux sites possibles d'entrée des pathogènes (intestin, peau, poumons...).

et l'étude des gènes exprimés différemment dans le foie a montré que les transcrits hepcidine étaient présents en grande quantité dans le foie des souris traitées au fer[310]. Ils ont également montré que l'apport de fer par injection de fer dextran<sup>10</sup> et l'inflammation par injection de LPS induisait l'expression de l'hepcidine[310]. Mon laboratoire, à la lumière du phénotype des souris KO *Usf2* et du lien établi de l'hepcidine avec le fer a émis l'hypothèse d'un rôle inhibiteur de l'hepcidine dans l'absorption intestinale de fer et dans le recyclage du fer.



<sup>10</sup> Le fer dextran n'est pas délivré aux hépatocytes de la même manière que le fer contenu dans l'alimentation. Lorsque les souris reçoivent un régime riche en fer, le fer passe la barrière intestinale et est amené par la veine porte au foie. Lors d'une injection de fer dextran, les macrophages phagocytent le dextran puis libèrent le fer dans la circulation ou directement aux hépatocytes quand il s'agit des cellules de Kupffer.

Afin de confirmer ce rôle de l'hepcidine dans le métabolisme du fer, des souris transgéniques surexprimant *Hepc1* de façon constitutive dans le foie ont été générées dans le laboratoire. Ces souris portent le transgène TTR-*Hepc1* formé de 3kb du promoteur transthyrétine (TTR) dirigeant l'expression de l'ADNc *Hepc1* suivi de la séquence polyA de SV40. L'analyse des frottis sanguins des souriceaux transgéniques à la naissance montre la présence d'une forte anémie ferriprive microcytaire hypochromique[281] (Figure 19). La grande majorité des animaux portant le transgène meurent à la naissance de leur anémie. Trois lignées transgéniques ont pu être sauvées par injection sous-cutanée de fer dextran à la naissance. Le degré de l'anémie peut être directement corrélé au niveau d'expression du transgène dans les différentes lignées : plus le transgène est exprimé, plus les souris sont anémiques et survivent difficilement. La production précoce d'hepcidine dirigée par le promoteur TTR au cours de la gestation a probablement conduit au blocage du transport placentaire de fer responsable de l'anémie à la naissance. En effet, le promoteur TTR fait exprimer l'hepcidine à un moment où les gènes endogènes hepcidine sont normalement réprimés et ce, probablement pour permettre un transfert de fer materno-fœtal optimum (voir « Régulation développementale de l'hepcidine »). Ces résultats ont permis de confirmer que l'hepcidine agissait en limitant l'entrée du fer dans le sang[281].



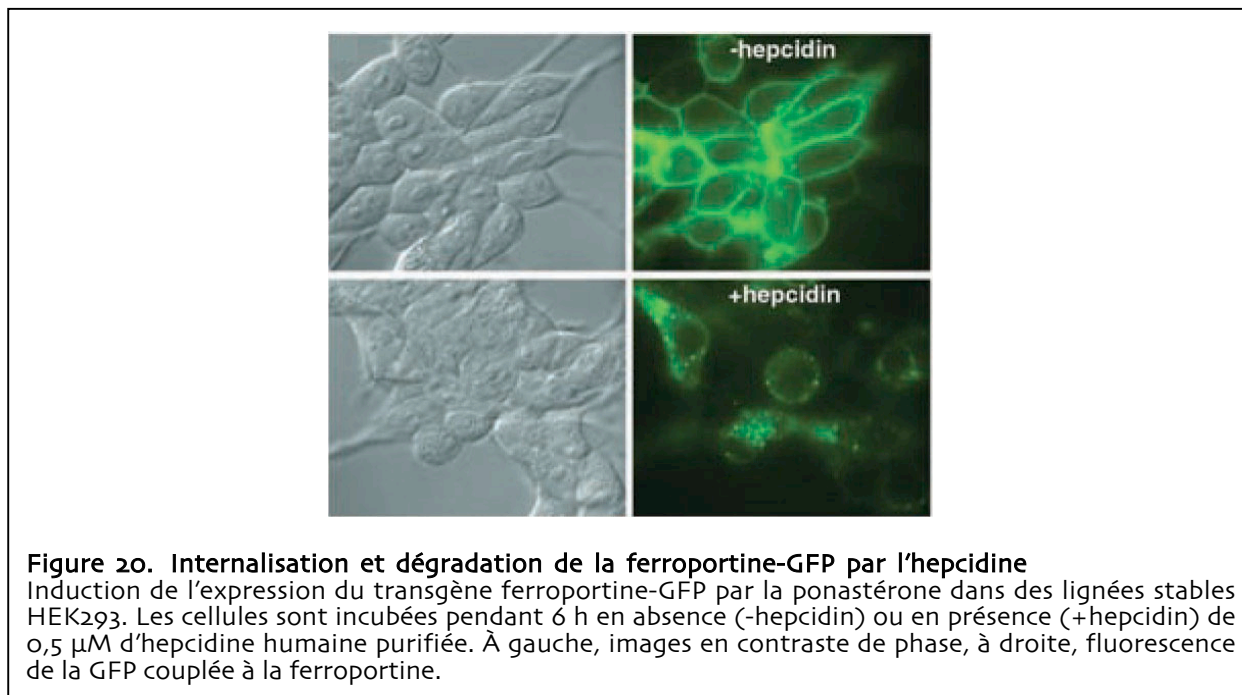
**Figure 19. Phénotype des souris TTR-*Hepc1***

Aspect des souriceaux à la naissance : on remarque le souriceau transgénique pâle. Le frottis sanguin de ces souris montre une anisocytose, une poikilocytose et une hypochromie des GR des souris transgéniques.

Suite à la mise en évidence du rôle de l'hepcidine dans le métabolisme du fer, ce peptide s'est vu attribuer le nom d'hormone. Dès lors, de nombreuses équipes ont cherché à identifier ses cibles moléculaires et son récepteur. En 2004, juste trois ans après sa découverte, les équipes de Tomas Ganz et de Jerry Kaplan ont proposé un modèle d'action de l'hormone[277]. Les auteurs ont fait surexprimer par des cellules HEK293 un transgène codant pour la ferroportine couplée à la GFP dont l'expression est inductible par la ponastérone<sup>11</sup>. Après induction de l'expression du transgène, la ferroportine est détectée à la

<sup>11</sup> En effet, la surexpression de gène ferroportine dans les cellules in vitro a un effet toxique à long terme, la cellule étant alors incapable de retenir le fer essentiel à sa survie. Il est donc préférable d'utiliser un système inductible pour faire exprimer le transgène codant pour la ferroportine.

surface des cellules. Le traitement de ces cellules par de l'hepcidine humaine purifiée a montré que l'hepcidine entraînait l'internalisation de la ferroportine de la surface des cellules dès 1 heure d'incubation puis la dégradation de la ferroportine après 4h d'incubation (Figure 20). Cette internalisation puis dégradation de l'exporteur de fer est associée à une diminution de la sortie du fer des cellules et une augmentation de la ferritine intracellulaire. Enfin, l'utilisation d'hepcidine radiomarquée leur a permis de montrer que l'hepcidine était capable de se lier à la ferroportine-GFP[277].



Ce mécanisme d'action de l'hepcidine sur la ferroportine, confirmé par d'autres équipes[66, 77, 190], n'exclut néanmoins pas la possibilité d'autres modes d'action de l'hepcidine.

### Du(des) gène(s) à la protéine hepcidine

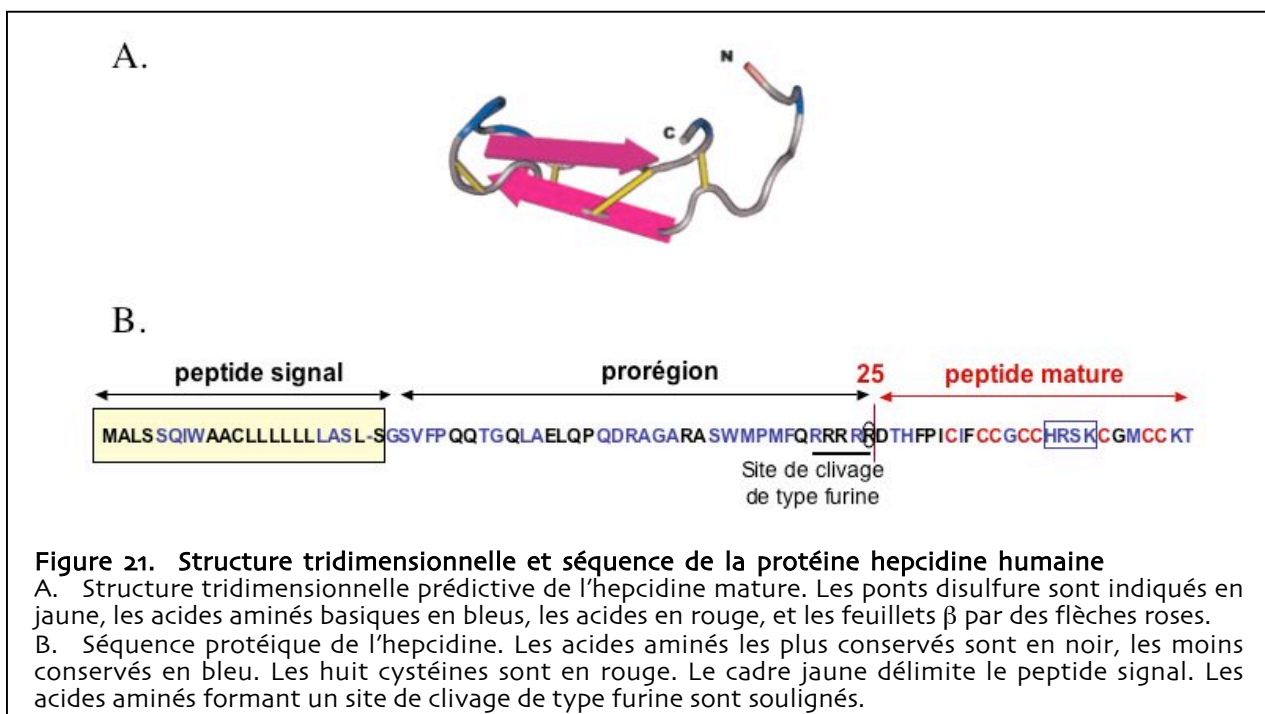
Alors qu'un seul gène code pour l'hepcidine chez l'homme (appelé *HAMP* pour Hcpidin Anti Microbial Peptide situé sur le chromosome 19 en position q13.12) et chez le rat, il existe chez la souris deux gènes notés *Hepc1* et *Hepc2* situés sur le chromosome 7. L'ARNm des deux gènes murins est identique à 93% mais la divergence entre les deux ARNm s'observe essentiellement sur la partie 3' correspondant au peptide mature (les peptides matures issus des gènes *Hepc1* et *Hepc2* n'ont que 68% d'identité). Des deux gènes codant pour l'hepcidine chez la souris, *Hepc1* est le plus proche du gène humain (76% d'identité entre le peptide mature codé par *Hepc1* et *HAMP* contre 58% pour *Hepc2* versus *HAMP*). Pour savoir si cette différence de séquence peptidique reflète une différence fonctionnelle entre *Hepc1* et *Hepc2*, le laboratoire a entrepris la génération de souris transgéniques *TTR-Hepc2* qui expriment la séquence codante *Hepc2* de façon constitutive dans le foie. Le laboratoire a montré que, contrairement aux souris *TTR-Hepc1*, ces souris ne sont pas anémiques et n'ont pas de perturbation du métabolisme du fer[234]. Ainsi, le rôle d'*Hepc2* reste à déterminer, mais ne semble pas essentiel à la régulation du métabolisme du



fer. Afin de confirmer cette hypothèse, mon laboratoire a généré des souris KO *Hepc1* et va générer des souris KO *Hepc2*. Des premiers résultats de souris KO *Hepc1* montrent que l'absence d'*Hepc1* suffit à reproduire le phénotype des souris KO *Usf2* dans lesquelles il y avait une absence des transcrits *Hepc1* et *Hepc2* dans le foie, montrant ainsi la non redondance des deux gènes[218] (voir « Résultats complémentaires »).

Le gène humain *HAMP* (aussi appelé *LEAP-1* pour Liver Expressed Antimicrobial Peptide[195]) est formé de 3 exons codant pour une pré-pro-protéine de 84 acides aminés. La pré-pro-protéine est composée de trois parties : le peptide signal de 22 acides aminés, une prorégion et le peptide mature de 25 acides aminés retrouvé dans le sang et les urines (Figure 21B). On pense que le peptide mature est issu du clivage de la pro-hepcidine par une protéase de type furine. La présence dans l'urine de peptides de 20 et 22 acides aminés[185, 299], en plus du peptide de 25 acides aminés trouvé dans le sang[195] et l'urine[185, 299], suggère que l'hepcidine mature subit une dégradation au cours de son excrétion. Les données sur le mode de sécrétion du peptide (protéases mises en jeu, régulation ?), la nature de la forme circulante (existence d'une protéine plasmatique de liaison, propeptide circulant ?) ne sont pas encore disponibles.

Le peptide mature a une structure très particulière en ce sens qu'il contient 8 cystéines impliquées dans 4 ponts disulfures dont un formé par deux cystéines adjacentes[162] (Figure 21A). Au cours de l'évolution, ces cystéines ont été très conservées, elles sont retrouvées dans toutes les espèces décrites, y compris chez les poissons (Figure 22).



DTHFPICIFCCGCHHR-SKCGMCCKT	Human BC020612
DTHFPICIFCCGCCRK-AICGMCCKT	Pig AF516143
DTHFPICIFCCGCKKT-PKCGLCCKT	Dog NM001007140
DTNFPICLFCCKCKKN-SSCGLCCKIT	Rat NM053469
DTNFPICIFCCKCCMN-SQCGICCKT	Mouse (hepc1) BC021587
DINFPICRFCCQCCNK-PSCGICCEE	Mouse (hepc2) AY232841
HSHLSICVHCCNCKKY-KGCGKCCLT	Western clawed frog DN020182
HSHLSICIHCCNCKKF-KGCGKCCLT	African clawed frog CB199190
QSHLSLCRYCCNCCKN-KGCGFCRRF	Channel catfish DQ062122
QSHLSLCRFCCCKCCRN-KGCGYCKKF	Zebrafish NM205583
QSHLSLCRWCCNCCHN-KGCGFCCKF	Salmon BQ036900
QSHLSLCRYCCTCCKN-KGCGFCRRF	Killifish CN990077
QSHLSLCRWCCNCCHN-KGCGFCCKF	Rainbow trout BX868476
QSHLSLCRWCCNCCHN-KGCGFCRRF	Rainbow smelt CX351105
QSHLSMCRWCCNCCCTANKGCGFCRRF	Five-ray yellowtail AU312565
QSHISMCTMCCNCCKNYKCGFCRRF	Medaka AU178966
QSHISMCIYCCNCCCRANKGCGYCKKF	Gilthead seabream CB177060
HSSPGGCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF	Hybrid striped bass AF394246
↑	
-GFKCKFCGCCRPG-VCGLCCRF	Atlantic halibut CF931737
-GIKCKFCGCGCTPG-VCGVCCRF	Long-jawed mudsucker AW783897
-GFKCKFCGCGCRRAG-VCGLCCKF	Winter flounder AW013287
-GIKCRFCGCGCTPG-ICGVCCRF	Tilapia AY725227
-AIKCKFCGCGCTPG-VCGVCCRF	Japanese sea bass AY864813
SPKRCRFCCNCCPRMVGCGTCCKF	Takifugu SINFRUG00000156845
SPAGCRFCGCGCPRMRGCGVCCKF	Tetraodon CR644058

**Figure 22. Séquence de l'hepcidine mature de différentes espèces**

Les hepcidines sont regroupées par mammifères, amphibiens et poissons. Les poissons sont divisés en deux groupes selon leur degré de similarité dans la séquence peptidique hepcidine.

Les cystéines conservées dans toutes les espèces sont surlignées en jaune. Les flèches indiquent les sites de clivage putatifs. Le nom des espèces est indiqué à droite avec le numéro de l'EST correspondant (pour l'hepcidine de Takifugu, il s'agit du numéro d'accès de la base de données Ensembl). En gras figurent les résidus qui ne sont pas conservés dans un même groupe.

Nemeth *et al.* ont utilisé la capacité de l'hepcidine à diminuer le signal GFP couplé à la ferroportine (voir ci-dessus) pour développer un test fonctionnel de l'activité de l'hepcidine. L'étude d'hepcidines synthétiques mutées a permis d'établir quels acides aminés pouvaient jouer un rôle important dans la dégradation de la ferroportine par l'hepcidine[279]. Les auteurs ont ainsi pu montrer que, de façon surprenante, alors qu'ils sont peu conservés dans les différentes espèces, les 5 acides aminés N-terminaux étaient essentiels pour l'activité de l'hepcidine : l'hepcidine délétée de ces 5 acides aminés n'a plus que 12% de l'activité de l'hepcidine sauvage[279].

Concernant les propriétés de stabilité et de clairance du peptide mature, les seules données disponibles sont issues d'une étude d'injection d'hepcidine humaine radiomarquée chez la souris. Rivera *et al.*[321] ont montré qu'après injection intrapéritonéale d'hepcidine radiomarquée, la radioactivité disparaissait du pool sanguin au bout de 24 h. On retrouve de l'hepcidine radiomarquée, dès 1 h et jusqu'à 24 h après injection, dans l'urine des souris. Les auteurs ont également mesuré la radioactivité dans plusieurs organes 1 h après injection du

peptide radiomarqué : ils retrouvent un fort radiomarquage de la rate, du duodénum et du foie, trois organes exprimant fortement la ferroportine[321].

### **Sites d'expression de l'hepcidine**

L'hepcidine a été purifiée chez l'homme à partir de sang[195] et d'urine[299]. L'ARNm de l'hepcidine est présent en grandes quantités dans le foie[195, 299, 310]. Pigeon *et al.* ont montré que dans le foie de souris normales, l'hepcidine était produite par les hépatocytes et pas par les cellules non parenchymateuses[310]. Dans les hépatocytes, les études de localisation à de la protéine pro-hepcidine sont divergentes. Kulaksiz *et al.* ont détecté de la pro-hepcidine (voir ci-dessous pour les anticorps dirigés contre l'hepcidine) à la membrane basolatérale des hépatocytes chez l'humain et le cobaye, mais, dans les lignées hépatiques HepG2, les mêmes anticorps détectent un signal cytoplasmique[199]. Wallace *et al.* ont développé d'autres anticorps dirigés contre la pro-hepcidine et détectent un signal dans des vésicules de type Golgi dans une lignée hépatique murine (Hepa 1-6), des hépatocytes primaires de souris et des coupes de foie de souris[382]. Cette localisation est plus cohérente avec ce que l'on peut attendre de la localisation d'une molécule sécrétée.

Par Northern blot, dot-blot et RT-PCR, d'autres sites d'expression plus faible ont été détectés : le cœur, l'estomac, le cerveau et les poumons[195, 299, 310]. De façon surprenante, alors que dans les premiers articles étudiant l'expression de l'hepcidine dans différents tissus murins et humains les auteurs ne détectaient pas d'ARNm hepcidine dans le rein, une équipe a récemment publié l'expression d'hepcidine dans cet organe[200]. Cette équipe détecte de l'ARNm hepcidine dans le rein humain et murin par RT-PCR. Les anticorps dirigés contre la pro-hepcidine mis au point par cette équipe permettent de détecter un signal par western blot et immunohistochimie dans différentes structures du rein (branche ascendante corticale, tubes collecteurs)[200]. Le rôle de l'hepcidine dans cet organe reste à ce jour inconnu.

Enfin, très récemment, l'ARNm hepcidine a été retrouvé dans des macrophages (macrophages spléniques de souris ou lignée murine macrophagique RAW267.4) activés par traitement au LPS[231], des macrophages de souris dérivés de moelle osseuse activés par des bactéries[305] et dans des macrophages dérivés de monocytes circulants humains[169]. L'hepcidine produite localement dans les macrophages pourraient jouer un rôle primordial dans le contrôle du transport du fer de cette cellule lors de l'inflammation.

### **Production et détection de l'hepcidine**

La structure tridimensionnelle du peptide et son état d'oxydation rendent difficile la production d'hepcidine en grande quantité. Aujourd'hui seules quelques équipes sont capables de produire de l'hepcidine par synthèse chimique[195, 203, 321], de l'hepcidine recombinante dans des systèmes bactériens[120, 404, 409] ou de mammifères[383], voire de purifier le peptide à partir d'échantillons biologiques[195, 299]. Plusieurs équipes ont montré récemment par l'étude d'hepcidine recombinante[120] ou d'hepcidine humaine purifiée à partir d'urines[86, 413] que l'hepcidine était capable de lier du fer et/ou du cuivre. Le rôle de ces métaux pour la fonction de l'hepcidine reste à déterminer.



La détection de l'hepcidine est limitée par la difficulté de produire des anticorps contre cette protéine dont la structure est très conservée dans les espèces[186]. Trois équipes ont toutefois réussi à générer des anticorps dirigés contre l'hepcidine.

L'équipe de T. Ganz a utilisé un peptide synthétique pour immuniser des lapins (la taille et la séquence du peptide injecté n'ont pas été précisées). Cette équipe a utilisé les anticorps obtenus en western blot et dot blot. Ces anticorps détectent l'hepcidine humaine uniquement dans les urines et non dans le sérum, où, selon les auteurs, l'hepcidine serait présente en trop faible concentration[275]. L'utilisation de ces anticorps a permis d'estimer la concentration d'hepcidine urinaire chez des volontaires sains entre 3 à 30 nM (10-100 ng/ml) d'hepcidine.

L'équipe de H. Kulaksiz a synthétisé des peptides correspondants à la prorégion (acides aminés 28 à 47) ou au peptide mature (acides aminés 70 à 84). De façon surprenante, les anticorps générés après immunisation par ces peptides donnent tous deux des signaux en western blot de 10 et 20 kDa dans le foie humain[199]. Les auteurs pensent qu'il s'agit de la pro-hepcidine (bande de 10 kDa<sup>12</sup>) et d'un dimère ou agrégat d'hepcidine (bande de 20 kDa). Dans le sérum humain, ces anticorps détectent une faible bande à 10 kDa. On notera que l'anticorps issu de l'immunisation par le peptide mature ne révèle que le précurseur et en aucun cas le peptide mature de 25 acides aminés, ni dans les tissus, ni dans le sérum. Ces anticorps réagissent également sur des échantillons de cobaye[199], de rat et de souris[200]. L'anticorps dirigé contre la prorégion a été utilisé pour élaborer un kit ELISA commercialisé pour détecter la pro-hepcidine dans des échantillons de sérum humain. La concentration de la pro-hepcidine dans des volontaires sains calculée par ce kit ELISA donnent des valeurs de 52 à 153 ng/ml de sérum[199]. La valeur biologique d'une telle mesure sérique du précurseur et non de l'hepcidine mature de 25 acides aminés reste à démontrer[31].

Enfin, l'équipe de N. Subramaniam a développé des anticorps en immunisant des lapins avec de la pro-hepcidine1 recombinante de souris[382]. L'utilisation de ces anticorps purifiés en western blot permet de détecter une bande à 7,7 kDa dans le foie de souris correspondant à la pro-hepcidine. Cet anticorps ne semble pas reconnaître l'hepcidine mature.

Chez l'homme, en plus des techniques utilisant des anticorps dirigés contre l'hepcidine mature ou la pro-hepcidine, une autre méthode a été développée pour détecter l'hepcidine. C'est une méthode utilisant la spectrométrie de masse qui permet d'analyser l'hepcidine urinaire[185]. Cette méthode permet d'identifier l'hepcidine mature de 25 acides aminés et des peptides hepcidine de 20 et 22 acides aminés.

Deux études dans la littérature ont pu comparer directement le dosage de la pré-pro-hepcidine sérique et de l'hepcidine urinaire chez un même patient mais les résultats sont divergents : l'une trouve que les deux méthodes sont corrélées[412] et l'autre trouve des résultats contradictoires entre les deux méthodes[184].

---

<sup>12</sup> Cette masse moléculaire correspond en fait plutôt au poids moléculaire calculé de la pré-pro-hepcidine de 84 acides aminés qui contient le peptide signal. La pro-hepcidine qui ne contient pas le peptide signal a un poids moléculaire calculé de 7,5 kDa, ce qui correspond au signal détecté par les anticorps développés par l'équipe de N. Subramaniam.

Enfin, l'évaluation des taux hépatiques d'ARNm hepcidine reste une solution efficace pour estimer la production d'hepcidine, surtout chez la souris (les biopsies de foie humain sont rares). Une étude récente a montré que les quantités d'ARNm hépatique mesurées sur des biopsies de foie de patients étaient corrélées aux quantités d'hepcidine urinaire mesurées par dot blot chez ces mêmes patients[69].

## Régulation de l'hepcidine

### ◆ Régulation développementale

Au cours du développement, le ou les gènes codant pour l'hepcidine ne sont pas exprimés tout au long de la vie. De l'ARNm hepcidine a été retrouvé dans du foie fœtal humain par hybridation d'une membrane commerciale contenant des ARNm de différents tissus. Le stade exact d'expression du gène dans le foie fœtal humain est difficile à définir car les ARNm proviennent d'interruption de grossesse pour raison médicale, l'âge des fœtus se situant entre 18 à 24 semaines de grossesse. Chez la souris et le rat, l'(les)ARNm n'a(ont) pu être détecté(s) dans le foie d'embryons prélevés entre les stades E14,5 et E18,5[54, 281] (Figure 23). Pour savoir si le gène hepcidine pouvait être exprimé plus précocement, j'ai mesuré par RT-PCR semi quantitative l'expression du gène *Hepc1* dans le foie d'embryons de souris âgés de 10 à 12,5 jours après la conception. Je n'ai pas détecté de signal par cette technique (collaboration avec P.H. Roméo, résultats non publiés) mais ceci n'exclut pas la présence d'hepcidine à des taux faibles, détectables uniquement par RT-PCR quantitative. Au cours du développement, on retrouve ensuite les transcrits hepcidine dans le foie de souriceaux ou de rats à la naissance et dans les deux-trois premiers jours de vie[54, 281]. Le ou les gènes ne sont alors plus exprimés jusqu'à l'âge adulte : on détecte de nouveau l'ARNm hepcidine à 56 jours postnatal chez la souris[281] et dès 28 jours chez le rat[54] (Figure 23).

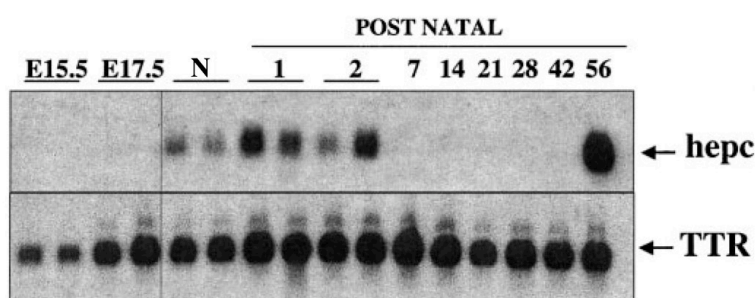


Figure 23. Expression des gènes hepcidine chez la souris au cours du développement hépatique. La sonde hepcidine utilisée pour le Northern blot détecte à la fois les transcrits issus d'*Hepc1* et *Hepc2*. N : naissance.

### ◆ Régulation systémique de l'hepcidine

Pour être un bon candidat de régulateur central du métabolisme du fer, l'hepcidine doit pouvoir répondre d'une façon ou d'une autre (niveau d'expression / d'activité / de dégradation) aux stimuli connus pour influencer l'absorption et le relargage du fer. Comme on l'a vu précédemment, un régime riche en fer entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm hepcidine dans le foie[310] (et D. Q. Lou, résultats non publiés du laboratoire). Le traitement par le fer de volontaires sains conduit également à l'augmentation de l'hepcidine

urinaire[276]. À l'inverse, dans le cas d'un régime pauvre en fer, on observe une diminution des transcrits hepcidine dans le foie de rat[105] et de souris (D. Q. Lou, résultats non publiés du laboratoire). De même, dans le foie de rate en fin de gestation, lorsque les réserves en fer de la mère sont faibles du fait de l'exigence accrue du fœtus pour ce métal, on retrouve des taux très diminués d'hepcidine[257]. Cette réponse de l'hepcidine au fer est une réponse physiologique de l'organisme pour contrecarrer la surcharge en limitant l'entrée de fer dans le sang. À l'inverse, lorsque l'organisme a besoin de fer, l'hepcidine est diminuée, levant ainsi ce frein de l'absorption intestinale et du recyclage du fer.

Outre la réponse au fer, l'hepcidine répond aux stimuli produits par le système érythropoïétique. En effet, chez des souris dont le nombre de globules rouges est fortement diminué par des saignées régulières ou un traitement hémolytique (phénylhydrazine), le laboratoire a montré que la quantité de transcrits hepcidine dans le foie est diminuée[282]. De façon similaire, des souris traitées à l'érythropoïétine[283] et des souris en situation d'hypoxie diminuent la transcription d'hepcidine dans le foie[282]. Enfin, dans des modèles de souris anémiques par mutations naturelles (souris *sla*, portant une mutation dans le gène codant pour la ferroxydase héphaestine, souris *mk* portant une mutation dans le gène codant pour le transporteur de fer DMT1), les taux d'ARNm hépatiques sont diminués[388]. Ainsi, en cas de demandes accrues en fer, l'hepcidine est diminuée de façon à augmenter le fer disponible pour reconstituer les réserves et, dans les cas plus sévères, produire des globules rouges.

Il semble que des deux signaux régulateurs, le signal érythroïde prédomine sur celui des réserves en fer. Ceci a pu être établi grâce aux modèles de maladies hématologiques de dysérythropoïèse où on observe, suite à l'anémie, une hyperabsorption digestive de fer, qui induit secondairement une surcharge martiale. Ainsi, dans des souris hypotransferrinémiques (*hpx*)[388], ou des souris thalassémiques[2], les taux d'ARNm de l'hepcidine sont diminués malgré la surcharge en fer. Cette diminution de l'hepcidine a également été décrite récemment au niveau des taux d'hepcidine urinaire chez des patients thalassémiques[298] (voir aussi « Hpcidine et désordres du métabolisme du fer »). La prédominance du signal érythroïde sur le signal du fer a pu également être mis en évidence dans notre laboratoire par un modèle expérimental : nous avons traité des souris injectées en fer dextran avec de la phénylhydrazine qui entraîne une hémolyse. Alors que les souris injectées en fer dextran augmentent leur taux hépatiques d'ARNm hepcidine, les souris qui reçoivent en plus le traitement hémolytique n'augmentent pas les taux d'ARNm hepcidine par rapport aux souris contrôles[282].

#### ◆ Régulation lors de l'inflammation

L'hepcidine est augmentée par divers stimuli inflammatoires. Que ce soit lors d'une inflammation chronique (infection bactérienne[343]) ou lors d'une inflammation aigue (injection de turpentine[282], d'adjuvant de Freund[8] ou de lipopolysaccharide, LPS[275, 310]), on observe chez la souris, dans tous les cas, une augmentation des transcrits hepcidine du foie. Chez l'homme, le traitement par une dose sublétales de LPS entraîne également une augmentation de l'hepcidine urinaire 6h après injection du LPS[184]. S'il est maintenant bien établi que l'hepcidine est une protéine de réponse précoce à l'inflammation, le répertoire des

cytokines inflammatoires capables de moduler l'expression de son gène reste un sujet de controverse. Nous pouvons retenir qu'IL-6 et IL-1 $\beta$  sont des agents inducteurs positifs de l'hepcidine. Infusée à des volontaires sains, l'IL-6 est capable d'augmenter de 6 fois les taux urinaires d'hepcidine au bout de quelques heures[276]. L'IL-1 $\beta$ , même à faible concentration, augmente la transcription de l'hepcidine d'hépatocytes murins[215] et de lignées hépatomateuses humaines (HuH-7)[165] en culture. Cette induction semble indépendante d'IL-6 puisque la présence d'anticorps bloquants anti-IL-6 n'empêche pas cette induction[165, 215]. En revanche, le rôle du TNF- $\alpha$  sur l'expression de l'hepcidine est moins clair : deux études ont montré une diminution de l'expression de l'hepcidine dans des lignées hépatomateuses humaines (Hep3B[276], HuH-7 et HepG2[165]), une étude n'observe pas d'effet dans des hépatocytes humains[275] et enfin une étude réalisée avec des hépatocytes primaires de rat montre une augmentation de l'hepcidine par le TNF- $\alpha$ [81].

Cette augmentation de l'hepcidine au cours de l'inflammation pourrait être liée à son rôle d'agent antimicrobien dans les autres espèces. On pense en effet que l'hepcidine a évolué d'un peptide antimicrobien vers son rôle de régulateur de l'homéostasie du fer. Cette évolution a pu apparaître déjà chez les poissons où on retrouve ces deux fonctions chez certaines espèces[342]. Chez les mammifères, cette activité bactéricide serait inhibée dans le sang par les concentrations de NaCl physiologiques[299] au profit de son action de régulation du métabolisme du fer. Et les concentrations d'hepcidine retrouvées dans l'urine même lors d'une inflammation (de l'ordre de 1  $\mu$ M)[275]) ne sont pas compatibles avec celles d'un peptide antimicrobien qui doit être très concentré pour agir[342].

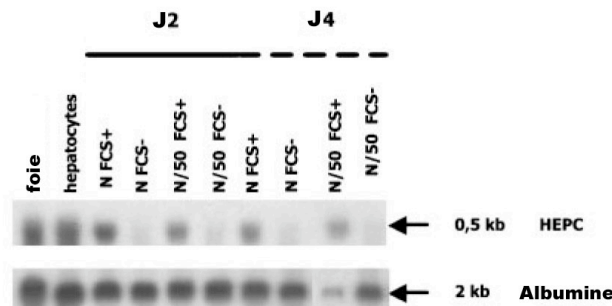
#### ◆ Autres régulations

Les niveaux d'hepcidine semblent également sujets aux variations des hormones sexuelles et du fond génétique. En effet, il a été montré qu'il existe un dimorphisme sexuel chez la souris, les mâles produisant moins d'ARNm hepcidine que les femelles([55] et observations personnelles). Ces taux d'hepcidine sont corrélés à une surcharge en fer moins importante chez les mâles. Concernant le fond génétique, il a été montré que les gènes hepcidine sont plus fortement exprimés dans des souris dont la surcharge en fer hépatique est naturellement plus élevée([55, 388] et observations personnelles) : les souris sur fond génétique 129 qui ont un contenu en fer plus élevé que les souris C57 ont également plus d'hepcidine[388].

Un article étudiant les gènes régulés lors de la régénération hépatique par microarrays a montré que les transcrits hepcidine étaient augmentés de quatre fois 6h et 24h après une hépatectomie partielle chez la souris[183]. Le rôle exact de l'hepcidine dans la régénération du foie reste à déterminer.

En culture cellulaire, l'expression des gènes hepcidine dans les hépatocytes primaires semble sensible à la présence de sérum dans le milieu. Pigeon *et al.* ont en effet montré qu'après deux jours ou quatre jours de culture sans sérum de veau fœtal, les taux d'ARNm hepcidine sont diminués dans les hépatocytes primaires de souris par rapport aux hépatocytes fraîchement isolés. De plus, Pigeon *et al.* ont observé que la présence de sérum permettait de maintenir une expression élevée des gènes hepcidine au cours de la culture par rapport à une

culture sans sérum (Figure 24)[310]. Ces résultats ont été retrouvés par notre laboratoire (D. Q. Lou, résultats non publiés) et dans des hépatocytes primaires humains par Nemeth *et al.*[275]. Une étude récente[81] a étudié l'effet de différentes conditions de culture sur des hépatocytes primaires de rat. Cette étude montre, de façon surprenante, que dans les premières heures de culture sans sérum (remplacé par 5% d'albumine bovine sérique) l'expression des gènes hepcidine est augmentée par rapport à celle des hépatocytes fraîchement isolés. Enfin, les auteurs de cette étude montrent que l'expression du gène hepcidine dépend à la fois de l'étalement des cellules, du temps de culture, de la présence de sérum et du contenu en fer des cellules[81].



**Figure 24. Régulation de l'hepcidine en culture cellulaire par l'ajout de sérum**

Les hépatocytes sont cultivés en absence (-) ou en présence (+) de FCS (Fetal Calf Serum, sérum de veau foetal). N :  $5 \cdot 10^{-5}$ ; N/50 :  $5 \cdot 10^{-6}$  d'hydrocortisone hemisuccinate. J2 : après deux de culture. J4 : après 4 jours de culture.

#### ◆ Régulations différentes d'*Hepc1* et *Hepc2*

Chez la souris, l'expression des deux gènes *Hepc1* et *Hepc2* est augmentée par un régime riche en fer[248] ou l'injection de fer dextran[164]. Néanmoins, on observe des régulations différentes de l'expression d'*Hepc1* et *Hepc2* dans d'autres situations. Ces différences de régulation sont intéressantes car, comme nous l'avons vu, ces deux gènes ne semblent pas avoir la même fonction (voir ci-dessus). Les deux gènes sont tous les deux exprimés dans le foie, mais seul le gène *Hepc2* est exprimé dans le pancréas[164]. De façon intéressante, dans les souris KO *Usp2*, les deux gènes ne sont pas exprimés dans le foie mais dans le pancréas de souris KO *Usp2*, *Hepc2* continue d'être exprimé. Les quantités respectives de transcrits *Hepc1* et *Hepc2* sont aussi sujets à variation en fonction du fond génétique. Ainsi, dans la souris C57BL6 (fond génétique utilisé pour étudier les régulations de l'hepcidine à différents stimuli[282]), *Hepc1* est fortement exprimé dans le foie alors que les transcrits *Hepc2* sont majoritaires dans le foie de souris de fond génétique DBA/2[55].

Ces régulations différentes des deux gènes sont d'autant plus surprenantes que les promoteurs d'*Hepc1* et *Hepc2* sont identiques à 97%. La présence d'une séquence IAP (intra-cisternal A-particle) en amont d'*Hepc2*<sup>13</sup> pourrait expliquer les différences de régulation

<sup>13</sup> L'organisation génomique des gènes *Hepc1* et *Hepc2* est sujet à controverse du fait de différences entre les données issues des séquences de cosmides ou des séquences génomiques[164, 234, 280, 310]. Ainsi, notre laboratoire considère que l'IAP est en amont d'*Hepc2* alors que Ilyin *et al.* le placent en amont d'*Hepc1*.

observées. En effet l'IAP est un rétrotransposon capable d'induire l'expression ectopique de gènes adjacents[42].

Le rôle d'Hepc2 est encore non élucidé, l'étude comparative des souris TTR-*Hepc2*[234] et des souris KO *Hepc2* (en cours de réalisation dans le laboratoire) nous permettra certainement d'en savoir plus.

◆ Cellules et molécules impliquées dans les régulations de l'hepcidine par le fer et l'inflammation

Les mécanismes eux-mêmes de régulation de l'hepcidine restent à découvrir car, notamment en ce qui concerne l'effet du fer sur l'hépatocyte, il n'a pas été possible jusqu'à présent de reproduire l'induction observée *in vivo* sur des hépatocytes isolés en présence de différentes formes de fer[116, 275, 310]. Le fer libre a même été montré comme étant capable d'inhiber *in vitro* la synthèse d'hepcidine[116]. Ces résultats suggèrent une régulation indirecte de l'hepcidine par le fer faisant intervenir d'autres signaux et/ou d'autres types cellulaires. En particulier, le rôle des macrophages dans la régulation de l'hepcidine est sujet à débat[235, 267, 353]. Plusieurs équipes ont entrepris d'étudier l'implication des macrophages dans cette régulation en utilisant des drogues capables de détruire spécifiquement les macrophages (liposome-clodronate ou gadolinium chloride). Toutes les équipes s'accordent à montrer que les cellules de Kupffer ne sont pas essentielles à l'induction des gènes hepcidine par le fer[235, 267, 353]. Les macrophages semblent cependant importants dans la régulation de l'hepcidine au cours de l'inflammation. En effet, il a été montré que des hépatocytes traités au LPS contiennent trois fois plus de transcrits hepcidine que des hépatocytes contrôles mais que, lorsque l'on traite les hépatocytes par des milieux conditionnés de macrophages activés au LPS, ceux-ci augmentent de 25 fois leur taux d'hepcidine[275].

Ces systèmes ont donc également été utilisés pour regarder le rôle des macrophages dans l'induction des gènes hepcidine au cours de l'inflammation. Les résultats des différentes équipes ne font pas ressortir de consensus sur cette question. Notre équipe a montré que la déplétion des cellules de Kupffer par des liposomes contenant du clodronate n'empêche pas l'induction de l'hepcidine dans les hépatocytes de souris traitées au LPS mais que cette induction est plus faible que dans les souris contrôles[235]. L'utilisation du clodronate par une autre équipe indique, à l'inverse, que la réponse au LPS de l'hepcidine est plus forte lorsque que les macrophages sont détruits que chez les contrôles[353]. Enfin, Montosi *et al.* ont utilisé une autre drogue, le gadolinium chloride, pour dépléter les macrophages[267]. Ces auteurs montrent, comme les résultats du laboratoire, une diminution de la réponse de l'hepcidine au LPS et à la turpentine chez les souris déplétées en macrophages.

Une approche alternative utilisée par plusieurs équipes pour connaître les types cellulaires mis en jeu dans ces régulations, et, en particulier, pour pouvoir reproduire *in vitro* l'induction de l'hepcidine au fer observée *in vivo*, consiste à cocultiver des hépatocytes et des macrophages ou des hépatocytes avec des cellules endothéliales et étudier les ARNm hepcidine produits par les hépatocytes en réponse à différents stimuli[169, 366].

D'un point de vue moléculaire, peu de données existent sur les facteurs de transcription agissant sur le promoteur du gène de l'hepcidine. Courselaud *et al.* ont réalisé une étude de promoteur classique par transfection, dans des lignées hépatomateuses, de constructions contenant des fragments de promoteur du gène humain ou du gène murin *Hepc1* dirigeant l'expression du gène rapporteur luciférase[54]. Les auteurs ont ainsi étudié le rôle des facteurs de transcription hépato-spécifiques C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) et HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) dans la régulation des gènes hepcidine au fer. Alors que C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sont capables d'induire l'activité luciférase, HNF4 est sans effet. De plus, des souris invalidées pour le gène *C/EBP $\alpha$*  dans le foie ont une surcharge en fer dans le foie<sup>14</sup> qui s'accompagne d'une diminution des taux d'ARNm hepcidine. Le gène *C/EBP $\alpha$*  étant induit dans le foie de souris ayant reçu un régime riche en fer, ce facteur de transcription pourrait être impliqué dans la régulation de l'hepcidine par le fer. En revanche, dans les souris KO *HNF4*, les transcrits hepcidine sont augmentés, suggérant un rôle inhibiteur de ce facteur de transcription sur les gènes hepcidine (pour une revue de la littérature sur les C/EBP, voir[325]).

Tout à fait récemment, Wang *et al.*[386] ont mis en évidence, de façon un peu inattendue, une nouvelle voie de transactivation de l'hepcidine en étudiant le phénotype de souris KO *SMAD4* (*Homo sapiens mothers against decapentaplegic homolog 4*) dont le gène est invalidé uniquement dans le foie. Ces souris sont surchargées en fer dans le foie et plusieurs autres organes. Le rôle de l'hepcidine étant alors bien connu, les auteurs ont étudié l'expression des gènes hepcidine dans ces souris et ont pu remarquer que leur expression était complètement réprimée. L'inhibition de l'expression de l'hepcidine, associée à une augmentation de *Dcytb*, *DMT1* et ferroportine dans le duodénum, explique probablement la surcharge en fer de ces animaux. Les auteurs ont alors montré que la surexpression de *SMAD4* active le promoteur *Hepc1* dans les hépatocytes et que cette activation se manifeste par des modifications épigénétiques de l'histone H3. *SMAD4* étant impliquée dans la voie de signalisation de TGF- $\beta$  et BMP (Bone Morphogenetic Protein) (pour revue, voir[244, 351]), les auteurs ont donc voulu tester le rôle de ces facteurs de croissance dans l'expression du gène hepcidine, rôle jusqu'alors inconnu, et ont montré qu'ils étaient capables d'induire l'expression du gène *Hepc1* et que cette induction est abolie en absence de *SMAD4*[386].

Trois autres protéines impliquées dans l'HH, HFE, RTf2 et HJV, jouent un rôle important dans la régulation de l'hepcidine par le fer, je vous en parlerai dans le chapitre « Hpcidine et désordres du métabolisme du fer ».

---

<sup>14</sup> La surcharge en fer dans les souris invalidées pour *C/EBP $\alpha$*  dans le foie n'a été étudiée que dans le foie, nous ne savons pas si d'autres organes accumulent du fer, comme on pourrait s'y attendre face à une diminution de l'hepcidine.

#### 4) Régulation du métabolisme du fer

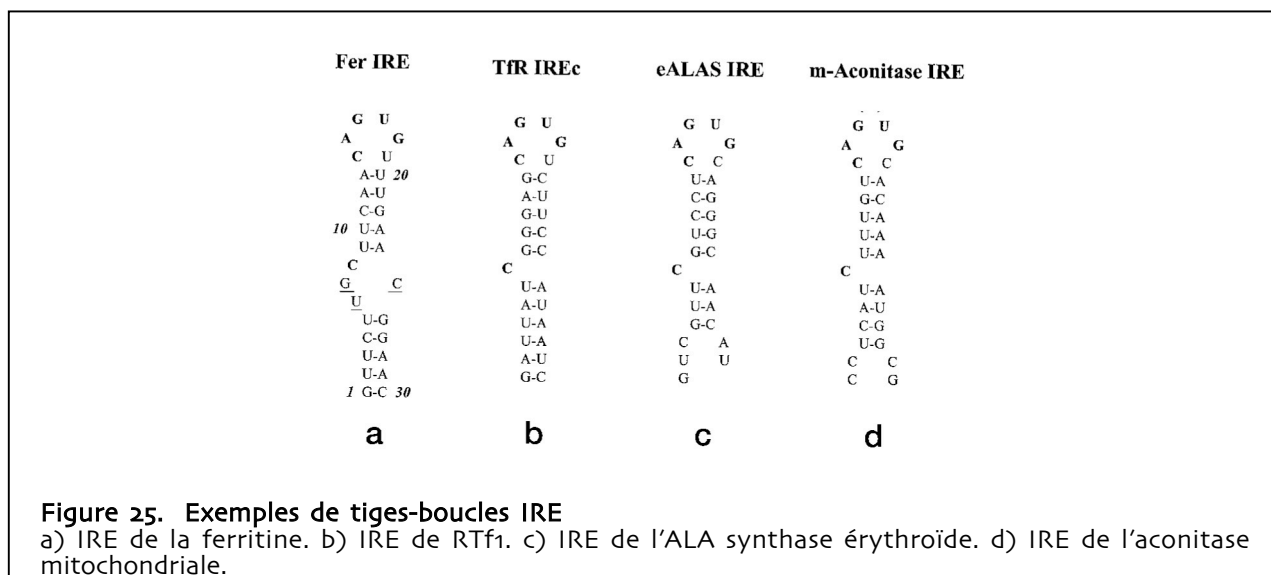
Deux systèmes de régulation du fer coexistent dans l'organisme :

Un système qui permet à l'intérieur même d'une cellule d'adapter l'entrée, le stockage et la sortie du fer selon les quantités présentes dans la cellule, le système IRP/IRE ;

Un système de régulation systémique qui permet aux différents organes consommateurs et/ou de stockage du fer, de dialoguer pour maintenir l'homéostasie. La nature de ce système de régulation a été réévaluée de nombreuses fois en fonction des nouvelles découvertes, de l'identification des gènes du métabolisme du fer et de leurs propriétés.

##### Système IRP/IRE

Au niveau de la cellule, un système permet de réguler de façon coordonnée l'expression post-transcriptionnelle de gènes en fonction du contenu en fer cellulaire. Cette régulation repose sur l'interaction de deux IRP (Iron Regulatory Protein) avec des motifs situés dans les régions 5' ou 3' non traduites (5'- ou 3'-UTR) des ARNm codant pour des protéines de transport (RTf1, DMT1, ferroportine), de métabolisme (aconitase mitochondriale, 5-aminolevulinate synthase) ou de stockage (ferritine) du fer. Ces motifs sont appelés IRE pour Iron Responsive Elements (pour revues, voir[82, 151, 296]). Les IRE sont constitués d'une tige stable d'environ 10 nucléotides interrompue par une base C non appariée située à cinq nucléotides de la boucle. La boucle est formée de la séquence conservée CAGUGN (Figure 25).



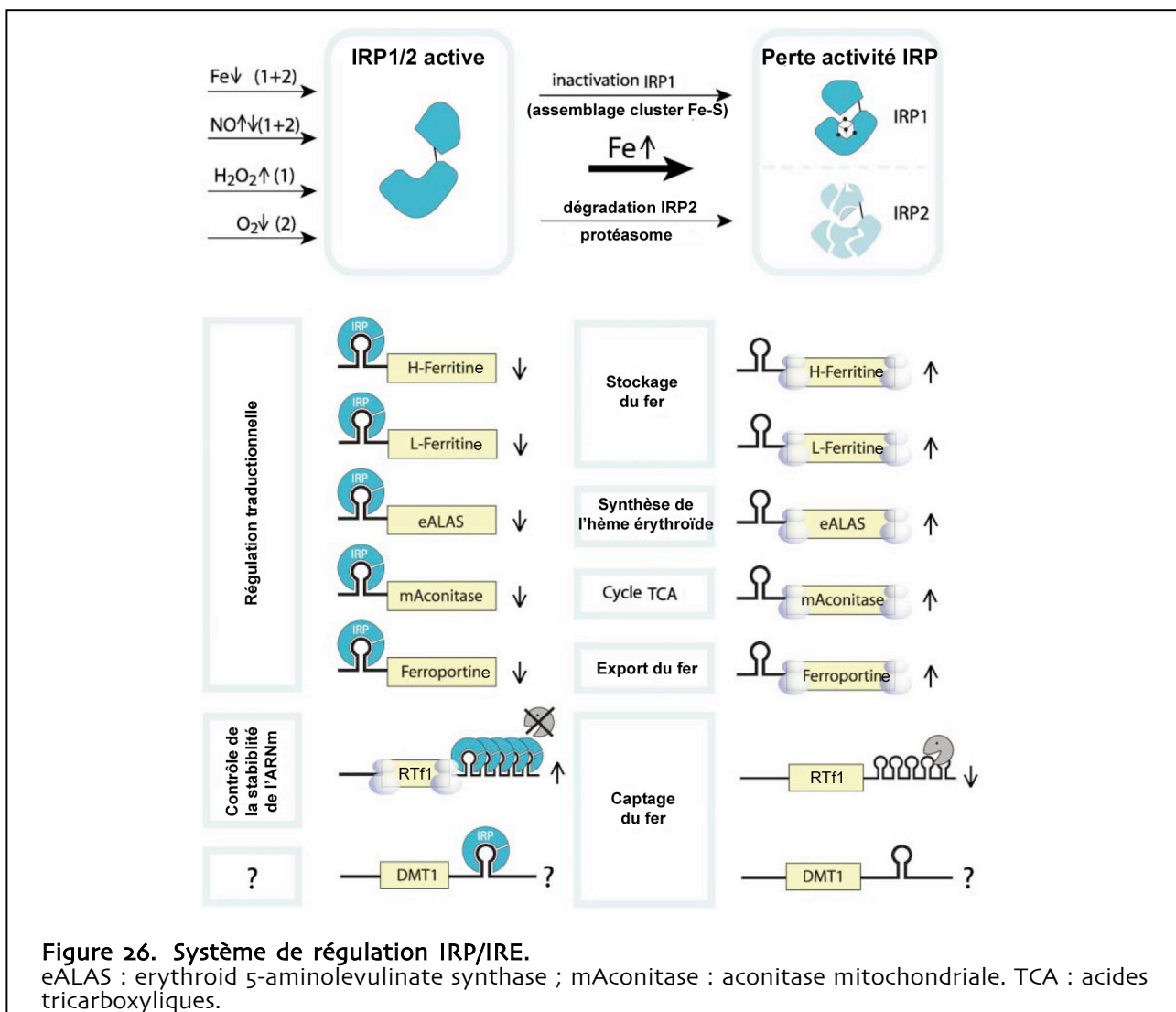
Lorsque les IRE sont situés en 5'-UTR, leur liaison avec les IRP inhibe la traduction du messager. À l'inverse, la liaison des IRP avec un 3'-UTR-IRE stabilise l'ARNm. Chez les mammifères, deux protéines IRP ont été identifiées. IRP1 aussi appelée aconitase cytosolique 1 (ACO1) possède un complexe fer-soufre (Fe-S). Quand le fer est abondant dans la cellule le complexe Fe-S peut se former et IRP1 a alors une activité aconitase[141, 155, 306]. Lorsque le fer vient à manquer, le complexe Fe-S est déstabilisé et la protéine acquiert alors une



activité de liaison aux IRE. IRP2 (ou IREB2 pour IRE-Binding protein 2) est homologue à 79% à IRP1, mais ne possède pas d'activité aconitase ni de complexe Fe-S. En présence de fer ou d'hème, IRP2 est dégradée par le protéasome[168] (Figure 26).

Ainsi la cellule prévient l'accumulation du fer soluble toxique grâce aux IRP, senseurs du fer, en augmentant le stockage du fer insoluble dans la ferritine (IRE en 5') et en diminuant l'entrée du fer dans la cellule médiée par TfR1 (IRE en 3'). À l'inverse, quand la cellule manque de fer, la ferritine est diminuée et, avec elle, les stocks de fer libérés et le captage du fer est augmenté.

Outre le fer, des expériences in vitro ont montré que les IRP sont sensibles à l'hypoxie[142, 143, 256] et au stress oxydant[34, 78, 385] suggérant un rôle plus large que celui de régulateurs du métabolisme du fer (Figure 26).



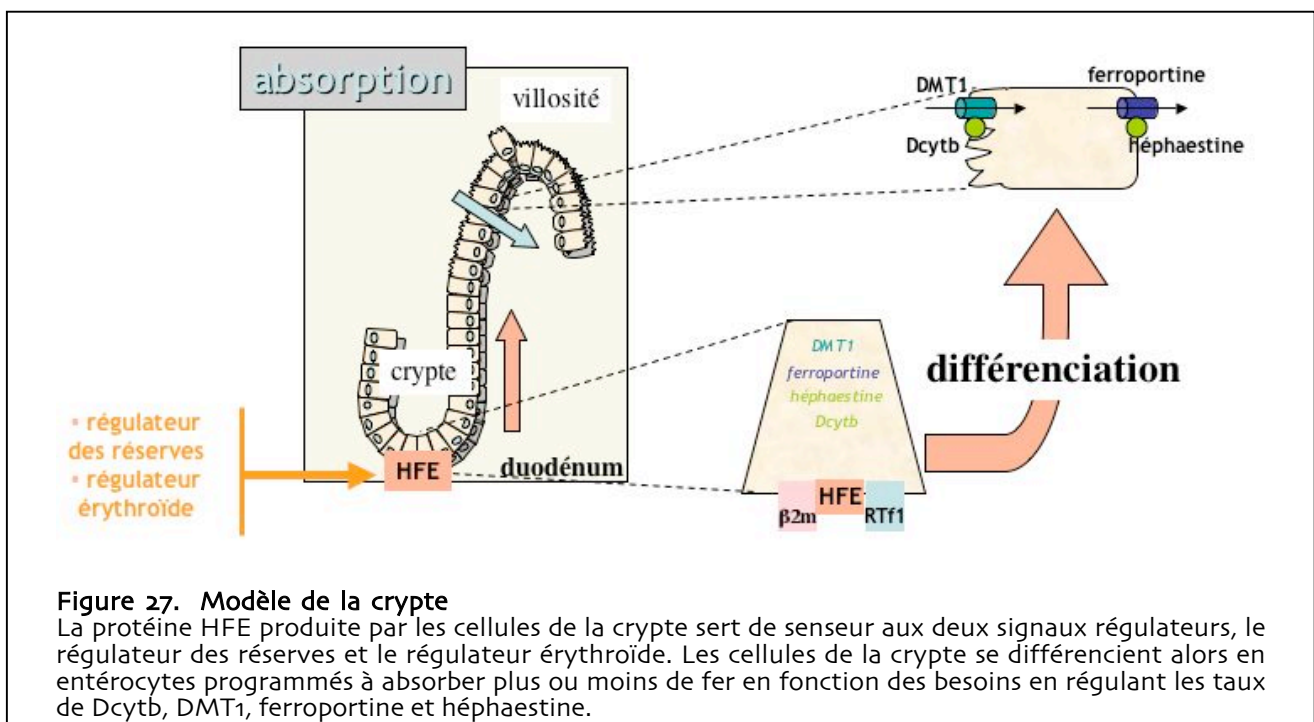
Le rôle des IRP a largement été étudié in vitro mais ce n'est que très récemment que l'implication des IRP in vivo est étudiée via la génération de souris KO *Irp1* et/ou *Irp2*. Les premiers résultats montrent que si les IRP sont essentiels au développement de l'organisme (l'absence totale d'*Irp1* et *Irp2* conduit à une létalité embryonnaire[345]), chaque *Irp* est capable de compenser, en partie, l'absence de l'autre *Irp*. En effet, les souris KO *Irp1* ne

présentent pas d'anomalies évidentes[255] et les souris KO *Irp2* présentent seulement une anémie microcytaire associée à une distribution anormale du fer entre les tissus[52, 112]. Il a également été décrit la présence d'une surcharge en fer cérébrale associée à une neurodégénérescence importante dans les souris KO *Irp2*[209], mais celle-ci n'est pas retrouvée dans un autre modèle souris KO *Irp2* (B. Galy *et al.*, résultats non publiés).

### Régulation systémique : modèle de la crypte

Il existe deux signaux de régulation importants pour l'absorption intestinale du fer, le régulateur indiquant les besoins en fer pour l'érythropoïèse (« le régulateur érythroïde») et celui indiquant l'état des réserves en fer (« le régulateur des réserves»)[95].

C'est la présence conjointe de HFE et RTf1 au niveau des cellules de la crypte de l'intestin[375] qui a permis l'élaboration, il y a plusieurs années, d'un modèle de régulation de l'absorption intestinale de fer dit « modèle de la crypte» qui repose sur une programmation des cellules de la crypte en fonction des signaux régulateurs (érythroïdes et réserves)[334] (Figure 27). C'est en migrant le long de l'axe crypto-villositaire que les cellules de la crypte se différencient et acquièrent leur propriété d'absorption. Les entérocytes matures, en fonction de la quantité de fer captée par les cellules de la crypte via RTf1, sont programmés à produire plus ou moins de protéines responsables de l'absorption de fer. En résulte une absorption du fer adaptée aux besoins. HFE, dans ce modèle, aurait un rôle de senseur du fer capable, via sa fixation à RTf1, de moduler la captation du fer dans les cellules de la crypte. Lorsque *HFE* est muté, la protéine n'est plus adressée à la membrane et la captation de l'holotransferrine au niveau de la crypte est diminuée[361, 375]. Les cellules se retrouvent alors en situation de privation artificielle en fer (malgré les réserves abondantes de l'organisme), entraînant une augmentation des acteurs de l'absorption intestinale du fer et donc l'hyperabsorption de fer qui caractérise cette maladie.



**Figure 27. Modèle de la crypte**

La protéine HFE produite par les cellules de la crypte sert de senseur aux deux signaux régulateurs, le régulateur des réserves et le régulateur érythroïde. Les cellules de la crypte se différencient alors en entérocytes programmés à absorber plus ou moins de fer en fonction des besoins en régulant les taux de Dcytb, DMT1, ferroportine et héphaestine.

Ce modèle, bien que séduisant, s'est vite trouvé confronté aux premières données expérimentales de la littérature étudiant le rôle de HFE dans des cellules en culture et montrant que *HFE* surexprimé diminuait en fait l'entrée de fer (par compétition avec l'holotransferrine pour la fixation à RTf1)[12, 38, 76, 318, 333, 376, 384], et que, par conséquent, *HFE* muté entraînait une surcharge en fer de la cellule (et non un état de déficit, comme dans le modèle de la crypte). De plus, plusieurs auteurs ont montré que les entérocytes de patients hémochromatosiques (ou de souris *Hfe*<sup>-/-</sup>) ne présentaient pas les caractéristiques de cellules carencées en fer[182, 269, 348]. Enfin, notons que le modèle de la crypte n'envisage qu'une régulation à long terme de l'absorption intestinale de fer (compte tenu qu'il faut plusieurs jours à un entérocyte de la crypte pour devenir mature) et que dans certaines situations physiopathologiques, la régulation de l'absorption se met en place très rapidement[106].

Les macrophages (rate, moelle, foie) jouent également un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du fer par leur fonction de relargage du fer lié à l'hème. Suite à l'observation de la présence de macrophages déficients en fer chez les patients hémochromatosiques, et compte tenu de la présence de la protéine HFE dans ces cellules[134, 302, 407], certains auteurs ont émis l'hypothèse que, l'absence de HFE à la membrane de ces cellules perturberait la captation de fer RTf1 dépendante, provoquant le déficit en fer de ces cellules. Là encore, une autre hypothèse peut être avancée faisant intervenir comme nous le verrons l'hepcidine.

## 5) Hémochromatose héréditaire (HH)

L'hémochromatose héréditaire (HH) est une pathologie génétique très fréquente. Elle peut se manifester sous deux formes, une forme classique (ou hémochromatose adulte) dont les symptômes apparaissent à l'âge adulte et une forme juvénile, plus rare, qui, comme son nom l'indique, est plus précoce mais également plus sévère (pour revue, voir[307]).

### L'hémochromatose classique

La première description de la maladie remonte à 1865, en France, où le Dr Armand Trousseau décrit des malades atteints de « diabète bronzé avec cirrhose ». C'est le médecin allemand Daniel von Recklinghausen qui introduit en 1889 le terme « hémochromatose » pour décrire le cas d'un patient atteint d'une cirrhose et dont le foie était pigmenté suite à une surcharge martiale. En 1935, Joseph Sheldon, gériatre anglais, rassemble les données de plus de 300 patients et conclut au caractère héréditaire de la maladie. Ce n'est que 40 ans plus tard, que l'équipe de Claude Simon, à Rennes, montre la liaison de la maladie au locus HLA[344].

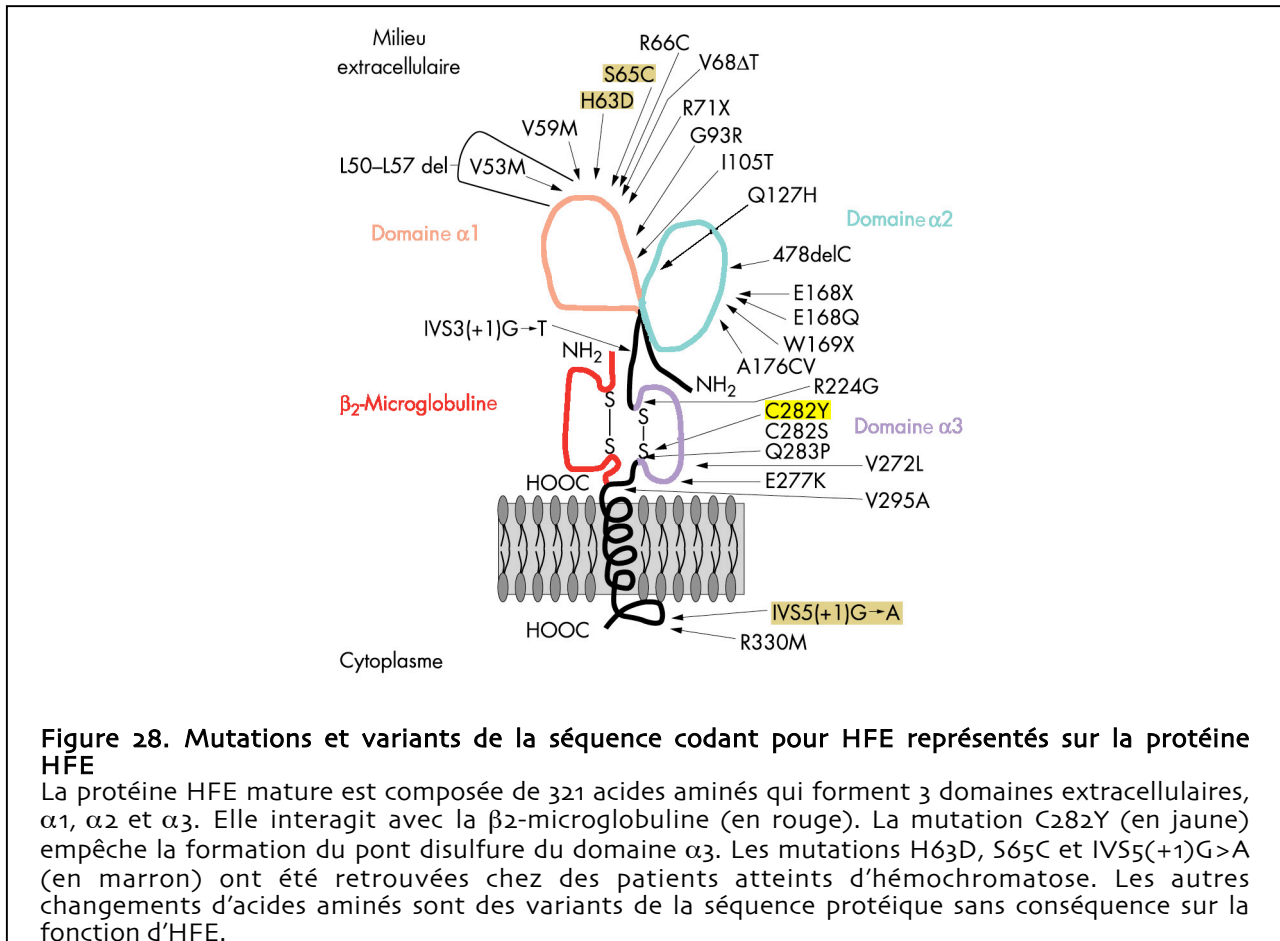
L'hémochromatose classique est une maladie autosomique récessive (sauf l'hémochromatose de type 4, voir plus loin). Elle se caractérise par une surcharge martiale progressive dans tout l'organisme et tout particulièrement dans le foie. Les premiers hépatocytes à se surcharger en fer sont les hépatocytes situés autour des espaces portes car le fer provient généralement de la veine porte suite à l'hyperabsorption intestinale. Les signes précurseurs d'une accumulation de fer sont l'augmentation de la saturation de la transferrine puis l'augmentation de la ferritine sérique. Les symptômes de la maladie sont peu spécifiques, ce qui en fait une maladie difficile à diagnostiquer en absence de mesure du fer circulant. L'accumulation du fer dans les organes est délétère et entraîne leur dysfonctionnement. Les premiers symptômes de l'hémochromatose peuvent être la fatigue, des douleurs articulaires. Par la suite, la surcharge en fer s'aggravant, apparaissent alors une hépatomégalie, une atteinte cardiaque, parfois du diabète, des perturbations hormonales, une pigmentation de la peau. Pour éliminer la surcharge en fer, la mesure essentielle du traitement est la saignée. La maladie touche principalement les hommes, les femmes étant protégées par la perte régulière de sang lors des menstruations.

#### ◆ L'hémochromatose HFE-dépendante (OMIM n° 235200)

En 1996, la société Mercator Genetics a participé à la découverte de l'implication du gène *HFE* dans 80% des hémochromatoses dites « classiques »[87]. Le gène *HFE* est localisé en 6p21.3 chez l'homme. La protéine HFE est une molécule atypique de la famille des molécules du CMH de classe I qui se lie à la  $\beta$ 2-microglobuline (voir paragraphe « HFE »).

De nombreux patients atteints d'hémochromatose présentent la mutation C282Y empêchant la protéine HFE de se lier à la  $\beta$ 2-microglobuline et donc d'être adressée à la membrane[88]. Son implication dans l'hémochromatose ne fait aucun doute comme le prouve la surcharge en fer des modèles murins (KO complet du gène *Hfe* et KI présentant la mutation

C282Y<sup>15</sup>][16, 224, 410]. D'autres mutations du gène *HFE*, plus rares, ont été décrites. Les mutations H63D et S65C sont associées à une surcharge en fer peu sévère. La mutation affectant un site d'épissage (IVS5+1 G/A) a été retrouvée chez des patients qui ne sont pas d'origine d'Europe du Nord mais d'origine vietnamienne[347](Figure 28) (pour revue sur les variants et mutations de *HFE*, voir[313]).



**Figure 28. Mutations et variants de la séquence codant pour HFE représentés sur la protéine HFE**  
 La protéine HFE mature est composée de 321 acides aminés qui forment 3 domaines extracellulaires,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ . Elle interagit avec la  $\beta 2$ -microglobuline (en rouge). La mutation C282Y (en jaune) empêche la formation du pont disulfure du domaine  $\alpha 3$ . Les mutations H63D, S65C et IVS5(+1)G>A (en marron) ont été retrouvées chez des patients atteints d'hémochromatose. Les autres changements d'acides aminés sont des variants de la séquence protéique sans conséquence sur la fonction d'HFE.

L'hémochromatose HFE-dépendante est la cause plus fréquente de surcharge en fer génétique dans les populations de race blanche[253]. L'allèle C282Y à l'état homozygote est présent chez trois sujets sur 1000. En effet, très fréquente en Europe du Nord, cette mutation pourrait avoir une origine celtique[236].

Récemment, cette maladie s'est avérée être hétérogène, impliquant, comme nous allons le voir, différents gènes. En effet, *HFE* est muté dans 80% des hémochromatoses classiques. Reste 20% de ces hémochromatoses qui sont dues à des mutations dans d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer. La découverte de nouveaux gènes impliqués dans l'hémochromatose a conduit à la classification des hémochromatoses en fonction du gène muté. Ainsi, l'hémochromatose HFE-dépendante est dite de type I, l'hémochromatose juvénile de type II, l'hémochromatose liée à RTf2, de type III et celle liée à la ferroportine, de

<sup>15</sup> J'ai choisi de présenter les mutations par les changements provoqués au niveau protéique plutôt que génomique car cette appellation est la plus connue.

type IV. Cette nomenclature est peu à peu abandonnée car jugée trop restrictive (voir plus loin).

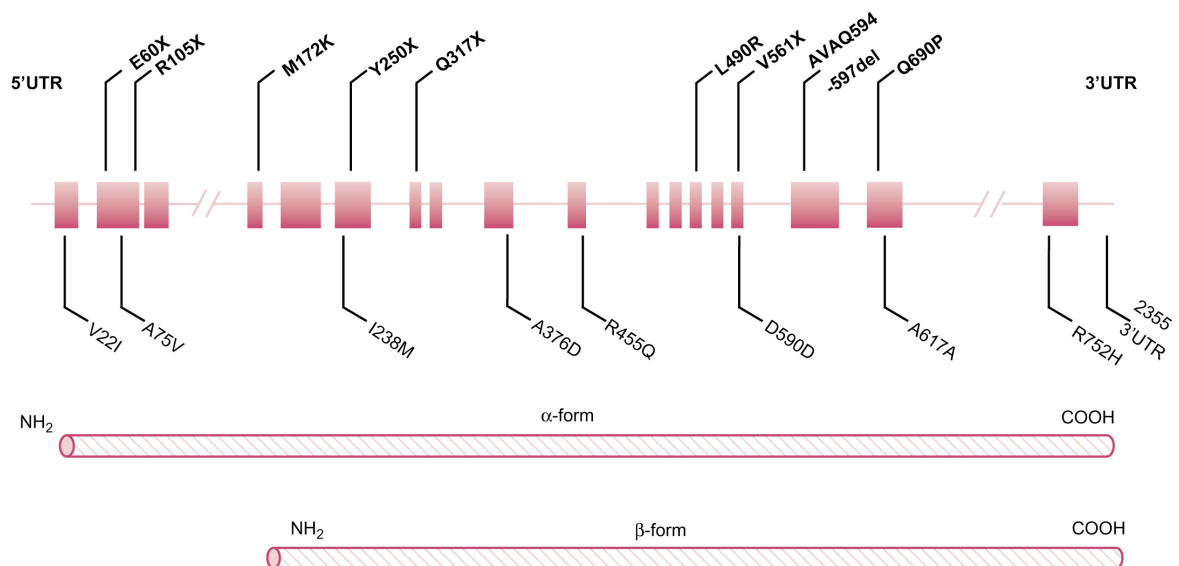
◆ Mutations du gène *TFR2* (OMIM n° 604720)

Des mutations dans le gène codant pour RTf2 (*TFR2*, localisé en 7q22 chez l'homme)[35] sont responsables de l'hémochromatose dite de type III qui a le même tableau clinique que celle impliquant HFE (Figure 29). RTf2 est une protéine membranaire dont le gène *TFR2* est fortement exprimé dans le foie. Deux transcrits sont produits à partir du gène *TFR2* : un transcrit  $\alpha$  et un transcrit  $\beta$  (voir paragraphe « RTf2 »).

De façon intéressante, alors que certaines mutations touchent à la fois les séquences codant pour les deux transcrits  $\alpha$  et  $\beta$  (par exemple la mutation Y250X), d'autres ne perturbent que l'un des deux transcrits (par exemple la mutation E60X)[327] (Figure 29). À partir de l'étude phénotypique des patients portant la mutation E60X ou Y250X, Roetto *et al.* ont émis l'hypothèse que la persistance d'un transcrit  $\beta$  non affecté pouvait être associé à une hémochromatose moins sévère. En effet, les mutations du gène *TFR2* conduisent à des expressions phénotypiques variables. Cette hypothèse est maintenant remise en cause par l'étude de patients portant la mutation R105X chez qui le transcrit  $\beta$  n'est pas modifié, mais pour qui la surcharge en fer est apparue très tôt[210].

De manière générale, les études récentes de mutations de gènes chez les patients atteints d'hémochromatose montrent que des mutations de *TFR2* sont retrouvées chez des patients très jeunes[312] avec parfois la présence d'hypogonadisme mais dont la progression de la surcharge est plus lente que dans la forme juvénile[124, 247]. Ce phénomène peut être en partie attribué à une meilleure information sur la maladie et sur une plus grande disponibilité des tests biochimiques pour évaluer la surcharge martiale (ferritine sérique, saturation de la transferrine).

Très récemment, Pietrangelo *et al.* ont décrit deux patients, un frère et une sœur, atteints d'hémochromatose juvénile liée à des mutations dans les gènes *HFE* et *TFR2*[309]. Cet article a montré pour la première fois qu'on ne pouvait pas restreindre l'hémochromatose juvénile à des mutations dans les gènes *HJV* et *HAMP* (voir plus loin). Cette découverte a remis en question la classification initialement proposée. En effet, il faut maintenant envisager que des mutations dans le gène *HFE* ou *TFR2* peuvent conduire à une hémochromatose adulte ou à une hémochromatose juvénile.



Mutation	Origine	Phénotype	Références
E60X	Italie (Sud)	HC	[327]
R105X	France (Nord)	HC	[210]
M172K	Italie (Centre)	HC	[327]
Y250X	Italie (Sud)	HC	[35, 312]
Q317X	Italie (Sud)	HC + HFE CY : HJ	[309]
L490R	Japon	HC	[192]
V561X	Japon	HC	[191]
AVAQ 594-597 del	Italie (Nord), Japon	HC (+ hypogonadisme)	[124, 148]
Q690P	Portugal	HC + hypogonadisme	[247]

**Figure 29. Mutation dans le gène *TFR2* codant pour le récepteur transferrine 2**

En haut est représenté le gène *TFR2* et les deux isoformes produites par ce gène en dessous. Les mutations impliquées dans l'apparition d'une hémochromatose sont indiquées au-dessus du gène en gras, les polymorphismes, en dessous du gène.

À gauche du tableau, sont indiquées les modifications de la protéine générées par les mutations. En rouge sont indiquées les mutations non-sens, en bleu, les mutations faux-sens. HFE CY : patient hétérozygote pour la mutation C282Y du gène *HFE*.

Là encore, pour l'hémochromatose liée à RTf2, plusieurs modèles murins ont été établis : un modèle KI introduisant la mutation homologue à la mutation humaine Y250X chez la souris (Y245X)[99] et un modèle d'inactivation, souris KO *Tfr2*[381]. Ces deux modèles murins reproduisent les anomalies de surcharge en fer observées chez les patients.

◆ Mutations du gène *SLC40A1* (OMIM n° 604653)

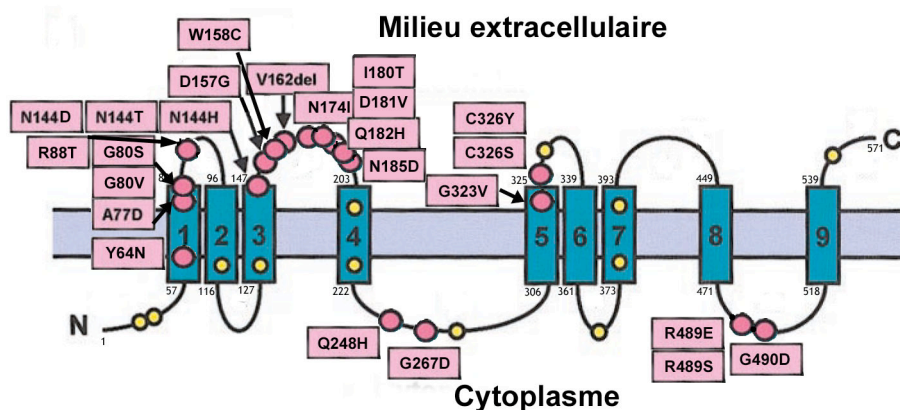
L'hémochromatose de type IV, liée aux mutations du gène codant pour la ferroportine (*SLC40A1*, anciennement *SLC11A3* localisé chez l'homme en 2q32), est particulière à plusieurs titres. Elle se transmet suivant un mode autosomique dominant alors que les hémochromatoses liées à *HFE* ou *RTf2* sont autosomiques récessives. Dans cette forme d'hémochromatose, la surcharge en fer est le plus souvent d'abord macrophagique puis seulement elle atteint les hépatocytes. La présence d'une anémie et donc d'une faible tolérance aux phlébotomies est retrouvée chez certains patients. Les patients mutés pour *SLC40A1* présentent moins souvent des perturbations hépatiques que les patients mutés dans le gène *HFE* qui développent souvent des fibroses et cirrhoses. Cette différence pourrait être due à la présence du fer préférentiellement dans les macrophages, ce fer étant moins toxique pour l'organisme[412].

Le plus souvent, il s'agit de substitutions, touchant probablement des régions critiques pour la localisation et la fonction de la protéine (Figure 30). La mutation entraînant la délétion de la valine 162 est la mutation la plus souvent rencontrée. On remarque qu'il n'a pas été trouvé de mutations STOP ou « décalage de lecture » chez les patients (Figure 30). Ceci suggère que les mutations de la ferroportine associées à l'hémochromatose ne sont pas de simples mutations perte de fonction mais qu'elles pourraient perturber les interactions protéine-protéine.

Il a récemment été proposé que les mutations de la ferroportine peuvent être séparées en deux catégories[63, 77, 232, 338] :

- mutations conduisant à une mauvaise localisation de la protéine dans des vésicules intracellulaires. Ces mutations entraîneraient l'absence d'export cellulaire de fer.
- mutations conduisant à une perte de régulation de la ferroportine par l'hepcidine (Figure 30).





Mutation	Origine	Phénotype	Références
Y64N	Canada français	Ferritine élevée, sat Tf élevée; fer dans hépatocytes et macrophages	[319]
A77D	Italie, Australie	Ferritine élevée, sat Tf normale; fer dans macrophages	[266, 349]
G80S G80V	Italie	Ferritine élevée, sat Tf normale	[41, 308]
R88T	Espagne	Ferritine élevée, sat Tf élevée; fer dans hépatocytes et macrophages	[14]
N144H N144T N144D	Hollande Îles Salomon Australie	Ferritine élevée, sat Tf élevée; fer dans hépatocytes et macrophages	[10, 288, 289, 378]
D157G	France	Ferritine élevée, sat Tf normale	[154]
W158C	Grande-Bretagne	Ferritine élevée, sat Tf normale, fer dans macrophages	[136]
V162del	Grande-Bretagne, Italie, Australie, Sri Lanka, Grèce	Ferritine élevée, sat Tf normale à basse	[40, 70, 328, 377, 379]
N174I	Italie		[308]
I180T	Espagne	Ferritine élevée, sat Tf élevée; fer dans hépatocytes et macrophages	[14]
D181V	Italie	Ferritine élevée, sat Tf normale ; fer dans hépatocytes et macrophages	[41]
Q182H	France	Ferritine élevée, sat Tf normale + cataracte	[154]
N185D	Canada (origine Scandinavie)	Ferritine élevée, sat Tf normale puis augmentation de la sat Tf	[268]
Q248H	Afro-Américain, Afrique du Sud, Zimbabwe, Swaziland	Polymorphisme? Ferritine élevée, sat Tf normale; fer dans macrophages (+ hépatocytes)	[24, 130]
G267D	Chine	Ferritine élevée, sat Tf normale	[41]
G323V	France	Ferritine élevée, sat Tf normale + cataracte	[154]
C326S C326Y	Europe Thaïlande	Ferritine élevée, sat Tf élevée; fer dans hépatocytes et macrophages	[340, 372]
R489E R489S	Grande-Bretagne, Japon	Ferritine élevée, sat Tf normale; fer dans (hépatocytes et) macrophages	[136, 193]
G490D	Chine (+ La Réunion?)	Ferritine élevée, sat Tf élevée; fer dans hépatocytes et macrophages	[174]

**Figure 30. Mutations dans le gène *SLC40A1* codant pour la ferroportine**

La ferroportine est représentée selon une des hypothèses concernant sa topologie (9 domaines transmembranaires). Les cystéines sont indiquées d'un rond jaune. Chaque mutation est figurée par un rond rose.

À gauche du tableau sont indiquées les modifications de la protéine générées par les mutations. En violet, sont indiquées les mutations définies comme perte de fonction par des expériences in vitro et en rouge celles considérées comme produisant une protéine insensible à l'hepcidine[63, 77, 232, 338]. Sat Tf : saturation de la transferrine.

Donovan *et al.*[74] ont récemment créé un modèle KO conditionnel de la ferroportine utilisant le système Cre/LoxP. Le KO total de la ferroportine est létal embryonnaire, la ferroportine jouant un rôle essentiel dans le transport placentaire de fer[74]. Les souris dont le gène codant pour la ferroportine est invalidé uniquement dans le duodénum sont anémiques montrant le rôle essentiel de la ferroportine au niveau du duodénum. De façon surprenante, les souris hétérozygotes  $Fpn^{null/+}$  ne reproduisent pas les anomalies du fer observées chez les patients : ces souris n'ont pas d'anomalies apparentes avant l'âge de 6 mois et, à 1 an, le fer s'accumule dans les macrophages et la quantité de fer diminue dans le foie de ces souris[74]. Les différences entre le phénotype des souris hétérozygotes  $Fpn^{null/+}$  et la maladie développée par les patients semblent indiquer que les mutations observées chez les patients ne sont pas de simples mutations perte de fonction. La génération de souris portant les mutations homologues à celles retrouvées chez les patients (développées par deux laboratoires : celui d'A. Pietrangelo et celui de M. Muckenthaler) nous apportera certainement des réponses quant au mécanisme conduisant à l'installation de l'hémochromatose chez ces patients.

## L'hémochromatose juvénile

La dernière forme d'hémochromatose, la forme juvénile, est une maladie autosomique récessive dont les symptômes apparaissent plus précocement que les autres types d'hémochromatose (avant 30 ans contre 40-50 ans pour les hémochromatoses classiques) et dont le phénotype est beaucoup plus sévère, avec une surcharge martiale plus importante et des atteintes cardiaques et endocriniennes graves. Elle se caractérise notamment par la présence d'hypogonadisme gonadotrophique et les patients meurent généralement jeunes de leur atteinte cardiaque s'ils ne sont pas traités par de nombreuses saignées ou par des chélateurs de fer<sup>16</sup>. L'hémochromatose juvénile, contrairement à la forme adulte ou classique, touche autant les femmes que les hommes.

La première description d'un cas d'hémochromatose juvénile date de 1932, elle était décrite alors comme une « cirrhose pigmentaire avec infantilisme, insuffisance cardiaque et aplasies endocriniennes multiples »[25]. La recherche du gène impliqué dans l'hémochromatose juvénile dure depuis de nombreuses années : en 1999 Roetto *et al.* ont établi un lien entre la maladie et le locus génomique 1q21[326]. Ce n'est que depuis 2004 que le gène *HJV* a pu être identifié dans cette région comme étant muté chez les patients avec l'aide de la société Xenon genetics[297]. Entre temps, Roetto *et al.* avaient identifié en 2003 des mutations dans un autre gène, le gène *HAMP* codant pour l'hepcidine, chez quelques patients atteints d'hémochromatose juvénile[329].

### ◆ Mutations du gène *HJV* (OMIM n° 608374)

Dans la majorité des cas, c'est le gène de l'hémojuvéline (noté *HJV* ou *RGMc*) situé en 1q21 qui est muté chez les patients atteints d'hémochromatose juvénile. L'hémojuvéline appartient à la famille RGM (Repulsive Guidance Molecule), elle possède une ancre GPI qui, une fois clivée entraîne la libération d'une forme soluble de l'hémojuvéline. Le gène est exprimé dans le foie, le muscle et le cœur (voir paragraphe « Hémojuvéline »).

De nombreuses mutations ont été décrites depuis 2004 (Figures 31 et 32). La mutation la plus souvent rencontrée chez les patients est celle conduisant à la substitution d'une glycine en position 320 par une valine (G320V). Les mutations décrites touchent toutes les régions codantes. Des mutations à l'état hétérozygote de *HJV* ont été retrouvées chez des patients homozygotes pour la mutation C282Y du gène *HFE*. Chez ces patients, la présence d'un allèle muté supplémentaire dans le gène *HJV* est associée à une aggravation de la surcharge en fer[211] (voir « Gènes modificateurs de l'hémochromatose »).

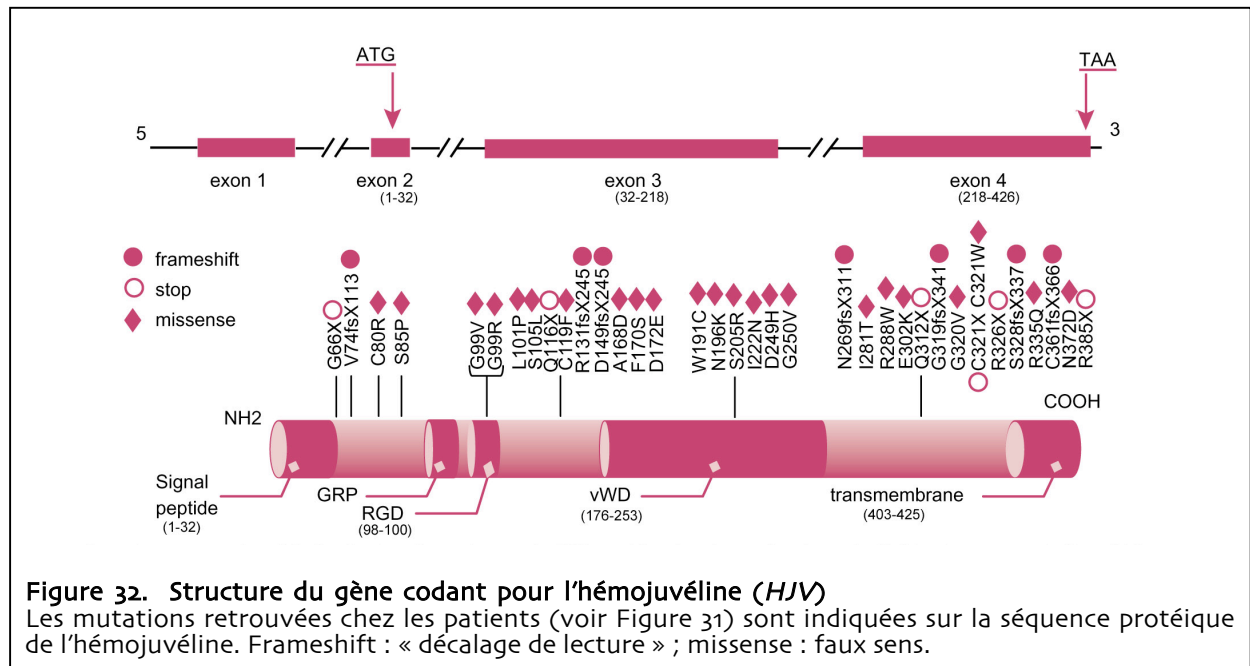
---

<sup>16</sup> Les chélateurs de fer sont utilisés en cas de surcharge en fer sévère ou lorsque la surcharge en fer est accompagnée d'une anémie, auquel cas, les saignées sont inappropriées (dans les thalassémies par exemple). Le chélateur le plus souvent utilisé est le sidérophore desferrioxamine (DFO). L'inconvénient de la DFO est qu'elle passe difficilement la barrière intestinale et a une demi-vie courte. Elle doit donc être administrée par infusions sous-cutanées répétées. De plus, la DFO chélate mal le fer contenu dans le cœur. De nombreuses équipes de recherche et laboratoires pharmaceutiques développent actuellement de nouveaux chélateurs de fer (voir revue[175]).

Mutation	Origine	Phénotype		Références
		Hétérozygote	Homozygote	
G320V	Canada, France, Italie, Etats-Unis, Irlande, Australie, Europe de l'Est	G320V/Q116X : <b>HJ</b> G320V/ I122N : <b>HJ</b> G320V/C321W : <b>HC</b> + HFE YY : aggrave surcharge	<b>HJ</b>	[59, 118, 206, 211, 216, 217, 297, 380]
G66X	Roumanie		<b>HJ</b>	[171]
V74fsX113	Grande-Bretagne	V74fsX113/N269fsX311 : <b>HJ</b>		[206]
C80R	Etats-Unis, Australie	C80R/L101P : <b>HJ</b> C80R/R326X : <b>HJ</b>		[217, 380]
S85P	Italie		<b>HJ</b>	[206]
G99V G99R	Grèce, Albanie	G99R/L101P : <b>HJ</b>	<b>HJ</b>	[206, 297]
L101P	France, Albanie, Etats-Unis	G99R/L101P : <b>HJ</b> C80R/L101P : <b>HJ</b> + HFE YY : aggrave surcharge	<b>HJ</b>	[206, 211, 217]
S105L	France	+ HFE YY : aggrave surcharge		[211]
Q116X	Irlande	G320V/Q116X : <b>HJ</b>		[59]
C119F	Europe de l'Est		<b>HJ</b>	[118]
R131fsX245	Italie		<b>HJ</b>	[206]
D149fsX245	Italie	+ HFE CY : pas de phénotype	<b>HJ</b>	[27, 206]
A168D	Australie		<b>HJ</b>	[206]
F170S	Italie		<b>HJ</b>	[206]
D172E	Italie	D172E/G319fsX341 : <b>HJ</b>		[206]
W191C	Italie		<b>HJ</b>	[206]
N196K	Italie	+ HFECY HD : <b>HC</b>		[27]
S205R	Italie	S205R/G250V : <b>HJ</b>		[206]
I122N	Canada	G320V/ I122N : <b>HJ</b>	<b>HJ</b>	[217, 297]
D249H	Japon		<b>HSA</b>	[191]
G250V	Italie	S205R/G250V : <b>HJ</b>		[206]
N269fsX311	Grande-Bretagne	V74fsX113/N269fsX311 : <b>HJ</b>		[206]
I281T	Grèce, Chine	I281T/C321X : <b>HJ</b>	<b>HSA</b>	[157, 297]
R288W	France		<b>HJ</b>	[93, 206]
E302K	France	+ HFE YY : aggrave surcharge		[211]
Q312X	Japon		<b>HSA</b>	[191]
G319fsX341	Italie	D172E/G319fsX341 : <b>HJ</b>		[206]
C321X C321W	Chine, Etats-Unis	I281T/C321X : <b>HJ</b> G320V/C321W : <b>HC</b>		[157, 216]
R326X	Grèce, Australie	C80R/R326X : <b>HJ</b>	<b>HJ</b>	[297, 380]
S328fsX337	Europe de l'Est		<b>HJ</b>	[118]
R335Q	France	+ HFE YY : aggrave surcharge		[211]
C361fsX366	Grèce		<b>HJ</b>	[297]
N372D	France	+ HFE YY : aggrave surcharge		[211]
R385X	Italie		<b>HJ</b>	[206]

**Figure 31. Mutations du gène codant pour l'hémojuvénine (HJV)**

À gauche sont indiquées les modifications de la protéine générées par les mutations. Les mutations « décalage de lecture » sont figurées en vert. Les substitutions non sens (STOP) sont figurées en marron et les substitutions faux sens en rouge. HJ : hémochromatose juvénile ; HC : hémochromatose classique ; HSA : hémochromatose sévère dont les premiers symptômes apparaissent à l'âge adulte. HFE C : allèle sauvage en position 282 ; HFE Y : allèle muté C282Y ; HFE H : allèle sauvage en position 63 ; HFE D : allèle muté H63D



Certains patients présentant des mutations du gène *HJV* à l'état homozygote ont une surcharge en fer plus modérée, avec apparition tardive des symptômes[191], atténuant encore les frontières entre l'hémochromatose classique et juvénile.

Deux modèles murins d'inactivation du gène *Hjv* ont été publiés au même moment[158, 287]. Dans ces deux modèles KO, on retrouve la surcharge en fer massive observée chez les patients.

#### ◆ Mutations du gène *HAMP* (OMIM n° 606464)

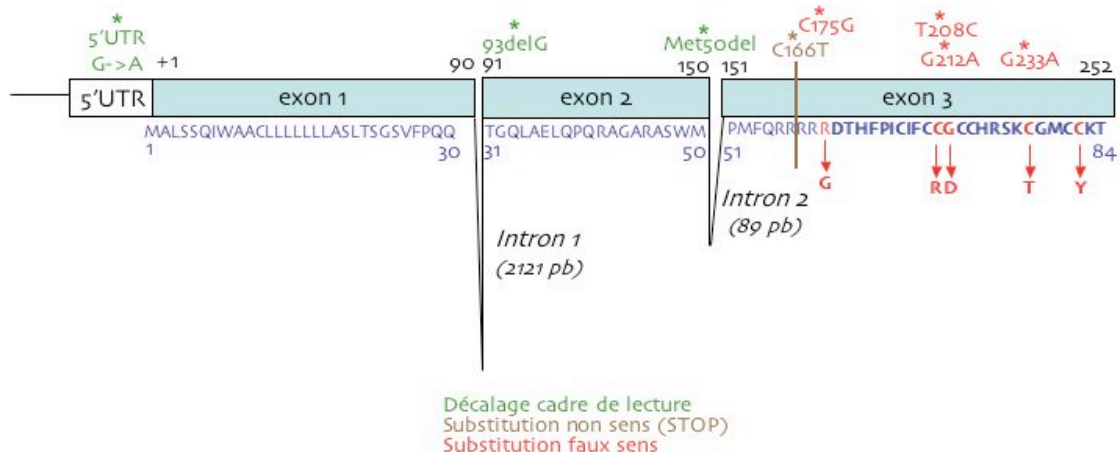
Des mutations du gène codant pour l'hepcidine (*HAMP*, localisé en 19q13 chez l'homme) ont été retrouvées à l'état homozygote chez des patients atteints d'hémochromatose juvénile. Ces mutations, qui représentent des cas très rares, sont détaillées dans la [Figure 33](#).

Les mutations identifiées dans la région correspondant au propeptide entraînent soit un décalage de phase de lecture, soit un arrêt de la traduction[246, 329]. De façon plus intéressante, des mutations de substitution ont été retrouvées dans la région codant pour le peptide mature. Ces mutations permettent d'identifier les régions importantes dans la fonction du peptide. Il est ainsi évident que les cystéines sont essentielles à cette fonction puisque deux cystéines sont mutées chez des patients atteints d'hémochromatose juvénile[68, 329]. Une mutation de la dernière cystéine a été retrouvée chez un patient hétérozygote composite portant également la mutation R59G (qui pourrait perturber le site de clivage de l'hepcidine mature) associée à une hémochromatose adulte[28]. Une autre mutation substitutive touche une glycine située entre 2 cystéines, perturbant donc ainsi probablement les ponts disulfures. La glycine ayant un encombrement stérique très faible, on peut s'attendre à ce que l'acide aspartique qui remplace cette glycine chez le patient empêche la formation des ponts disulfures adjacents[254].

À l'état hétérozygote, les mutations dans le gène codant pour l'hepcidine sont le plus souvent sans effet, mais la présence de ces mutations chez des patients atteints

d'hémochromatose classique peut aggraver la surcharge martiale[15, 170, 254] (voir « Gènes modificateurs de l'hémochromatose »).

Enfin, notons qu'il a été retrouvé un mode de transmission digénique (patients ayant une mutation à l'état hétérozygote pour le gène *HFE* et une mutation à l'état hétérozygote pour le gène *HAMP*) à l'origine d'hémochromatose ou simplement d'augmentation de la ferritine, indiquant des réserves en fer trop élevées[15, 170, 254].



Mutation	Protéine	Phénotype		Références
		Hétérozygote	Homozygote	
93delG		pas de phénotype	HJ	[329]
Met50del		pas de phénotype + HFE CY: HJ		[254]
5'UTR G>A		pas de phénotype	HJ	[246, 314]
C166T	R56X	pas de phénotype + HFE YY: aggrave surcharge	HJ	[170, 329]
C175G	R59G	pas de phénotype + HFE YY: aggrave surcharge R59G/C82Y: HC	HC	[28, 170]
T208C	C70R	pas de phénotype	HJ	[330]
G212A	G71D	pas de phénotype + HFE CY: ferritine élevée + HFE Y: aggrave surcharge		[15, 170, 254]
G233A	C78T	pas de phénotype	HJ	[68]
	C82Y	R59G/C82Y: HC		[28]

**Figure 33. Mutations du gène humain de l'hepcidine (*HAMP*)**

Le gène *HAMP* est formé de 3 exons codant pour un pré-pro-peptide de 84 acides aminés dont la séquence est indiquée sous le gène, en bleu. Le peptide mature de 25 acides aminés est indiqué en gras. Les mutations « décalage de lecture » sont figurées en vert. Les substitutions « non sens » (STOP) sont figurées en marron et les substitutions « faux sens » en rouge. HJ = hémochromatose juvénile. HC = hémochromatose classique. HFE CY : patient hétérozygote pour la mutation C282Y. HFE YY : patient homozygote pour la mutation C282Y. HFE HD : patient hétérozygote pour la mutation H63D.

Comme nous l'avons vu, le modèle KO *Usp2* qui présente un déficit fonctionnel en *Hepc1* et *Hepc2* développe les mêmes anomalies du fer que les patients atteints d'hémochromatose juvénile mais l'absence d'*Usp2* entraîne une forte létalité périnatale (voir chapitre « Hépécidine »). Le gène *Hepc1* étant plus proche du gène humain, nous avons récemment développé des souris KO *Hepc1* afin de disposer d'un modèle d'hémochromatose juvénile liée à l'hépécidine plus facile à étudier (voir « Résultats complémentaires »).

## Gènes modificateurs de l'hémochromatose

La notion de l'existence de gènes modificateurs pour l'hémochromatose repose sur le fait que, si l'hémochromatose est une maladie génétique de très forte prévalence, sa pénétrance reste toutefois très incomplète<sup>17</sup>[6, 23, 374] laissant suspecter l'existence de facteurs environnementaux et de gènes modificateurs importants pour l'expressivité du phénotype. En effet, la présence de la mutation C282Y du gène HFE à l'état homozygote peut être associée à une absence de phénotype[272], une hémochromatose classique, voire, comme évoqué précédemment, à une hémochromatose sévère pouvant apparaître précocement. Parmi les facteurs environnementaux, c'est essentiellement le régime alimentaire et la prise d'alcool qui peut influencer la surcharge en fer de l'organisme.

Nous avons vu que, souvent, la présence d'une mutation à l'état hétérozygote dans les gènes *TFR2*[26]<sup>18</sup>, *HJV*[27, 211] et *HAMP*[15, 170, 254] chez des patients homozygotes pour la mutation C282Y de *HFE* pouvait aggraver la surcharge martiale de ces patients. Ces résultats montrent que *TFR2*, *HJV* et *HAMP* sont des gènes modificateurs de l'hémochromatose. Il a également été montré que le polymorphisme Hp 2-2 de l'haptoglobine était associé à une plus grande surcharge en fer parmi les patients homozygotes C282Y[364].

Chez la souris, la surcharge en fer est très dépendante du fond génétique[51, 80], ainsi, une souris mâle sauvage de fond génétique DBA/2 a deux fois plus de fer hépatique qu'une souris mâle de fond génétique C57BL/6[55]. Cette influence du fond génétique est retrouvée lorsque le gène *Hfe* est invalidé. Ainsi, plusieurs études ont montré que les quantités de fer hépatique variaient dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> selon le fond génétique[79, 98].

Deux approches ont été menées pour identifier les gènes modificateurs de l'hémochromatose liée à *Hfe* chez la souris. Une première approche par gène candidat consiste à croiser des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> avec des souris invalidées pour des gènes connus pour leur implication dans le métabolisme du fer. Cette approche a permis d'établir une liste de gènes dont l'invalidation entraîne la diminution (*Heph*, *DMT1*[225], *Hp*[357]) ou l'augmentation (*β2m*, *TfR1*[225], *Hepc1* et *Hepc2* : modèle KO *Usf2*[285]) de la surcharge en fer hépatique des souris *Hfe*<sup>-/-</sup>.

Une autre approche a été utilisée par Bensaid *et al.*[21] afin de déterminer quels gènes pouvaient influencer la surcharge en fer de souris KO *Hfe*. Les auteurs ont croisé deux lignées de souris KO *Hfe*, sur fond génétique pur C57BL/6 ou DBA/2, et étudié la population F2 issue de ces croisements. Chaque animal de cette population F2 hérite en effet d'une combinaison unique d'allèles parentaux C57 et DBA/2. Les auteurs ont étudié deux groupes

---

<sup>17</sup> La pénétrance de l'hémochromatose a fait l'objet d'une controverse avec des estimations allant de 1 à 95% de pénétrance chez les individus homozygotes C282Y. Ces différences reposent essentiellement sur les symptômes retenus caractérisant l'hémochromatose et sur le mode de recrutement des individus au cours de l'étude (individus déjà malades ou étude sur une large population).

<sup>18</sup> Notons que le gène *HFE* peut être considéré comme un gène modificateur de l'hémochromatose liée à *RTf2* puisque des patients porteurs homozygotes de la mutation Q317X du gène *TFR2* et portant la mutation C282Y du gène *HFE* à l'état hétérozygote présentent une hémochromatose juvénile[309]

de souris parmi les souris F2, celles qui présentaient le fer hépatique le plus bas et celles qui présentaient le fer hépatique le plus élevé. L'étude de liaison de marqueurs microsatellites distribués sur tout le génome a permis d'identifier des locus capables de moduler la surcharge hépatique en fer des souris *Hfe*<sup>-/-</sup>. Cette approche a permis de faire ressortir cinq locus significatifs. À l'intérieur de ces cinq locus sont retrouvés des gènes déjà connus dans le métabolisme du fer (*Hepc1*, *Hepc2*, *Hp*, *Hjv*...) et également de nouveaux gènes modificateurs candidats.



## 6) Hepsidine et désordres du métabolisme du fer

L'absence ou la diminution de l'hepcidine entraîne une surcharge en fer et son augmentation une anémie. C'est donc tout naturellement que l'hepcidine est suspectée d'être impliquée dans les différentes maladies du métabolisme du fer observées chez l'homme. Nous verrons dans ce chapitre que l'hepcidine pourrait être impliquée dans la pathogénie des surcharges en fer primaire ou HH, des surcharges en fer secondaires et des anémies chroniques inflammatoires, couvrant ainsi la grande majorité des désordres du métabolisme du fer.

### Hepsidine et hémochromatose héréditaire

Deux ans après la découverte de l'hepcidine puis de son rôle en tant qu'inhibiteur de l'absorption intestinale du fer et de son recyclage par les macrophages, plusieurs équipes ont établi que l'hepcidine était présente à des quantités inappropriées au regard de la surcharge en fer de l'hémochromatose liée à HFE à la fois chez la souris et chez l'homme[3, 30, 116, 185, 269, 275, 284, 382]. Alors que certaines équipes trouvent des taux d'ARNm hepcidine diminués dans les souris KO *Hfe* comparées à des souris sauvages[3, 30, 269], le laboratoire a montré que l'hepcidine est présente à des taux comparables dans les souris KO *Hfe* et les souris sauvages[284] (voir « Article 1 »)<sup>19</sup>. Ces différences peuvent s'expliquer par les fonds génétiques et les âges différents des souris étudiées. Il existe une controverse quant à la production d'hepcidine dans les souris invalidées pour le gène codant pour la  $\beta$ 2-microglobuline (souris KO  $\beta$ 2m)<sup>20</sup>. Les taux d'ARNm hépatiques d'hepcidine sont retrouvés augmentés en réponse à la surcharge en fer[310] ou, à l'instar des souris KO *Hfe*, non modifiés par rapport aux souris contrôles[270] dans les souris KO  $\beta$ 2m.

Dans le même temps, Roetto *et al.* ont identifié pour la première fois des mutations dans le gène *HAMP* chez des patients atteints d'hémochromatose juvénile[329]. Par la suite, il a été démontré, à la fois chez la souris et chez l'homme, que l'hepcidine est produite de façon inappropriée dans l'hémochromatose liée à RTf2[180, 278, 381] et à HJV[158, 287, 297].

Les niveaux d'hepcidine semblent corrélés avec la gravité de la surcharge en fer. En effet, dans les hémochromatoses liées à HFE ou RTf2, les niveaux d'hepcidine peuvent être diminués, mais restent présents en quantités non négligeables alors que dans les hémochromatose juvéniles les niveaux d'hepcidine (urinaires chez l'homme[246, 297, 298, 314], ARNm de foie chez la souris[158, 287]) sont très bas voire indétectables. L'hepcidine serait donc le déterminant commun de ces hémochromatoses pouvant expliquer la gravité de la surcharge suivant les taux résiduels d'hepcidine dans l'organisme, laissant supposer un rôle

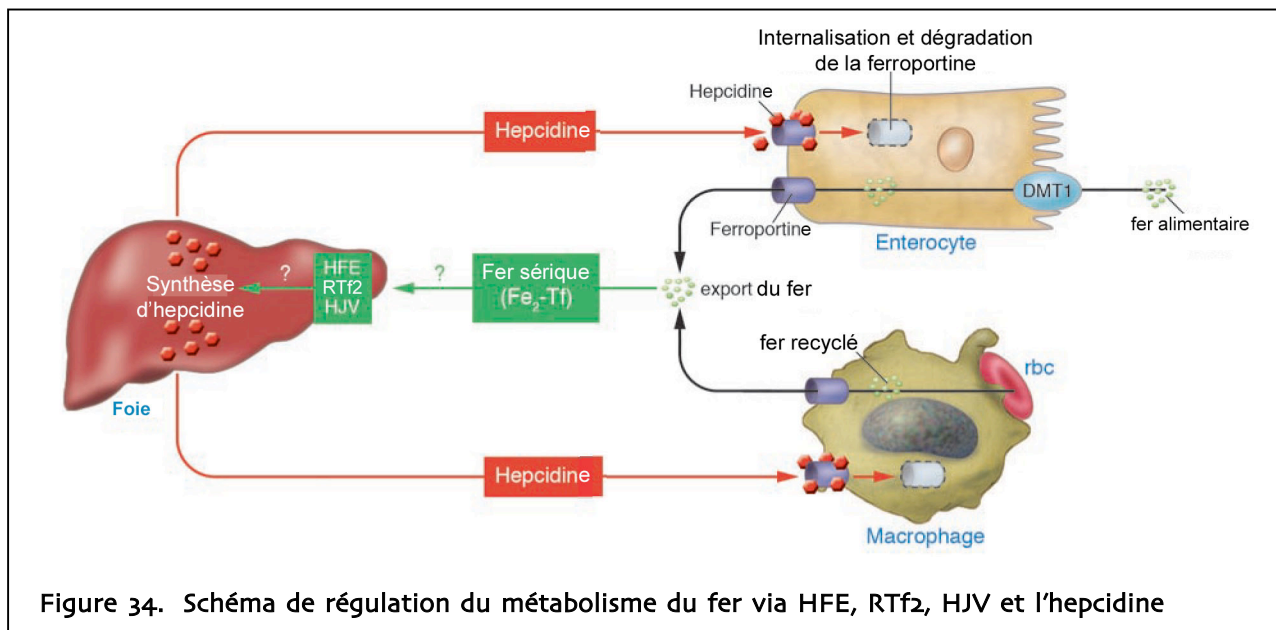
---

<sup>19</sup> De la même façon, on retrouve des taux d'hepcidine identiques[116, 275] ou diminués[30, 185] dans les patients atteints d'hémochromatose liée à HFE par rapport aux volontaires sains. Dans ce cas, les différences observées sont très dépendantes des individus contrôles utilisés.

<sup>20</sup> La  $\beta$ 2-microglobuline s'associe aux molécules du CMH de type I et également à HFE qui fait partie de cette famille de protéines. La mutation C282Y d'HFE retrouvée dans une grande majorité des patients atteints d'HH empêche l'interaction d'HFE avec la  $\beta$ 2-microglobuline. Les souris KO  $\beta$ 2m présentent les mêmes anomalies de distribution du fer que les souris KO *Hfe*[336].

de l'hepcidine dans la physiopathogénie de l'hémochromatose génétique (Figure 36). Dans le modèle des souris hémochromatosiques *Hfe*<sup>-/-</sup>, le laboratoire a montré que la surcharge martiale pouvait être prévenue par un apport d'hepcidine laissant suggérer la possibilité d'un traitement thérapeutique préventif de l'hémochromatose héréditaire[284] (voir « Article 1 »).

Ces résultats permettent de proposer un rôle régulateur de HFE, RTf2 et HJV dans l'expression hépatique du gène hepcidine en réponse à une surcharge en fer (Figure 34). En effet, dans ces modèles, l'hepcidine ne semble pas avoir augmenté face à la surcharge hépatique en fer qui s'est installée.



De façon intéressante, il a récemment été décrit que l'hepcidine urinaire était augmentée dans la forme dominante liée au gène *SLC40A1* (deux patients portant la mutation V162del)[298] suggérant que contrairement aux autres formes d'hémochromatose, l'hepcidine serait capable de répondre à la surcharge en fer de l'organisme. La régulation de l'hepcidine dans l'hémochromatose liée à des mutations de *SLC40A1* semble néanmoins dépendre du type de mutation étudiée. En effet, très récemment, l'étude de patients portant la mutation D181V n'a pas montré d'augmentation de l'hepcidine urinaire mais une diminution du ratio hepcidine/ferritine par rapport à des volontaires sains[41].

### Hepcidine et autres surcharges en fer

#### ◆ Surcharge en fer secondaire

Lorsque l'organisme est incapable de produire des GR de façon suffisante, une réaction à cette dysérythropoïèse est souvent une hyperabsorption de fer intestinale. Les souris *hpx*, modèle classique de dysérythropoïèse par manque d'apport de fer aux précurseurs érythroïdes (voir paragraphe sur la transferrine), augmentent ainsi leur absorption intestinale provoquant une surcharge en fer secondaire dans les tissus[56]. Il a été montré que, dans ces souris, l'expression des gènes hepcidine est réprimée alors que le foie contient une grande quantité de fer[388]. Cette diminution de l'hepcidine pourrait être à l'origine de

l'augmentation de l'absorption intestinale. On peut se demander alors si chez les patients atranferrinémiques, la même diminution de l'hepcidine est retrouvée.

Un autre exemple de surcharge secondaire en fer est la thalassémie. C'est une maladie génétique hétérogène due à des mutations dans les gènes codant pour la globine (pour une revue sur les  $\beta$ -thalassémies, voir[335]). La précipitation des chaînes de globine non appariées entraîne la production de GR anormaux qui subissent rapidement une hémolyse. Les patients sont donc anémiques et l'anémie est souvent accompagnée d'une surcharge en fer due à l'hyperabsorption intestinale[317] et aggravée par le traitement par transfusions. Or, il a été montré que dans les souris  $\beta$ -thalassémiques[2], les taux d'ARNm de l'hepcidine sont diminués. Cette diminution de l'hepcidine a également été décrite récemment au niveau des taux d'hepcidine urinaire chez des patients thalassémiques[298]. Ainsi la diminution de l'hepcidine pourrait également être la cause de l'hyperabsorption secondaire observée dans la thalassémie.

#### ◆ Surcharge en fer liée à l'alcool

La consommation excessive d'alcool est connue pour entraîner dans certains cas une surcharge en fer dont l'étiologie est mal connue (pour revues, voir[100, 273]). Plusieurs équipes, cherchant à expliquer les causes des surcharges en fer observées par une prise exagérée d'alcool ont regardé l'expression de l'hepcidine. Ces équipes ont pu démontrer par différents modèles murins ou par l'étude d'hépatocytes en culture que le traitement à l'alcool diminue l'hepcidine, et donc, que l'hepcidine pourrait être impliquée dans l'apparition de la surcharge en fer[47, 101, 146, 292].

### **Hepcidine et anémies**

#### ◆ Anémies ferriprives

L'anémie par carence en fer ou anémie ferriprive est une maladie acquise très fréquente qui peut être due à une carence alimentaire en fer ou des pertes sanguines importantes. Chez des patients atteints d'anémie ferriprive, il a été montré une diminution des taux d'hepcidine urinaire[185]. Il s'agit sans doute d'une réaction de l'organisme pour pallier le manque de fer. Cette diminution de l'hepcidine n'est pas associée à une surcharge en fer car, dans ce cas, il n'y a pas de défaut de l'érythropoïèse et le fer supplémentaire est utilisé pour produire des GR. Cette anémie ferriprive se caractérise par une diminution de la ferritine sérique, reflétant la diminution des réserves en fer de l'organisme (voir [Tableau 6](#) et « Système IRP/IRE »).

Une anémie ferriprive est retrouvée également chez des femmes athlètes, le métabolisme du fer étant perturbé par l'exercice physique intensif[411]. Une étude récente montre qu'il existe bien une augmentation de l'hepcidine urinaire chez des femmes athlètes 1 jour après un marathon pouvant expliquer l'apparition de l'anémie ferriprive[324]. À l'inverse, des rats ayant subi un exercice modéré voient leur taux d'hepcidine diminuer et leur homéostasie du fer maintenue par rapport à des rats ayant subi un exercice plus soutenu[233].

Variables sériques	Anémie chronique inflammatoire	Anémie ferriprive	Patients avec les deux types d'anémies
Fer	↘	↘	↘
Transferrine	↘ à normal	↗	↘
Saturation de la transferrine	↘	↘	↘
Ferritine	normal à ↗	↘	↘ à normal
RTf soluble (RTfs)	normal	↗	normal à ↗
RTfs/log ferritine	faible (<1)	élevé (>2)	élevé (>2)
Niveaux des cytokines	↗	normal	↗

Tableau 6. Variations des paramètres sériques lors de l'anémie chronique inflammatoire et l'anémie ferriprive

#### ◆ Anémies chroniques inflammatoires

Le fer est un élément crucial pour la prolifération des pathogènes, et les bactéries ont développé une batterie de protéines pour récupérer le fer des hôtes[9, 243]. L'apparition d'une anémie est un phénomène très fréquent dans des maladies inflammatoires ou cancéreuses. On parle d'anémie chronique inflammatoire. Ces anémies dites inflammatoires sont par leur fréquence la deuxième cause des anémies acquises, après les anémies liées à une carence en fer. Elles se différencient de ces dernières essentiellement par la ferritine qui reste normale voire augmentée (Tableau 6), ce qui témoigne de réserves en fer non diminuées : la rétention du fer dans les macrophages conduit à la diminution de l'activité des IRP et à l'augmentation de la traduction de la ferritine (voir « Système IRP/IRE »). L'élévation de la ferritine peut être également liée à une augmentation de la transcription du gène par les cytokines inflammatoires (voir paragraphe « Ferritine : la protéine de stockage »). Contrairement aux anémies ferriprives qui se traitent par apport de fer, l'apport de fer à des patients présentant une anémie inflammatoire n'améliore pas leur état. L'anémie chronique inflammatoire est une anémie modérée, normochrome et normocytaire au début. On suppose que l'addition de plusieurs mécanismes conduit à cette anémie :

- une diminution de la durée de vie des GR ;
- une diminution de la synthèse d'érythropoïétine (EPO) ;
- une différenciation érythroblastique anormale ;
- une séquestration du fer dans les macrophages.

Tous ces mécanismes peuvent être déclenchés par les cytokines produites lors de l'inflammation (Figure 35)[114, 389].

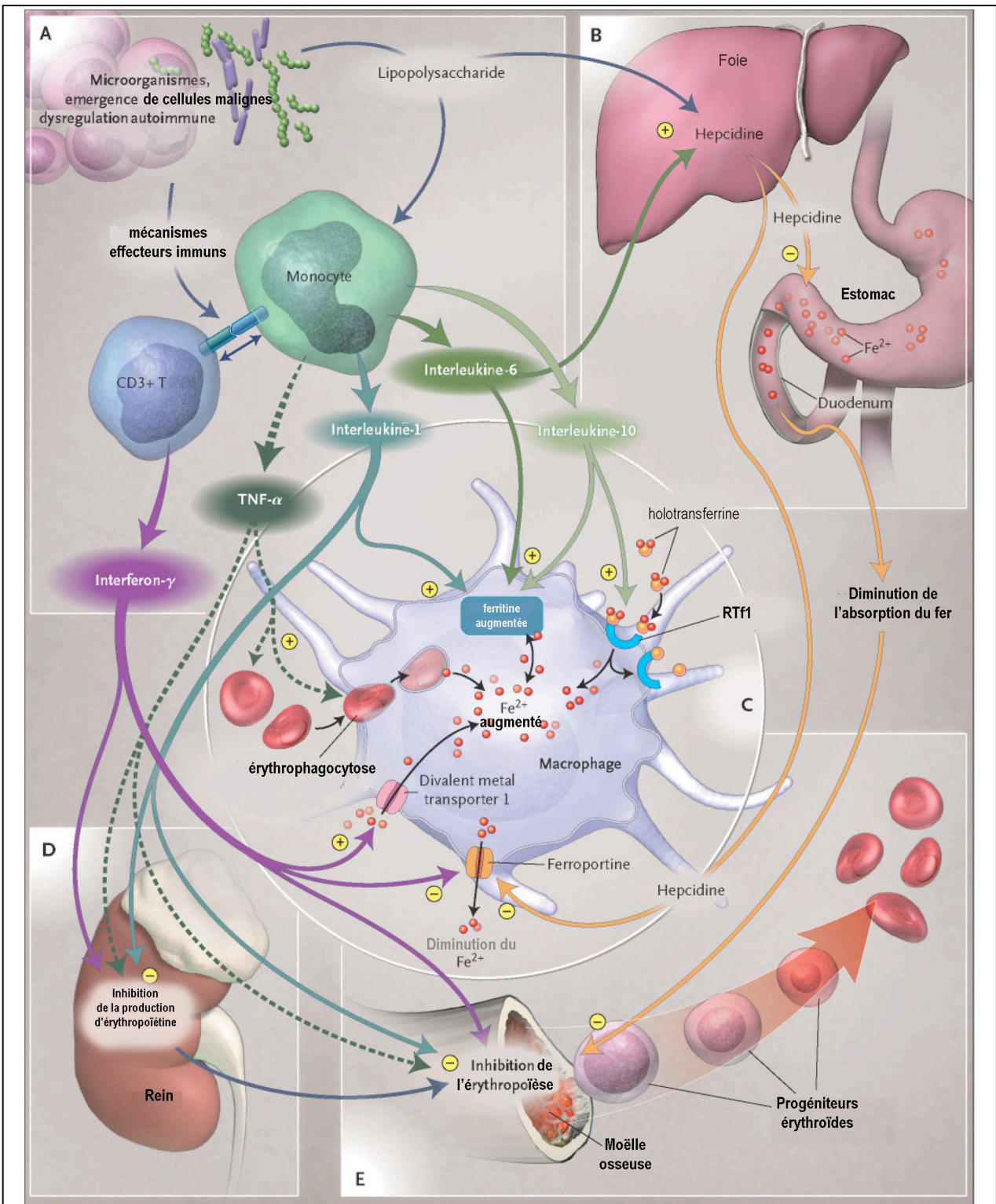


Figure 35. Schéma de l'interaction du métabolisme du fer et de l'inflammation

Or, l'expression de l'hépcidine est induite par les cytokines inflammatoires (voir chapitre « Régulation de l'hépcidine »). Il était donc tentant de proposer un rôle de l'hépcidine dans l'installation de l'anémie chronique inflammatoire. Si l'hépcidine n'agit pas *in vivo* comme un réel peptide antimicrobien, elle participe, grâce à son action hyposidérémiant, à lutter contre les infections / inflammations en réduisant le fer libre indispensable aux organismes pathogènes ou aux cellules cancéreuses en prolifération.



L'augmentation de l'hepcidine dans des situations d'inflammation, à en croire les effets du peptide, pourrait donc conduire à une diminution du fer sérique par rétention du fer macrophagique et une inhibition de l'absorption intestinale du fer. C'est en effet le cas puisque le laboratoire a retrouvé une réduction de 50% du fer sérique après l'injection de turpentine à des souris, réponse qui est perdue lorsque la turpentine est injectée à des souris déficientes en hepcidine[282]. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'hepcidine dans l'inflammation pourrait contribuer à l'établissement des dérégulations du métabolisme du fer observées au cours des anémies des désordres chroniques chez l'homme (Figures 35 et 36)[114].

Deux études récentes chez l'homme vont dans ce sens. Dans une cohorte de patients atteints de glycogénose de type 1 et présentant une anémie, Weinstein *et al.* ont mis en évidence un adénome hépatique produisant des quantités anormalement élevées d'ARNm hepcidine[388]. La résection chirurgicale de l'adénome chez ces patients a permis de normaliser les paramètres sanguins ce qui est fortement compatible avec un effet de l'hepcidine dans le blocage intestinal et macrophagique du fer. Enfin, Nemeth *et al.* et Kemna *et al.* ont mesuré, directement cette fois, les taux urinaires d'hepcidine et montrent que ces niveaux sont plus élevés chez des patients atteints de diverses anémies chroniques inflammatoires[185, 275].

L'implication de HFE, RTF2 et HJV dans la régulation de l'hepcidine lors de l'inflammation a également été l'objet de nombreuses études. Le rôle de Hfe n'est d'ailleurs pas éclairci et semble dépendre du fond génétique de la souris étudiée, du type de stimulus utilisé et/ou de la cinétique appliquée. Ainsi Roy *et al.* ont induit des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> (sur fond 129Sv) au LPS et ne retrouvent pas l'induction de l'hepcidine ni l'hyposidérémie observée dans les souris sauvages 1,5 h après l'injection. Ils concluent donc que Hfe est impliquée dans la régulation de l'hepcidine lors d'une inflammation provoquée par injection de LPS. D'autres équipes n'observent pas de changement de la réponse des gènes hepcidine 6 h après traitement au LPS (souris sur fond 129Sv)[214] ou 16 h après traitement par l'adjuvant de Freund (souris sur fond C57BL6)[109] chez des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> et pensent donc que Hfe n'est pas essentielle à cette régulation. L'étude de la réponse à l'inflammation des souris *KI Tfr2*[180] et de la réponse de lignées hépatiques à l'IL-6 après diminution d'HJV par traitement par des siRNA (petits ARN interférents) dirigés contre HJV[230] ont montré également que RTf2 et Hjv ne semblent pas requises pour la régulation de l'hepcidine au cours de l'inflammation. Dans les souris KO *Hjv*, la réponse de l'hepcidine à l'inflammation est présente mais réduite par rapport aux souris contrôles[287], suggérant que *Hjv* est importante pour l'expression basale des gènes hepcidine[128].

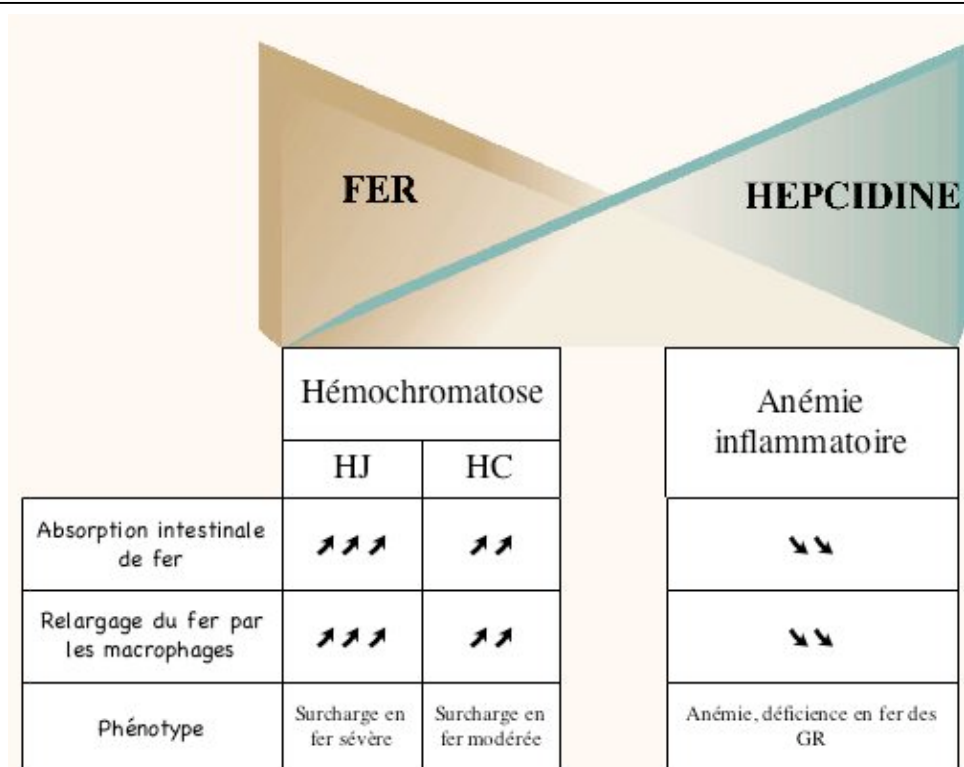


Figure 36. Interrelation du fer et de l'hepcidine dans l'étiologie des hémochromatoses et de l'anémie chronique inflammatoire

HJ : hémochromatose juvénile ; HC : hémochromatose classique ; GR : globules rouges.

## **Objectifs**

Au moment où j'ai commencé ma thèse, il était communément admis, suite aux travaux du laboratoire et à ceux d'autres équipes travaillant sur le métabolisme du fer, que l'hepcidine agissait en tant qu'hormone hyposidérémiant en inhibant l'absorption intestinale du fer alimentaire et en limitant le recyclage du fer provenant du catabolisme des GR sénescents par les macrophages.

J'ai cherché dans un premier temps à déterminer si l'hepcidine pouvait, par ce rôle, être utilisée comme agent thérapeutique dans l'hémochromatose héréditaire liée au gène *HFE*. Pour cela, j'ai réalisé un modèle de thérapie germinale en apportant de l'hepcidine transgénique à des souris hémochromatosiques, les souris KO *Hfe* qui reproduisent les anomalies du fer observées chez les patients.

Ensuite, j'ai voulu comprendre quelles pouvaient être les cibles moléculaires de l'hepcidine rendant compte de cette inhibition du transport de fer à travers la muqueuse intestinale et l'export du fer des macrophages vers la circulation.

Pour disposer d'un modèle d'étude de l'hepcidine plus efficace, j'ai développé un nouveau modèle de souris transgéniques permettant d'étudier l'implication de l'hepcidine dans le métabolisme du fer à l'âge adulte et d'analyser les effets d'une augmentation longue ou courte ou d'une diminution des taux d'hepcidine circulants. C'est le modèle de souris inductible hepcidine. Ce modèle m'a permis d'étudier les effets d'un apport chronique d'hepcidine dans le modèle KO *Hfe* et d'étudier les changements de la répartition du fer provoqués par l'hepcidine dans ces souris.

Enfin, le laboratoire ayant développé un nouveau modèle viable de déficience en hepcidine, les souris KO *Hepc1*, je me suis attachée à caractériser le phénotype de ces souris.



## Résultats

### **Article 1: Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis**

Nicolas G\*, Viatte L\*, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC, Vaulont S. Nat Genet. 2003 May;34(1):97-101.\*les deux auteurs ont contribué à part égale.

#### **Aspect préventif d'une surproduction d'hepcidine dans un modèle murin d'hémochromatose**

##### **Introduction**

L'hémochromatose héréditaire (HH) est une maladie génétique autosomique récessive due, dans 80% des cas, à une mutation dans le gène *HFE* (voir chapitre « Hémochromatose classique »).

À l'époque où mon travail de thèse a commencé, mon laboratoire venait d'établir le rôle de l'hepcidine dans la régulation du métabolisme du fer grâce à la création de deux modèles murins : un modèle de déficience en hepcidine, les souris KO *Usf2*, présentant une surcharge en fer massive, et un modèle de souris transgéniques exprimant de façon constitutive l'hepcidine développant une anémie ferriprive précoce, les souris *TTR-Hepc1*.

Tout laissait à penser que l'hepcidine était capable d'inhiber l'absorption intestinale de fer et son recyclage par les macrophages.

Dans cette première partie de mon travail de thèse, j'ai voulu répondre à deux questions :

D'une part, j'ai voulu savoir si la protéine HFE pouvait interagir avec l'hepcidine, petit peptide de 25 acides aminés et, par conséquent, si l'hepcidine avait besoin de la protéine HFE pour exercer son action. En effet, la protéine HFE appartient à la famille des molécules du CMH de classe I qui sont capables de présenter des petits peptides antigéniques, issus de la dégradation des protéines, à des cellules spécialisées de la réponse immunitaire. Notons cependant qu'il avait été décrit dans la littérature que, d'après sa structure tridimensionnelle, la protéine HFE semblait incapable de présenter un peptide comme les autres molécules du CMH I[213].

D'autre part, j'ai voulu tester si l'hepcidine par son effet inhibiteur de l'entrée de fer dans le sang pouvait prévenir la surcharge martiale de l'hémochromatose.

##### **Résultats**

Afin de tester les rôles respectifs de HFE et de l'hepcidine nous avons utilisé les modèles suivants :

- Les souris KO *Hfe* provenant du laboratoire de Nancy Andrews (Boston, USA). Ces souris reproduisent les anomalies du fer trouvées chez les patients atteints

d'hémochromatose (élévation de la saturation de la transferrine, accumulation du fer dans les parenchymes et diminution du fer splénique)[224]

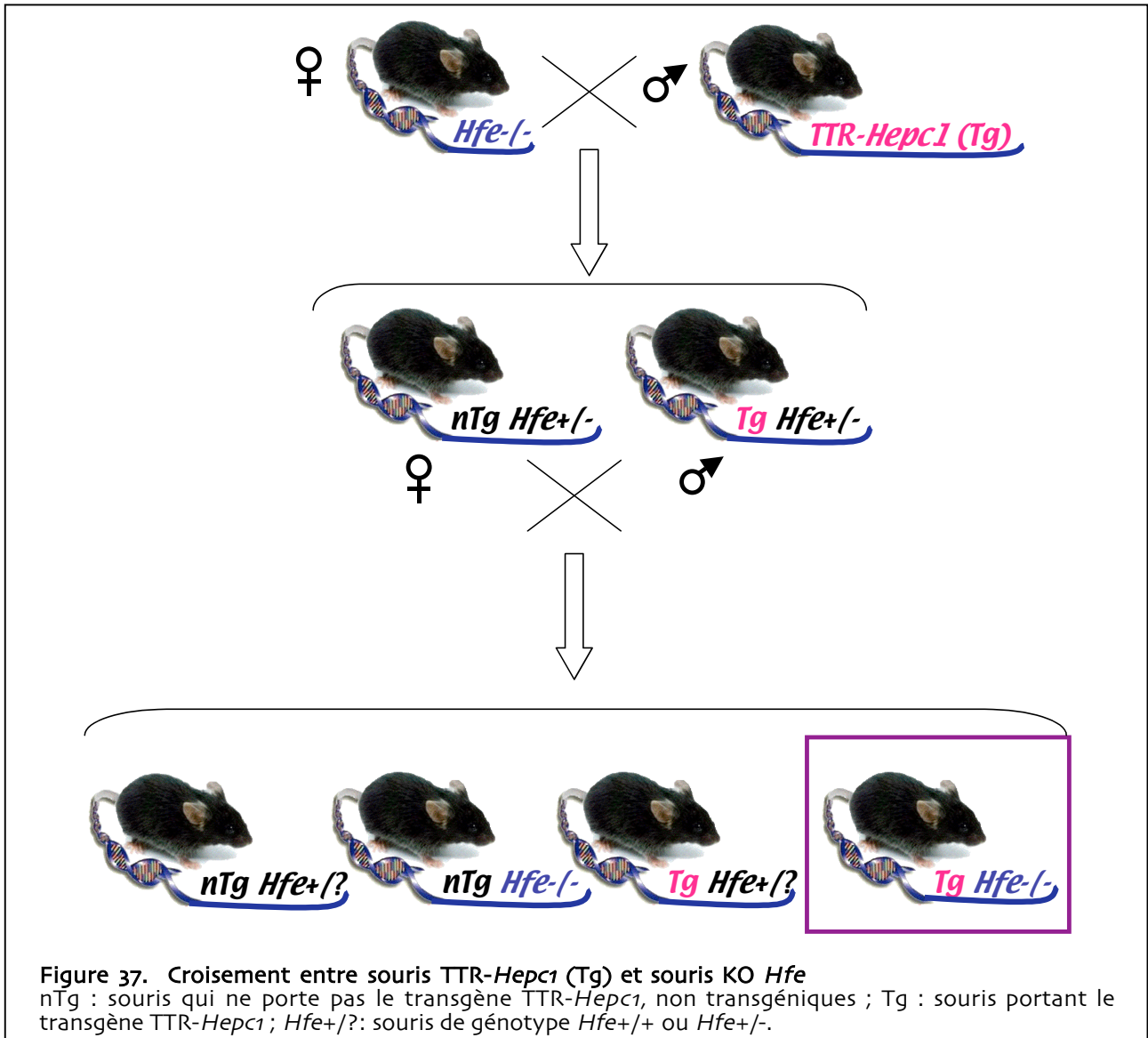
➤ Les souris TTR-*Hepc1* développées par le laboratoire[281]. Les souris TTR-*Hepc1* sont anémiques et peu d'animaux transgéniques survivent jusqu'à l'âge adulte sans apport de fer à naissance par injection sous-cutanée de fer dextran. Trois lignées transgéniques ont été développées au laboratoire (**Figure 6a de l'article**):

- deux lignées exprimant fortement le transgène (Thepc35 et Thepc61) qui sont difficiles à maintenir sans apport de fer à la naissance ;
- une lignée (Thep27) qui exprime plus faiblement le transgène. Chez ces souris, l'anémie est modérée et disparaît à l'âge de deux mois, permettant des croisements et un élevage plus facile

Dans les trois lignées, l'anémie des souris entraîne la répression de l'expression du gène endogène codant pour l'hepcidine[281] (**Figures 2b, 4b et 6a de l'article** : Northern blot révélant les transcrits hepcidine– transgénique et endogène – dans le foie). On note que la diminution d'expression du transgène et de la disparition de l'anémie à deux mois est associée à la normalisation de gène endogène dans la lignée Thep27 (**Figure 2b de l'article**). L'anémie observée dans les trois lignées est très précoce et est détectable in utero dès le stade E15,5. Cette anémie s'explique très probablement par l'inhibition du transport placentaire de fer liée à l'expression du transgène hepcidine dirigée par le promoteur TTR dans le foie foetal à un stade où les gènes endogènes hepcidine ne sont pas exprimés (**Figure 2a de l'article**).

Nous avons montré, dans un premier temps, que les taux d'ARNm hepcidine qui sont normalement augmentés en réponse à une surcharge en fer[310], l'étaient également dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> âgées de 3 semaines mais de façon insuffisante au regard de la surcharge en fer (rapport de la quantité d'ARNm hepcidine hépatique à la quantité de fer du foie, **Figure 1 de l'article**). De même, les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> de 32 jours qui ont trois fois plus de fer hépatique que des souris contrôles ont autant d'ARNm hepcidine que ces dernières (**Figure 4a de l'article**). Ce résultat d'expression inappropriée du(des) gène(s) hepcidine dans l'hémochromatose génétique liée à HFE a été trouvé par différentes équipes à la fois chez la souris[3, 269] et chez l'homme[30, 116, 275].

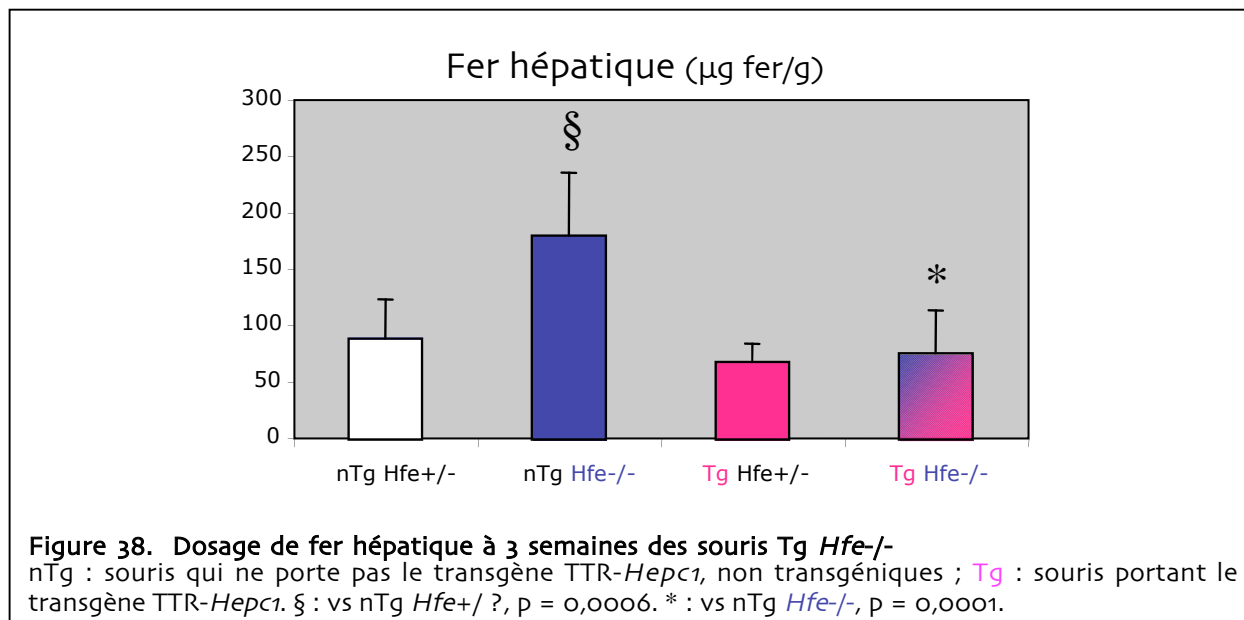
Afin d'obtenir des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> portant le transgène *Hepc1* (souris Tg *Hfe*<sup>-/-</sup> ; Tg = transgénique), nous avons croisé dans un premier temps des souris femelles *Hfe*<sup>-/-</sup> avec des souris mâles TTR-*Hepc1* (souris Tg). En effet, au vu de la présence de l'anémie chez les souris transgéniques, il est préférable que les femelles gestantes aient des stocks en fer non altérés et que ce soit les mâles qui soient porteurs du transgène. Les souris mâles Tg *Hfe*<sup>+/-</sup> obtenues sont ensuite croisées avec des femelles nTg (non transgéniques) *Hfe*<sup>+/-</sup> pour obtenir des souris Tg *Hfe*<sup>-/-</sup>. Les membres d'une même portée issus de ce croisement ne portant pas le transgène (nTg) ou portant le transgène et exprimant le gène *Hfe*(Tg *Hfe*<sup>+/?</sup>) sont utilisés comme contrôles (**Figure 37**).



L'anémie des souris transgéniques étant détectable dès le stade E15,5, nous avons d'abord étudié l'effet de l'hepcidine transgénique provenant de la lignée Thep27 à ce stade en sacrifiant les femelles gestantes  $nTg Hfe+/?$  et prélevant les embryons pour doser la quantité de fer totale des embryons après génotypage. L'étude des embryons au stade E15,5, montre que la présence ou non d' $Hfe$  dans la souris non transgénique n'influe pas sur la quantité de fer totale des embryons (**Figure 3 de l'article**). Ce résultat démontre que  $Hfe$  n'est pas essentielle au transport placentaire de fer et confirme que le phénotype de surcharge en fer de l'hémochromatose est progressif et ne se manifeste qu'à l'âge adulte. En revanche, la présence du transgène hepcidine induit toujours, quel que soit le génotype  $Hfe$  (souris  $Tg Hfe+/?$  ou  $Tg Hfe^{-/-}$ ), une diminution du fer total et une pâleur des embryons (**Figure 3 de l'article**). Ce résultat montre que l'hepcidine n'a pas besoin de la présence de la protéine  $Hfe$  pour exercer son effet d'inhibition de l'entrée de fer dans le sang.

Nous avons voulu par la suite déterminer le rôle de l'hepcidine sur la surcharge en fer des souris  $Hfe^{-/-}$  à un stade adulte. Pour cela nous avons sacrifié les souris issues de croisement entre  $nTg Hfe+/-$  et  $Tg (Thep27) Hfe+/-$  à l'âge de 3 semaines, 1 mois ou 2 mois puis nous avons dosé le fer hépatique de ces souris.

De façon intéressante, l'étude de la quantité de fer hépatique chez les souris Tg *Hfe*<sup>-/-</sup> montre que la production constitutive d'hepcidine empêche l'apparition d'une surcharge en fer chez les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> à trois semaines (Figure 38) et à un mois (Figure 5 de l'article). À deux mois, les souris Tg *Hfe*<sup>-/-</sup> voient leur fer hépatique augmenté (Figure 2b de l'article) probablement par diminution du taux d'hepcidine transgénique et disparition de l'anémie à cet âge-là.



Pour confirmer cette hypothèse, l'expérience a été reconduite cette fois en croisant des souris mâles survivantes des lignées Thep35 et Thep61 qui maintiennent l'expression du transgène à 2 mois (Figure 6a de l'article), non injectées au fer, avec les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> (Figure 37). Le dosage de fer hépatique et la coloration de Perls sur le foie de souris Tg *Hfe*<sup>-/-</sup> issues de ces croisements, montrent une absence de surcharge en fer (Figures 6b et c de l'article), confirmant le rôle du transgène hepcidine dans la prévention de l'apparition de la surcharge chez les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> à l'âge de deux mois.

## Discussion

Ces travaux ont donc permis d'établir que l'hepcidine n'avait pas besoin de la présence de la protéine Hfe pour inhiber l'entrée du fer dans le sang. Ces travaux démontraient également pour la première fois le rôle thérapeutique préventif de l'hepcidine dans un cas de surcharge en fer liée à l'absence d'Hfe.

Le modèle de la crypte qui proposait un rôle de HFE dans la programmation du statut absorbant des entérocytes en fonction des signaux sensed par HFE au niveau des cellules de la crypte[334] a été remis en question suite à ces travaux et à d'autres études. Ce modèle reposait en effet sur l'expression de *HFE* à la surface basolatérale des cellules de la crypte et sur le délai observé entre des modifications des stocks en fer ou de l'érythropoïèse et l'adaptation de l'absorption intestinale à ses changements attribué au temps de migration et de différenciation des cellules de la crypte en entérocytes. HFE, dans ce modèle de la crypte, était décrit comme le senseur des signaux plasmatiques au niveau des cellules de la crypte programmées alors à se différencier en entérocytes absorbant plus ou moins de fer (voir

chapitre « Modèle de la crypte »). Il a été montré par la suite que le gène *HFE* était exprimé et la protéine présente en grande quantité dans les hépatocytes[156, 407] et que le délai observé pouvait correspondre au délai de réponse de l'hepcidine : une fois que l'hepcidine était synthétisée et sécrétée, l'inhibition de l'absorption se fait dans un temps très court, probablement directement sur l'entérocyte[108]. L'expression inappropriée du gène hepcidine face à la surcharge en fer liée à l'absence d'Hfe suggérait pour la première fois un rôle d'Hfe au niveau hépatique dans la régulation de l'hepcidine plutôt qu'un rôle d'HFE au niveau de la crypte. Notons cependant qu'il n'est pas improbable que les deux types de régulation puissent exister. L'étude du KO conditionnel d'*Hfe* dans l'intestin et dans le foie, développé dans le laboratoire de Martina Muckenthaler, devraient permettre d'établir définitivement les rôles respectifs d'Hfe dans ces deux tissus[187].

L'expression inappropriée d'hepcidine (et/ou les taux anormalement faibles d'hepcidine urinaire) a pu être montrée par la suite dans d'autres types d'HH : liées aux mutations du gène *TfR2*[180, 278, 381] ou du gène *HJV*[158, 287, 297]. Il a également été montré que des mutations dans le gène hepcidine chez l'homme étaient à l'origine de certains cas d'hémochromatose juvénile[329]. L'ensemble de ces résultats a amené à considérer un défaut d'hepcidine comme le dénominateur commun de ces maladies conduisant à l'apparition d'une surcharge martiale héréditaire primaire et à envisager de nouvelles voies thérapeutiques pour la prévention de l'hémochromatose. Il a aussi apporté de nouveaux éléments sur la régulation de l'hepcidine par le fer en impliquant de nouveaux acteurs dans cette régulation : HFE, RTf2 et HJV (voir chapitre « Hpcidine et désordres du métabolisme du fer »).

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

Gaël Nicolas<sup>1\*</sup>, Lydie Viatte<sup>1\*</sup>, Dan-Qing Lou<sup>1</sup>, Myriam Bennoun<sup>1</sup>, Carole Beaumont<sup>2</sup>, Axel Kahn<sup>1</sup>, Nancy C. Andrews<sup>3</sup> & Sophie Vaulont<sup>1</sup>

\*These authors contributed equally to this work.

Published online 21 April 2003; doi:10.1038/ng1150

Hereditary hemochromatosis is a prevalent genetic disorder of iron hyperabsorption leading to hyperferremia, tissue iron deposition and complications including cirrhosis, hepatocarcinoma, cardiomyopathy and diabetes. Most individuals affected with hereditary hemochromatosis are homozygous with respect to a missense mutation that disrupts the conformation of HFE, an atypical HLA class I molecule (ref. 1; OMIM 235200). Mice lacking *Hfe*<sup>2-4</sup> or producing a C282Y mutant *Hfe* protein<sup>3</sup> develop hyperferremia and have high hepatic iron levels. In both humans and mice, hereditary hemochromatosis is associated with a paucity of iron in reticuloendothelial cells. It has been suggested that HFE modulates uptake of transferrin-bound iron by undifferentiated intestinal crypt cells, thereby programming the absorptive capacity of enterocytes derived from these cells<sup>5,6</sup>; however, this model is unproven and controversial<sup>7,8</sup>. Hepcidin, a peptide hormone (HAMP; OMIM 606464), seems to act in the same regulatory pathway as HFE.

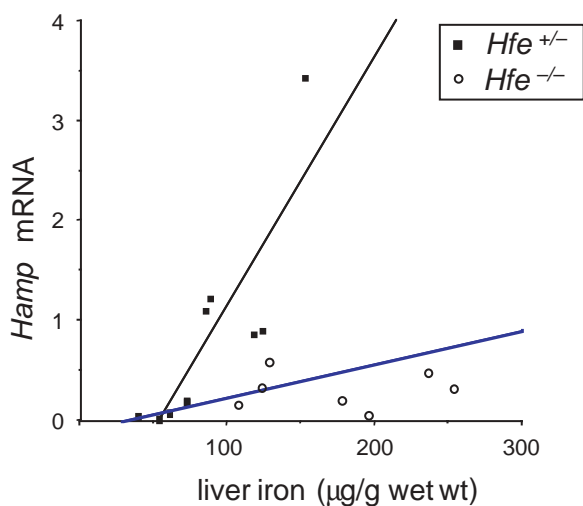
Although expression of mouse *Hamp* is normally greater during iron overload, *Hfe*<sup>-/-</sup> mice have inappropriately low expression of *Hamp*. We crossed *Hfe*<sup>-/-</sup> mice with transgenic mice overexpressing *Hamp* and found that *Hamp* inhibited the iron accumulation normally observed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

Normal iron balance is maintained by meticulous regulation of iron absorption from the intestine and iron release from macrophages. It is modulated in response to body iron stores and demand for iron by erythropoiesis<sup>9</sup> to prevent deleterious extremes of iron deficiency or excess.

HAMP (hepcidin) is a peptide hormone that may be central to these regulatory systems. It is synthesized predominantly in the liver, secreted as peptides of 20–25 amino acids<sup>10–12</sup> and expression is induced by dietary iron loading<sup>11</sup>. *Hamp*-deficient mice accumulate iron in parenchymal cells due to greater intestinal absorption and impaired retention of iron by reticuloendothelial macrophage cells<sup>13</sup>. Recently, humans with severe hemochromatosis have been shown to have null mutations in the gene *HAMP*<sup>14</sup>. In contrast, transgenic mice overexpressing *Hamp* have markedly lower iron stores, resulting in severe anemia<sup>15</sup>. Thus, HAMP seems to be a negative regulator of iron release both from reticuloendothelial macrophages and from enterocytes mediating intestinal absorption of dietary iron.

This conclusion is further supported by studies of *Hamp* expression in inflammation. *Hamp*-deficient mice are unresponsive to the hypoferremic effects of inflammation provoked by turpentine injection<sup>16</sup>. Humans with constitutively active *HAMP* expression develop iron-refractory anemia associated with defective intestinal iron absorption and macrophage iron retention, similar to the anemia of chronic inflammation<sup>17</sup>. Other individuals with anemia and inflammation have been reported with elevated urinary HAMP excretion<sup>18</sup>.

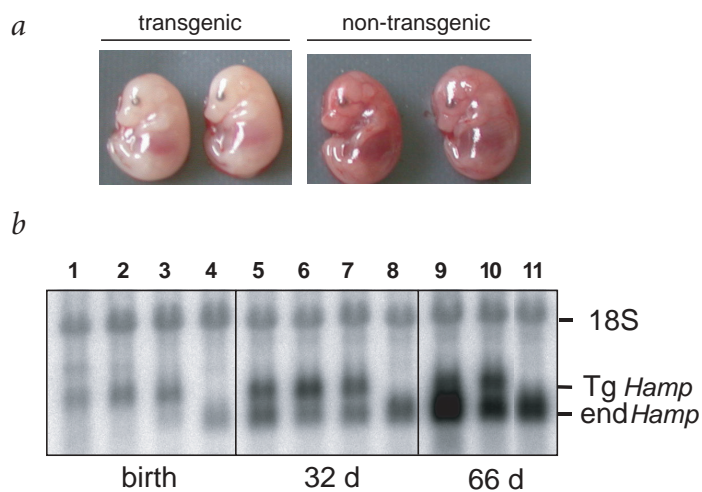
Because HFE and HAMP both seem to be important in regulating iron metabolism, and because *Hfe*-deficient and *Hamp*-deficient mice have similar iron overload phenotypes, we speculated that HAMP and HFE might act through the same regulatory pathway. We examined liver *Hamp* mRNA levels in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice at 4 months of age, when liver iron content is maximal<sup>19</sup>.



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

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

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



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

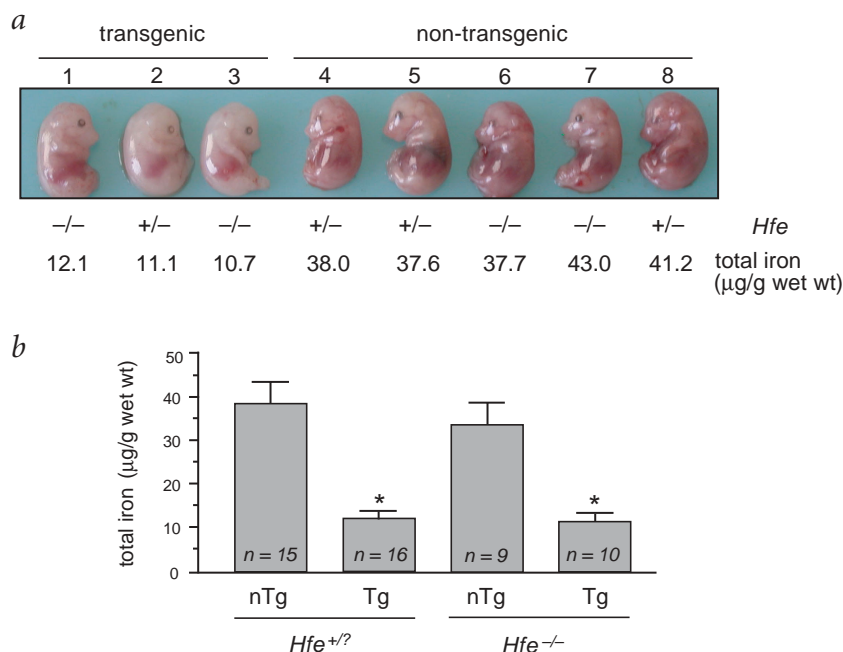
*Hamp* mRNA expression was not induced in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, despite a four-fold increase in liver iron content (data not shown). To confirm that *Hamp* expression did not change during iron overload in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, we analyzed *Hamp* mRNA as a function of the liver iron concentration in *Hfe*<sup>+/-</sup> and *Hfe*<sup>-/-</sup> mice at 3 weeks of age, during the iron loading phase. Although *Hamp* expression was positively correlated with liver iron concentration in both *Hfe*<sup>+/-</sup> and *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, the slope of the line was lower in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1). This observation concurs with recent reports that mice<sup>20</sup> and humans<sup>21</sup> with HFE-associated hemochromatosis have inappropriately low HAMP levels, suggesting that failure of normal HAMP induction might contribute to iron overload.

To explore this possibility, we intercrossed *Hfe*<sup>-/-</sup> mice<sup>3</sup> with transgenic mice constitutively expressing *Hamp* (Thep27) and analyzed tissue iron content and *Hamp* expression in the offspring. Thep27 mice express a liver-specific *Hamp* transgene<sup>15</sup>, resulting in fetal (Fig. 2a) and neonatal anemia. Thep27 mice are viable without iron therapy and their anemia resolves spontaneously after the first month of life. As reported<sup>15</sup>, endogenous

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

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

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



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

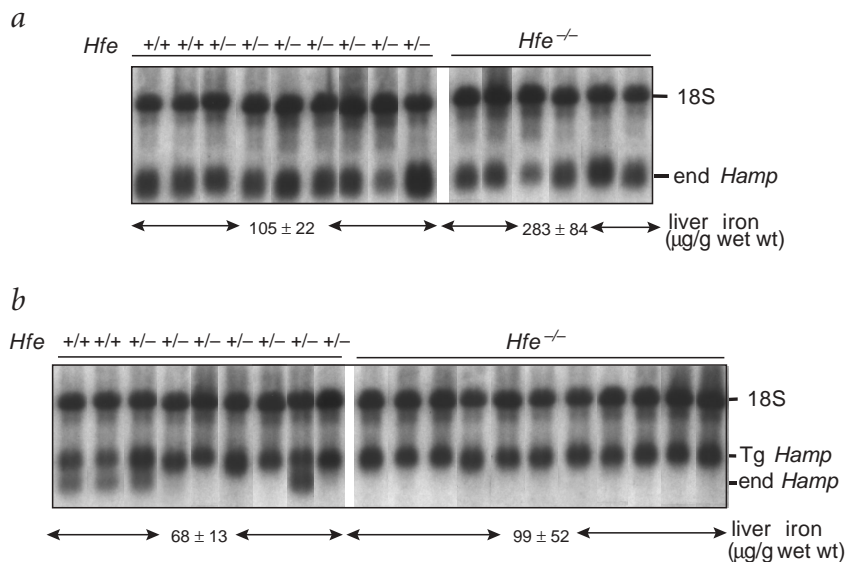


transgenic  $Hfe^{+/?}$  ( $n = 19$ ). Transgenic  $Hfe^{+/?}$  mice had lower liver iron content than non-transgenic  $Hfe^{+/?}$  mice ( $68 \pm 13 \mu\text{g per g}$  in transgenic  $Hfe^{+/?}$  ( $n = 13$ ) versus  $105 \pm 22 \mu\text{g per g}$  in non-transgenic  $Hfe^{+/?}$  ( $n = 19$ )), probably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

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

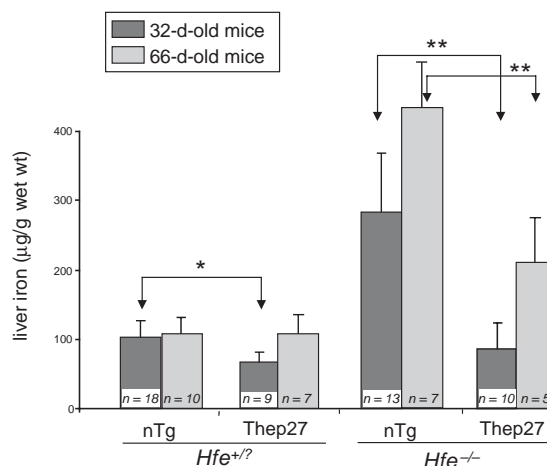
To confirm our findings, we bred  $Hfe^{-/-}$  mice with two other transgenic lines, Thep35 and Thep61, each of which maintains high level of transgene expression (Fig. 6a) and has more severe, persistent iron deficiency. The mice are anemic, and, in contrast to Thep27, endogenous *Hamp* expression is still repressed at two months. At two months, Thep35 and Thep61 mice have 53% and 33% lower hemoglobin concentrations, respectively ( $7.1 \pm 1.0 \text{ g dl}^{-1}$  in Thep35 mice ( $n = 10$ ) versus  $15.1 \pm 0.8$  in non-transgenic mice ( $n = 12$ ),  $P < 0.0001$ ; and  $10.5 \pm 1.0 \text{ g dl}^{-1}$  in Thep61 mice ( $n = 8$ ) versus  $14.5 \pm 1.1$  in non-transgenic mice ( $n = 8$ ),  $P < 0.0001$ ). Thep35 mice also have compensatory splenomegaly, as is typically observed in mice with severe iron deficiency (N.C.A., unpublished results). Viability of both transgenic lines was poor unless they were treated with iron<sup>15</sup>, but a few mice did survive. Transgenic  $Hfe^{-/-}$  mice produced from crosses with both of these lines had complete absence of iron overload compared with non-transgenic  $Hfe^{-/-}$  mice at two months (Fig. 6b,c). These results indicate that sustained, high levels of *Hamp* transgene expression prevented liver iron accumulation in spite of the absence of *Hfe*. The inhibition of iron absorption depends on the level of *Hamp* transgene expression, which explains why it is associated with anemia in Thep35 and Thep61 mice but not in Thep27 mice.

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



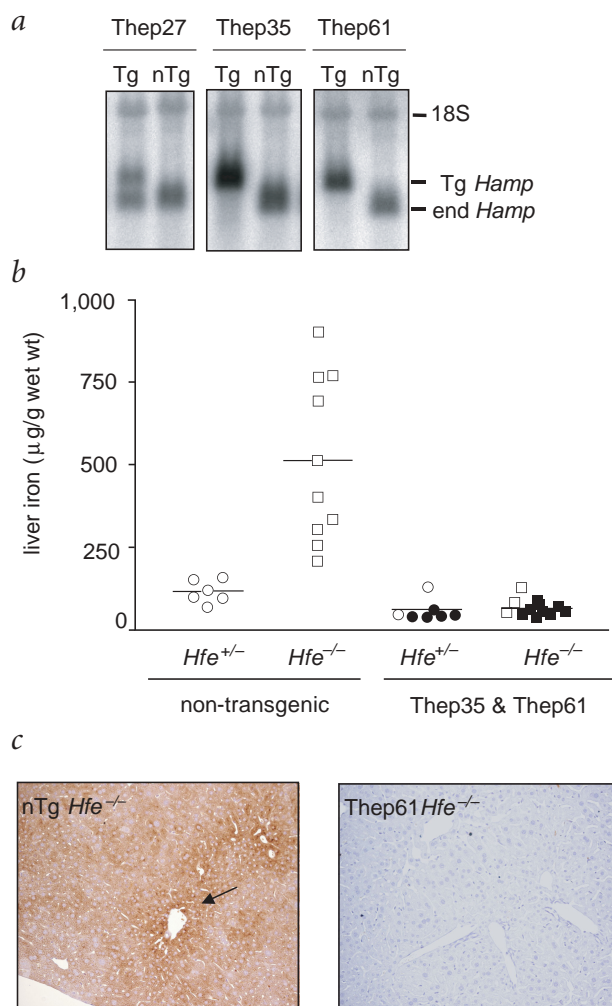
**Fig. 4** Endogenous and transgenic *Hamp* expression in mice carrying the *Hfe* mutation and/or the Thep27 *Hamp* transgene. Transgenic (Tg) and endogenous (end) liver *Hamp* mRNA levels were quantified by northern blotting (as in Fig. 1b) in non-transgenic  $Hfe^{+/?}$  and non-transgenic  $Hfe^{-/-}$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

*Hamp* modulates intestinal iron transport at the level of the mature enterocyte. If *Hfe* is just one means of controlling *Hamp* expression, and others are intact in  $Hfe^{-/-}$  mice, this would explain why *Hamp* is present but not appropriately induced in those mice. Lower levels of endogenous *Hamp* expression in 66-day-old transgenic mice could be attributable to anemia in Thep35 and Thep61 mice, but this should not be the case for non-anemic Thep27 mice. The result of inappropriate *Hamp* regulation in  $Hfe^{-/-}$  mice is a relatively mild iron loading compared to mice with total loss of *Hamp* expression<sup>13</sup>, analogous to observations in humans with severe juvenile hemochromatosis<sup>14</sup>.



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





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

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

*HAMP* gene regulation in response to iron status is not yet understood, although C/EBP $\alpha$  has been implicated in some aspects of promoter control<sup>22</sup>. Iron-dependent regulation of *Hamp* expression may involve cells other than hepatocytes. Indeed, iron was found to have no effect<sup>11</sup> or even to downregulate *HAMP* expression<sup>18</sup> when added to human cultured hepatocytes. We speculate that hepatic K pffer cells (macrophages) may communicate with hepatocytes to effect regulation of the *HAMP* response. The demonstration that IL-6, a macrophage-produced cytokine, can stimulate *HAMP* expression by hepatocytes<sup>18</sup> supports this hypothesis. Inappropriate *HAMP* expression could mediate the pathological effects of mutations in *HFE* in hereditary hemochromatosis. Accordingly, we speculate that *HAMP* therapy could benefit individuals with hemochromatosis by preventing iron overload and its complications.

## Methods

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

**Generation of transgenic mice.** Null *Hfe*-deficient mice ( $Hfe^{-/-}$  mice) have been previously described<sup>3</sup>. We generated transgenic mice overexpressing *Hamp* as previously described<sup>15</sup>. Briefly, we introduced a *Hamp* cDNA fragment between transthyretin sequences (consisting of the 3 kb of the mouse transthyretin regulatory regions 5' to the cap site, the first exon, first intron and most of the second exon) and the SV40 small-T poly(A)<sup>+</sup> signal sequence<sup>23</sup>. We detected the transgene by Southern blotting and PCR analysis of DNA prepared from tail biopsy samples. Primer sequences are available on request.

**Northern blotting.** We denatured 20  $\mu$ g of liver RNA in formaldehyde-containing buffer and separated it by electrophoresis through 1% agarose, 2.2 M formaldehyde gels. We did northern blotting as described<sup>13</sup>. After electrophoresis, we transferred RNA to a nylon membrane (GeneScreen Plus, Dupont-NENTM Life Science Products) in 20 $\times$  saline-sodium citrate buffer. The probe used to detect *Hamp* mRNA has been previously described<sup>13</sup>. Owing to the presence of the SV40 small-T poly(A)<sup>+</sup> sequence, the size of the transgenic *Hamp* transcript is larger than that of the endogenous transcript. We stripped each blot and reprobated it with ribosomal 18S cDNA to check for integrity and confirm the amount of loaded RNA.

**Iron measurements and histochemistry.** We quantified iron concentrations as previously described<sup>24</sup> on fragments or total organs using the IL test (Instrumentation Laboratory). For histochemistry, we incubated sections from liver for 20 min in 1% hydrogen peroxide in 0.1 M phosphate-buffered saline, immersed them in Perl's solution (1:1, 2% HCl and 2% potassium ferrocyanide) at room temperature for 30 min and incubated them for 10 min in 0.015% hydrogen peroxide in 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride.

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

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

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

**Acknowledgments**

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

**Competing interests statement**

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 27 January; accepted 31 March 2003.

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

## **Article 2: Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice.**

Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, Bennoun M, Nicolas G, Kahn A, Canonne-Hergaux F, Vaulont S. Blood. 2005 Jun 15;105(12):4861-4. Epub 2005 Feb 15.

### **Mécanismes moléculaires conduisant à l'établissement d'une surcharge en fer en absence d'hepcidine.**

#### **Introduction**

La mise en évidence de l'hepcidine comme régulateur du métabolisme du fer a suscité de nombreux travaux visant à définir les cibles moléculaires de l'hepcidine pour son effet inhibiteur de l'absorption intestinale du fer. Pour cela, différents stimuli ont été utilisés pour faire varier les taux d'hepcidine (régime pauvre en fer, riche en fer, traitement par des agents inflammatoires ou hémolytique[8, 105, 208, 237, 404] ou directement de l'hepcidine recombinante ou synthétique[397, 404] afin d'étudier les conséquences de ces variations d'hepcidine sur les niveaux d'ARNm et/ou de protéines impliquées dans le métabolisme du fer, et ce, dans le duodénum et/ou dans le foie. Pas de consensus clair ne ressortait de ces études, j'ai donc voulu mesurer la quantité de ces protéines du métabolisme du fer en absence totale d'hepcidine.

J'ai utilisé pour cela les souris KO *Usf2* développées dans le laboratoire. Ces souris présentent un déficit fonctionnel en *Hepc1* et *Hepc2* (voir chapitre « Hpcidine : découverte, structure et régulation »). Ces souris ont une surcharge en fer importante dans les parenchymes et une diminution du fer splénique rappelant les anomalies du fer de l'HH. Notons que l'absence d'*Usf2*, facteur de transcription ubiquiste, dans ces souris provoque une très forte létalité périnatale et fait que peu d'animaux étaient disponibles pour analyse.

Dans ces souris, j'ai décidé de mesurer les variations des niveaux de protéines en utilisant les anticorps à notre disposition par les collaborations avec le laboratoire de Carole Beaumont et François Canonne-Hergaux à la Faculté Bichat à Paris (anticorps dirigés contre la ferroportine et DMT1), celui d'Andrew McKie à Londres (anticorps anti-Dcytb) et celui de P Santrambrogio et S. Levi à Milan (anticorps anti-ferritine) ou par l'utilisation d'anticorps commercialisé (anti-céruleplasmine).

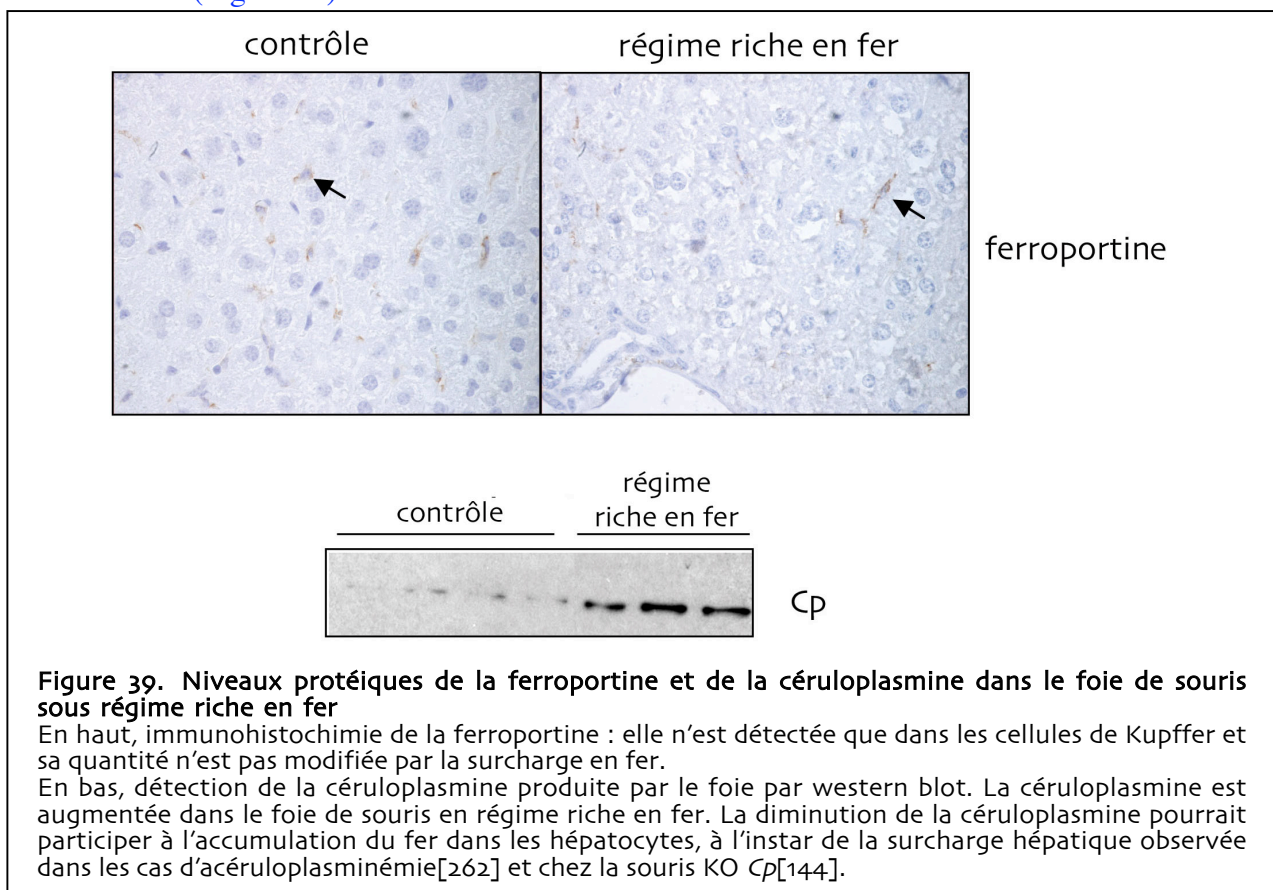
#### **Résultats**

Nous avons prélevé sur les souris *Usf2*<sup>-/-</sup> les trois organes majeurs du métabolisme du fer, le duodénum, le foie et la rate, pour l'analyse des protéines d'intérêt par western blot et/ou immunohistochimie.

Au niveau de la partie proximale du duodénum, le transporteur DMT1 et la réductase Dcytb sont présents en plus grande quantité à la surface apicale des entérocytes de souris KO *Usf2* par rapport aux souris contrôles (**Figure 1 de l'article**). De même, la ferroportine est produite en plus grande quantité à la membrane basolatérale des souris KO *Usf2* (**Figure 1 de l'article**). L'absence d'anticorps fiable disponible au laboratoire dirigé contre l'héphaestine

ne nous a pas permis de regarder le niveau d'expression de ce gène dans nos souris. On peut toutefois estimer que, compte tenu de l'implication des différentes protéines étudiées dans l'absorption intestinale de fer, leur augmentation entraîne, en l'absence d'hepcidine, une plus grande entrée de fer dans l'organisme, rendant ainsi compte de la surcharge en fer observée dans les souris KO *Usp2*.

Dans le foie des souris KO *Usp2*, la surcharge en fer entraîne, comme attendu, l'augmentation des taux protéiques de ferritine L (**Figure 2A de l'article**), probablement via la diminution de l'activité des IRP. On note également une augmentation du signal ferroportine par western blot (**Figure 2A de l'article**) et immunohistochimie avec une augmentation prépondérante dans les cellules de Kupffer (**Figure 2B de l'article**). Afin d'évaluer au mieux la part de régulation due au défaut d'hepcidine d'une régulation liée à une surcharge en fer dans le foie, nous avons comparé l'expression hépatique des gènes des souris *Usp2*<sup>-/-</sup> avec celle de souris traitées par un régime riche en fer (14 jours en régime fer carbonyl 3%). Il a été montré que la quantité d'ARNm ferroportine était augmentée lorsque des souris sont expérimentalement surchargées en fer ([237] et observations faites au laboratoire non publiées) mais nous n'avons pas retrouvé cette augmentation au niveau protéique chez des souris ayant reçu un régime riche en fer (**Figure 39**). L'augmentation de la ferroportine observée en absence d'hepcidine dans les souris KO *Usp2* n'est donc pas liée à la surcharge en fer des souris. De façon surprenante, nous avons observé une diminution de la céruloplasmine hépatique chez les souris déficientes en hepcidine comparées aux souris contrôles (**Figure 2A de l'article**). Cette régulation ne semble pas non plus attribuable au fer intracellulaire puisque le traitement par un régime riche en fer fait augmenter les taux protéiques de céruloplasmine dans le foie (**Figure 39**).





La rate des souris *Usp2*<sup>-/-</sup> est déficiente en fer et on observe, comme attendu, une diminution de la quantité de ferritine L (**Figure 2C de l'article**). La ferroportine, comme dans le duodénum et le foie, est présente en plus grande quantité dans la rate (**Figure 2C et 2D de l'article**). La présence de la ferroportine est détectée au niveau des macrophages de la pulpe rouge de la rate, responsables de l'EP (**Figure 2D de l'article**). De façon intéressante, on peut noter que l'augmentation de la quantité de ferroportine est associée à un léger changement de poids moléculaire de la protéine détectée (**Figure 2C de l'article**). Ce changement de taille pourrait correspondre à des modifications post-traductionnelles de la protéine, par exemple une phosphorylation ou une glycosylation. Un tel changement n'a pas été observé dans le duodénum et le foie (**Figures 1A et 2A de l'article**).

Nous n'avons pas détecté de signal avec l'anticorps DMT1 et Dcytb dans le foie et la rate de nos souris.

### **Discussion**

Ces travaux ont donc montré que l'absence d'hepcidine dans le modèle des souris KO *Usp2* conduisait à une augmentation coordonnée de la ferroportine dans les trois organes étudiés. Ces résultats constituent la première démonstration *in vivo* de la stabilisation de la ferroportine en absence d'hepcidine. Cette observation rejoint l'hypothèse d'une sensibilité de la ferroportine à des signaux systémiques plutôt que locaux[43]. De plus, François Canonne-Hergaux *et al.* ont montré que les taux de protéine ferroportine étaient augmentés de façon coordonnée dans ces trois organes dans de nombreuses situations d'érythropoïèse inefficace par manque de fer utilisable par les GR (traitement par un régime pauvre en fer, modèles murins d'anémie génétiques : souris *sla*, *mk*, *hpx*) ou lorsque l'érythropoïèse est stimulée par traitement à l'érythropoïétine ou à la phénylhydrazine[37]. Dans toutes ces situations, les taux d'hepcidine sont connus pour être diminués (voir « Régulation de l'hepcidine ») et l'absence d'hepcidine pourrait donc être la cause de l'augmentation de la quantité de ferroportine. Un autre exemple de situation physiopathologique associant une diminution de l'hepcidine et une augmentation de la ferroportine a été apporté par Mok *et al.* dans l'étude des souris polycythémiques *Pcm* hétérozygotes[263].

Les résultats d'une stabilisation de la ferroportine en absence d'hepcidine sont en parfaite adéquation avec les résultats de Nemeth *et al.* qui montrent, à l'inverse, qu'en présence d'hepcidine, la ferroportine est dégradée. L'équipe de Nemeth *et al.* a fait surexprimer par des cellules HEK293 un transgène codant pour la ferroportine couplée à la GFP. Le traitement de ces cellules par de l'hepcidine humaine purifiée a montré que l'hepcidine entraînait l'internalisation de la ferroportine de la surface des cellules vers un compartiment intracellulaire puis la dégradation de la ferroportine. Enfin, l'utilisation d'hepcidine radiomarquée a permis de montrer que l'hepcidine était capable de se lier à la ferroportine-GFP[277].

Nos résultats montrent également, qu'en absence d'hepcidine, outre la quantité augmentée de ferroportine, les quantités de DMT1 et Dcytb étaient augmentées dans les entérocytes. Comment peut-on expliquer la réponse de DMT1 et Dcytb ? On peut penser que la réponse de DMT1 est liée à l'IRE présent dans son ARNm : on fait alors l'hypothèse que le

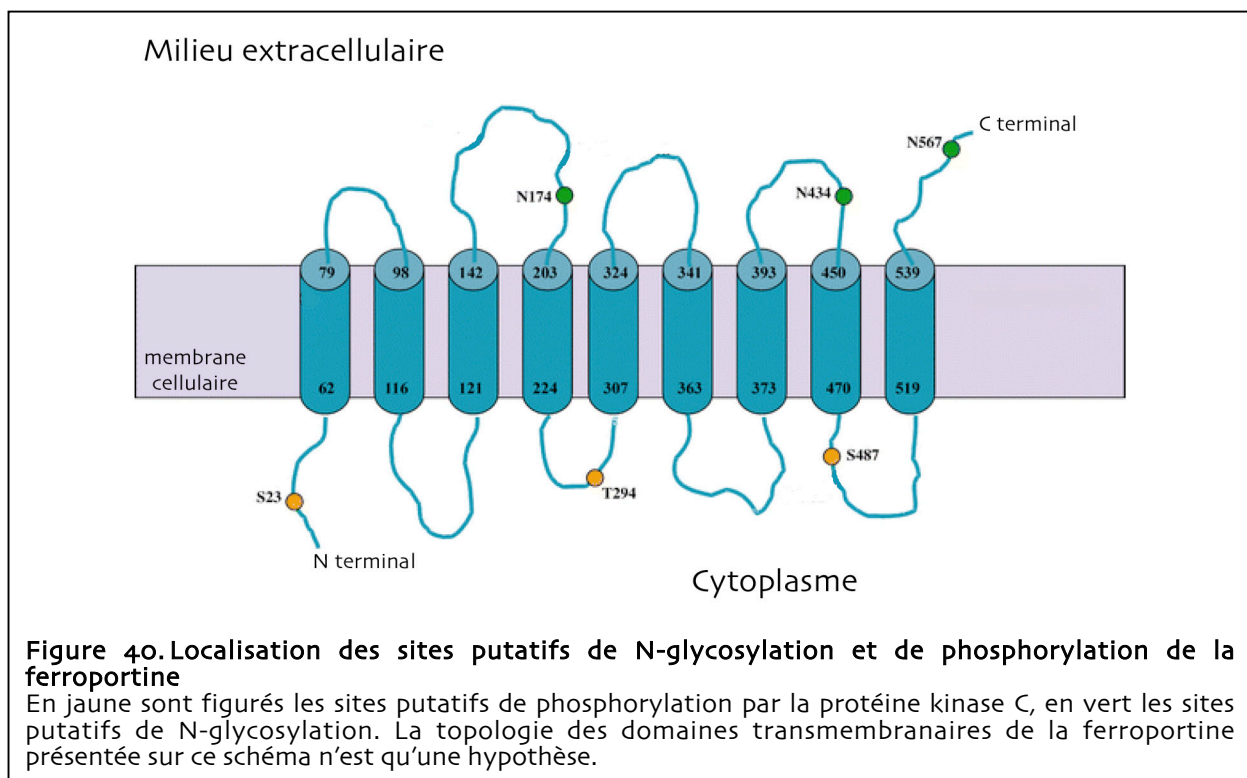
déficit en hepcidine entraîne une induction de l'activité des IRP à l'intérieur des entérocytes, soit directement, soit par modification du fer intracellulaire, conduisant à la stabilisation de l'ARNm DMT1+IRE et donc à une augmentation de la quantité de protéine. Pour *Dcytb*, les mécanismes de régulation de la transcription du gène sont encore inconnus et nécessitent des investigations supplémentaires (étude des séquences promotrices en réponse au fer, étude de la stabilité de l'ARNm, etc.). Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces résultats pourraient expliquer la surcharge en fer observée chez les souris KO *Uf2* par une augmentation de l'absorption intestinale de fer chez ces souris. La démonstration directe de cette augmentation de l'absorption intestinale de fer passe par des études de transport de fer radioactif chez ces souris. Dans la littérature, une diminution de l'hepcidine associée à une augmentation des quantités de DMT1, *Dcytb* et ferroportine dans le duodénum ainsi que le phénomène inverse, l'augmentation d'hepcidine associée à une diminution des protéines de l'absorption intestinale de fer, a été rapportée notamment par l'équipe de Greg Anderson[8, 105, 257]. Cette équipe a été parmi les premières à proposer un rôle direct de régulation de l'hepcidine sur les entérocytes, remettant ainsi en cause le modèle de la crypte[106]. Cette équipe a observé des variations de quantité de protéines et également d'ARNm des molécules étudiées. Nous avons entrepris d'étudier la quantité d'ARNm dans les souris *Uf2*<sup>-/-</sup> afin d'identifier les niveaux de régulation de l'hepcidine mais nous ne disposons pas d'un nombre suffisant de souris de même âge et les niveaux de transcrits sont très variables selon l'âge des souris (observations non publiées).

Enfin, nous avons montré que la déficience en hepcidine dans les souris KO *Uf2* est associée à une diminution de la céruloplasmine<sup>21</sup> hépatique. Le foie étant la plus grande source de céruloplasmine circulante, on peut penser que cette diminution est accompagnée d'une diminution de la céruloplasmine sérique. Une diminution de la céruloplasmine sérique a également été retrouvée chez des patients atteints d'hémochromatose HFE-dépendante[33, 204]. Ce qui reste difficile à expliquer dans l'hypothèse d'une diminution de la céruloplasmine circulante, c'est pourquoi on observe moins de fer dans les macrophages de patients atteints d'hémochromatose et dans les souris KO *Uf2*. On peut toutefois noter qu'il semble y avoir une certaine tolérance de l'organisme vis-à-vis de la diminution de la céruloplasmine : des personnes ayant une diminution de 50% de la céruloplasmine sérique ne présentent pas de symptômes cliniques (hypocéruloplasminémie, OMIM n° 604290). De plus, il a été montré que les monocytes et les cellules de Kupffer contiennent de l'ARNm codant pour la céruloplasmine[295, 399, 407] et la protéine céruloplasmine a été détectée dans des particules intracellulaires de macrophages différenciés à partir de moelle osseuse de souris (communication personnelle de C. Delaby et F. Canonne-Hergaux). Ainsi, de la céruloplasmine endogène produite par les macrophages pourrait pallier la diminution de céruloplasmine sérique pour l'export du fer recyclé.

---

<sup>21</sup> Rappelons que la céruloplasmine a été décrite comme étant indispensable à l'export du fer, de la cellule vers la circulation sanguine, et que, dans les souris KO *Cp* et chez les patients atteints d'acéruloplasminémie, on note une accumulation du fer hépatocytaire et macrophagique (voir paragraphe sur la céruloplasmine).

Enfin, des différences de poids moléculaires de la ferroportine ont été détectées dans la rate de souris *Usf2*<sup>-/-</sup> et pourraient résulter de modifications post-traductionnelles liées à l'absence d'hépcidine. L'étude récente de François Canonne-Hergaux *et al.* sur la détection de la ferroportine a également mis en évidence des différences de poids moléculaires de la ferroportine dans les trois organes étudiés chez une souris sauvage[37]. Canonne-Hergaux *et al.* ont montré que la ferroportine était glycosylée dans les trois tissus[37]. La glycosylation de la ferroportine dans le foie et la rate a très récemment été confirmée par une autre équipe[311]. On peut également penser que la ferroportine est une protéine phosphorylée. Il existe en effet plusieurs sites putatifs de N-glycosylation et de phosphorylations dans la séquence protéique de la ferroportine[1, 252] (Figure 40).



Toutes les questions soulevées par l'étude des souris *Usf2*<sup>-/-</sup> pourront être adressées par l'analyse des souris KO *Hepc1* générées au laboratoire qui ne présentent pas d'augmentation de la létalité par rapport aux souris contrôles mais reproduisent les perturbations du métabolisme du fer des souris KO *Usf2*[218] (voir « Résultats complémentaires »). On envisage ainsi dans ces souris de :

- mesurer les niveaux d'ARNm des molécules du métabolisme du fer par RT-PCR quantitative et par l'utilisation de puces à ARN (IronChip, développée par Martina Muckenthaler[269]) dans le duodénum, le foie et la rate ;
- mesurer les activités IRP dans les trois organes ;
- mesurer la céruloplasmine sérique et d'étudier l'expression de la céruloplasmine macrophagique après isolation des macrophages de rate ou de foie ;
- étudier la phosphorylation et la glycosylation de la ferroportine

- mesurer l'absorption intestinale de fer radioactif.

Par ailleurs, afin de confirmer les mécanismes éventuels de régulation par l'hepcidine, il est important de vérifier que les variations de DMT1, Dcytb, ferroportine et céruloplasmine observées dans les souris KO *Usp2* déficientes en hepcidine seront retrouvées en miroir dans des souris surexprimant un transgène hepcidine (voir chapitre suivant).



## Brief report

## Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice

Lydie Viatte, Jeanne-Claire Lesbordes-Brion, Dan-Qing Lou, Myriam Bennoun, Gaël Nicolas, Axel Kahn, François Canonne-Hergaux, and Sophie Vaulont

**Evidence is accumulating that hepcidin, a liver regulatory peptide, could be the common pathogenetic denominator of all forms of iron overload syndromes including HFE-related hemochromatosis, the most prevalent genetic disorder characterized by inappropriate iron absorption. To understand the mechanisms whereby hepcidin controls iron homeostasis in vivo, we have analyzed the level of iron-related proteins by**

**Western blot and immunohistochemistry in hepcidin-deficient mice, a mouse model of severe hemochromatosis. These mice showed important increased levels of duodenal cytochrome b (Dcytb), divalent metal transporter 1 (DMT1), and ferroportin compared with control mice. Interestingly, the level of ferroportin was coordinately up-regulated in the duodenum, the spleen, and the liver (predominantly in the Kupffer cells). Finally, we**

**also evidenced a decrease of ceruloplasmin in the liver of hepcidin-deficient mice. We hypothesized that the deregulation of these proteins might be central in the pathogenesis of iron overload, providing key therapeutic targets for iron disorders. (Blood. 2005;105:4861-4864)**

© 2005 by The American Society of Hematology

## Introduction

Tight regulation of iron absorption is critical for the organism, as both iron deficiency and iron excess are associated with cellular dysfunction. Dietary iron is absorbed by duodenal enterocytes. Briefly,  $\text{Fe}^{3+}$  is thought to be reduced at the apical side of the enterocyte to  $\text{Fe}^{2+}$  by the reductase duodenal cytochrome b (Dcytb) and transported through the plasma membrane by the divalent metal transporter 1 (DMT1). Once in the cytoplasm, iron is either stored in ferritin or transferred to the plasma by the basolateral exporter ferroportin. Then,  $\text{Fe}^{2+}$  is oxidized by the ferroxidase hephaestin and enters the circulation bound to transferrin (for review, see Miret et al<sup>1</sup>). Iron absorption represents only 10% of the iron needs, and to meet the demand for heme production necessary for erythropoiesis, iron is recycled from senescent red blood cells by the macrophages of the reticuloendothelial system.

Recently, hepcidin, a peptide secreted by the liver in response to iron loading and inflammation, has been proposed to regulate plasma iron by limiting duodenal iron absorption and iron release by macrophages (for review, see Ganz<sup>2</sup> and Nicolas et al<sup>3</sup>). Conversely, hepcidin production was found inhibited by anemia and hypoxia, allowing for increased iron absorption.<sup>4</sup> There were 2 mouse models that helped in establishing the regulatory role of hepcidin. First, the *Usp2* knock-out mice<sup>5</sup> that completely lack hepcidin, which demonstrated massive iron overload resembling the hemochromatosis phenotype (ie, multi-visceral iron overload with sparing of the reticuloendothelial

system), and, second, the transgenic mouse model constitutively expressing hepcidin, which developed severe hyposideremia and anemia.<sup>6</sup> Still, little is known about the mode of action of hepcidin in vivo. To address this question and to understand the mechanisms of the deregulation of iron absorption in hepcidin-deficient mice, the level of iron-related proteins was studied in the 3 organs implicated in iron homeostasis, namely duodenum, spleen, and liver, the major site of iron storage.

## Study design

## Animals and treatment

*Usp2* knock-out mice were previously described.<sup>5</sup> Mice were maintained on a standard laboratory mouse chow (AO3; Usine d'Alimentation Rationnelle, Epinay-sur-Orge, France). Iron overload was produced by 3% carbonyl iron supplemented in the diet for 14 days.

## Western blot analysis

Microsomal and cytosolic fractions from frozen tissues of 2- to 5-month-old mice were prepared as previously described.<sup>7</sup> Rabbit polyclonal antimouse DMT1 and antimouse ferroportin antibodies were described (Canonne-Hergaux et al<sup>7</sup>; and F.C.-H., Adriana Donova, C. Delaby, H.-J. Wang, N.C. Andrews, P. Gros, "Coordinated upregulation of duodenal and macrophage ferroportin proteins in response to iron restricted erythropoiesis," submitted April 2005). Rabbit polyclonal antimouse Dcytb was a kind gift from A. McKie.<sup>8</sup> Mouse monoclonal antimouse ceruloplasmin antibody was purchased

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 567, Centre National de la Recherche Scientifique, et Université René Descartes, Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, Paris, France; and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 409, Faculté de médecine Xavier Bichat, Paris, France.

Submitted December 2, 2004; accepted February 3, 2005. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, February 15, 2005; DOI 10.1182/blood-2004-12-4608.

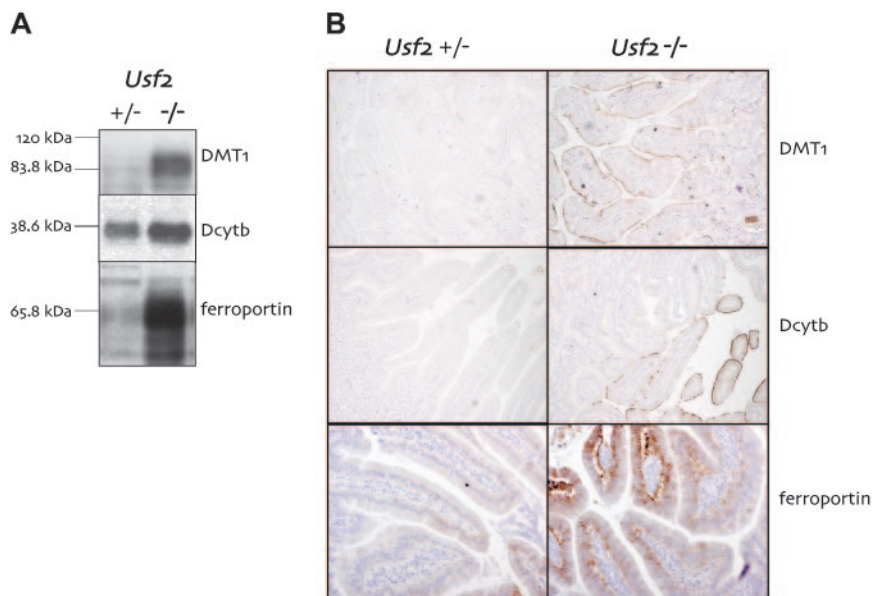
Supported by INSERM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the French Ministry of Education and Research ("Action

Concertée Incitative"). D.-Q.L. and J.-C.L.-B. received grants from Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR).

**Reprints:** Sophie Vaulont, Département de Génétique, Développement et Pathologie Moléculaire, Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, 24, rue du Fg St Jacques 75014 Paris, France; e-mail vaulont@cochin.inserm.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2005 by The American Society of Hematology



**Figure 1. Protein levels of iron-related genes in the duodenum of hepcidin-deficient mice.** (A) Western blot analysis of DMT1, Dcytb, and ferroportin (on 80  $\mu$ g crude membrane preparation) from the duodenum of *Usf2*<sup>-/-</sup> and *Usf2*<sup>+/-</sup> mice. Molecular weight markers are indicated on the left. A typical experiment, representative of at least 3 independent experiments, is shown. (B) Immunohistochemistry using antimouse DMT1, Dcytb, and ferroportin antibodies on the duodenum of *Usf2*<sup>-/-</sup> and *Usf2*<sup>+/-</sup> mice. Original magnification,  $\times 10$ .

from BD Biosciences (San Jose, CA). Finally, rabbit polyclonal antimouse L-ferritin antibody was a kind gift from P. Santambrogio and S. Levi.<sup>9</sup>

### Immunohistochemistry

Tissues from 9- to 10-month-old mice were fixed in 4% formaldehyde. Sections in paraffin were subjected to microwave and then processed for immunohistochemistry using the EnVision+ System–horseradish peroxidase (HRP) (diaminobenzidine [DAB]) kit (DAKO, Trappes, France) according to the manufacturer's methods. Primary antibodies against DMT1, ferroportin, and Dcytb were diluted at 1:1500, 1:75, and 1:50 respectively, before use. All microscopy was performed using a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with  $4\times/0.10$  NA,  $20\times/0.75$  NA, and  $60\times/1.40$  oil objective lenses. Digital images were captured with a Nikon Dxm1200 camera and Nikon ACT-1 v2.63 software (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France).

## Results and discussion

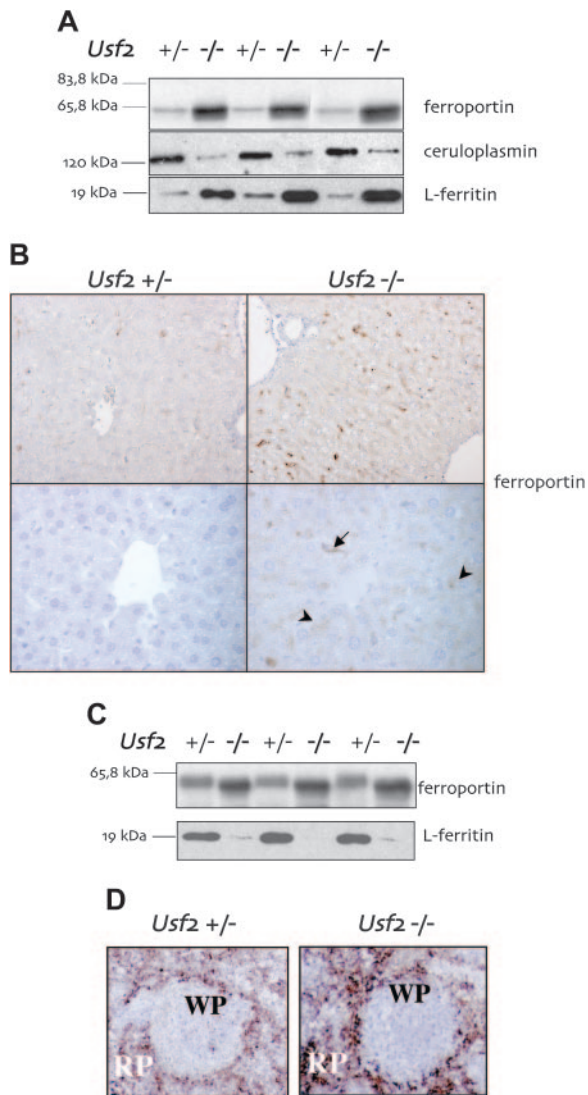
The level of proteins implicated in iron absorption was assessed in the duodenum of hepcidin-deficient mice by Western blot and immunohistochemistry (Figure 1A-B). DMT1, Dcytb, and ferroportin were found to be dramatically increased in *Usf2*<sup>-/-</sup> mice compared with their littermate controls. This increase was observed at the apical border of *Usf2*<sup>-/-</sup> enterocytes for DMT1 and Dcytb, and at the basolateral side for ferroportin. We hypothesized that the increase of proteins responsible for iron absorption would be one mechanism accounting for massive iron overload in hepcidin-deficient mice. In good agreement with our results, the lab of G. Anderson has provided strong indirect inverse correlative data between hepcidin expression and the duodenal level of DMT1, Dcytb, and ferroportin proteins in various pathophysiologic situations including iron-deficient diet (Frazer et al<sup>10</sup>), pregnancy (Millard et al<sup>11</sup>), and phenylhydrazine treatment (Frazer et al<sup>12</sup>). In contrast, synthetic hepcidin in Caco2 cells was recently demonstrated to act only at the apical side by decreasing iron uptake through down-regulation of DMT1 protein and without any modification of the iron efflux and ferroportin expression.<sup>13</sup> The reason for this discrepancy is difficult to explain but might be related to the in

vitro system, and the nature and concentration of the synthetic hepcidin used in these experiments.

In agreement with the liver iron accumulation in the *Usf2*<sup>-/-</sup> mice,<sup>5</sup> an increased content of hepatic L-ferritin was observed (Figure 2A). Interestingly, hepcidin-deficient mice showed increased hepatic ferroportin levels, mainly due to an up-regulation of ferroportin in the Kupffer cells, a well-known site of ferroportin expression<sup>14,15</sup> (Figure 2A and 2B). However, while hepatocytes of control mice were negative for the presence of ferroportin, a faint staining was evidenced in the hepatocytes of hepcidin-deficient mice. Although it is established that the ferroportin gene is expressed in hepatocytes and hepatoma cell lines, the presence and the subcellular localization of the protein in these cells have remained elusive.<sup>14-17</sup> However, detection of ferroportin in the liver of hepcidin-deficient mice favors a role of hepcidin in hepatocytic and macrophagic expression of ferroportin.

Ceruloplasmin, a soluble ferroxidase produced by the liver, plays a key role in iron homeostasis by favoring cellular iron release and iron incorporation into transferrin (for review, see Hellman and Gitlin<sup>18</sup>). Surprisingly, while the ferroportin exporter was up-regulated in the liver of hepcidin-deficient mice, ceruloplasmin was found to be down-regulated (Figure 2A). This down-regulation of ceruloplasmin was confirmed by immunohistochemistry (data not shown). The increased ferroportin and decreased ceruloplasmin levels are expected to be the consequence of hepcidin deficiency rather than liver iron overload since in experimentally iron-loaded mice, the level of hepatic ferroportin was unaltered, while ceruloplasmin levels were increased (data not shown). The decrease of hepatic ceruloplasmin in *Usf2*<sup>-/-</sup> mice was quite unexpected and deserves further investigation. However, in agreement with the liver iron overload associated to a marked impairment in hepatocyte iron efflux observed in ceruloplasmin knock-out mice,<sup>19</sup> we speculate that ceruloplasmin deficiency could contribute to the iron overload in *Usf2*<sup>-/-</sup> mice.

Splenic macrophages are important for iron recycling from senescent red blood cells. In hepcidin-deficient mice, we previously described the apparent iron deficiency of the spleen,<sup>5</sup> an observation further illustrated here by the decreased expression of



**Figure 2. Protein levels of iron-related genes in the liver and the spleen of hepcidin-deficient mice.** Western blot analysis of ferroportin (on 80  $\mu$ g crude membrane preparation), and of ceruloplasmin and L-ferritin (on 20  $\mu$ g cytosolic preparation) from the liver (A) and the spleen (C) of *Usf2*<sup>-/-</sup> and *Usf2*<sup>+/-</sup> mice. Molecular weight markers are indicated on the left. Immunohistochemistry using antimouse ferroportin antibody on the liver (B) and on the spleen (D) of *Usf2*<sup>-/-</sup> and *Usf2*<sup>+/-</sup> mice. Original magnification,  $\times 20$  (top row, panel B),  $\times 60$  (bottom, and  $\times 4$ , panel D). Kupffer cell (black arrow) and hepatocyte (black arrowheads) staining are pointed. RP and WP indicate red pulp and white pulp, respectively.

splenic L-ferritin (Figure 2C). Interestingly, an increase of ferroportin was also observed in the spleen of *Usf2*<sup>-/-</sup> mice together with a slight change in the molecular size of the protein, most likely due to posttranslational modification. The increase of ferroportin was specific to the macrophages of the red pulp as assessed by immunohistochemistry (Figure 2D). The splenic ferroportin up-regulation could explain the iron deficiency in the spleen of these mice.

In conclusion, hepcidin deficiency is leading to an up-regulation of DMT1, Dcytb, and ferroportin in the duodenum; a decrease of ceruloplasmin in the liver; and a coordinate up-regulation of ferroportin levels in duodenum, liver, and spleen. This latter result is in agreement with the data of Canonne-Hergaux et al (F.C.-H., Adriana Donova, C. Delaby, H.-J. Wang, N.C. Andrews, P. Gros, "Coordinated upregulation of duodenal and macrophage ferroportin proteins in response to iron restricted erythropoiesis," submitted April 2005), demonstrating similar up-regulation of ferroportin in situations of pathophysiologic hepcidin deficiency due to iron-restricted erythropoiesis. In addition, the same correlation was found in heterozygous polycythemic *Pcm* mice where down-regulation of hepcidin during postnatal development correlates with profound increases in ferroportin protein levels in duodenum and liver.<sup>20</sup> Very interestingly, while this paper was in preparation, Nemeth et al<sup>21</sup> reported that, in cultured cells, ferroportin levels were regulated by direct interaction with hepcidin, resulting in the internalization and degradation of ferroportin. In absence of hepcidin, this hepcidin-induced degradation of ferroportin would be abrogated, leading to ferroportin accumulation at the cell surface. From these results, it remains to be established whether the duodenal increases of DMT1 and Dcytb are secondary responses to local enterocyte iron deficiency. Further experiments are now needed to determine whether the same hepcidin/ferroportin pathway is used in all 3 tissues to regulate iron transport activity and to determine the impact of ferroportin regulation on the other iron-related genes in the duodenum.

## Acknowledgments

We are indebted to Andrew McKie for the kind gift of the Dcytb antibody, and we thank Paolo Santambrogio and Sonia Levi for their generous gift of the L-ferritin antibody. We thank Carole Beaumont for helpful discussion.

## References

- Miret S, Simpson RJ, McKie AT. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr.* 2003;23:283-301.
- Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 2003;102:783-788.
- Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29:327-335.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002;110:1037-1044.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. 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.* 2001;98:8780-8785.
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:4596-4601.
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood.* 1999;93:4406-4417.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001;291:1755-1759.
- Santambrogio P, Cozzi A, Levi S, et al. Functional and immunological analysis of recombinant mouse H- and L-ferritins from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2000;19:212-218.
- Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology.* 2002;123:835-844.
- Millard KN, Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut.* 2004;53:655-660.
- Frazer DM, Inglis HR, Wilkins SJ, et al. Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut.* 2004;53:1509-1515.

13. Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, Srai SK. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood*. 2004;104:2178-2180.
14. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000;275:19906-19912.
15. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000;403:776-781.
16. Zhang AS, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA. Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood*. 2004;103:1509-1514.
17. Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A. The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol*. 2003;39:710-715.
18. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:439-458.
19. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10812-10817.
20. Mok H, Jelinek J, Pai S, et al. Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development*. 2004;131:1859-1868.
21. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090-2093.



## **Article 3: Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice**

Viatte L, Nicolas G, Lou DQ, Bennoun M, Lesbordes-Brion JC, Canonne-Hergaux F, Schönig K, Bujard H, Kahn A, Andrews NC and Vaulont S. Blood. 2005 Dec 8

**Création d'un modèle transgénique inductible hepcidine et application : l'induction chronique d'hepcidine modifie la distribution du fer tissulaire chez des souris *Hfe*<sup>-/-</sup>**

### **Introduction**

Le modèle murin de surexpression de l'hepcidine à notre disposition, les souris TTR-*Hepc1*, ne nous permet pas l'étude du rôle de l'hepcidine à l'âge adulte sur l'absorption intestinale de fer et le recyclage du fer. En effet, chez ces souris, l'expression du transgène dans le foie fœtal entraîne le blocage du transport placentaire de fer conduisant à une anémie dès le stade E15,5 (voir « Article 1 »)[284]. Cette anémie souvent sévère entraîne une forte létalité à la naissance et avant le sevrage[281]. Seuls quelques animaux exprimant faiblement le transgène TTR-*Hepc1* survivent sans injection de fer à la naissance[281].

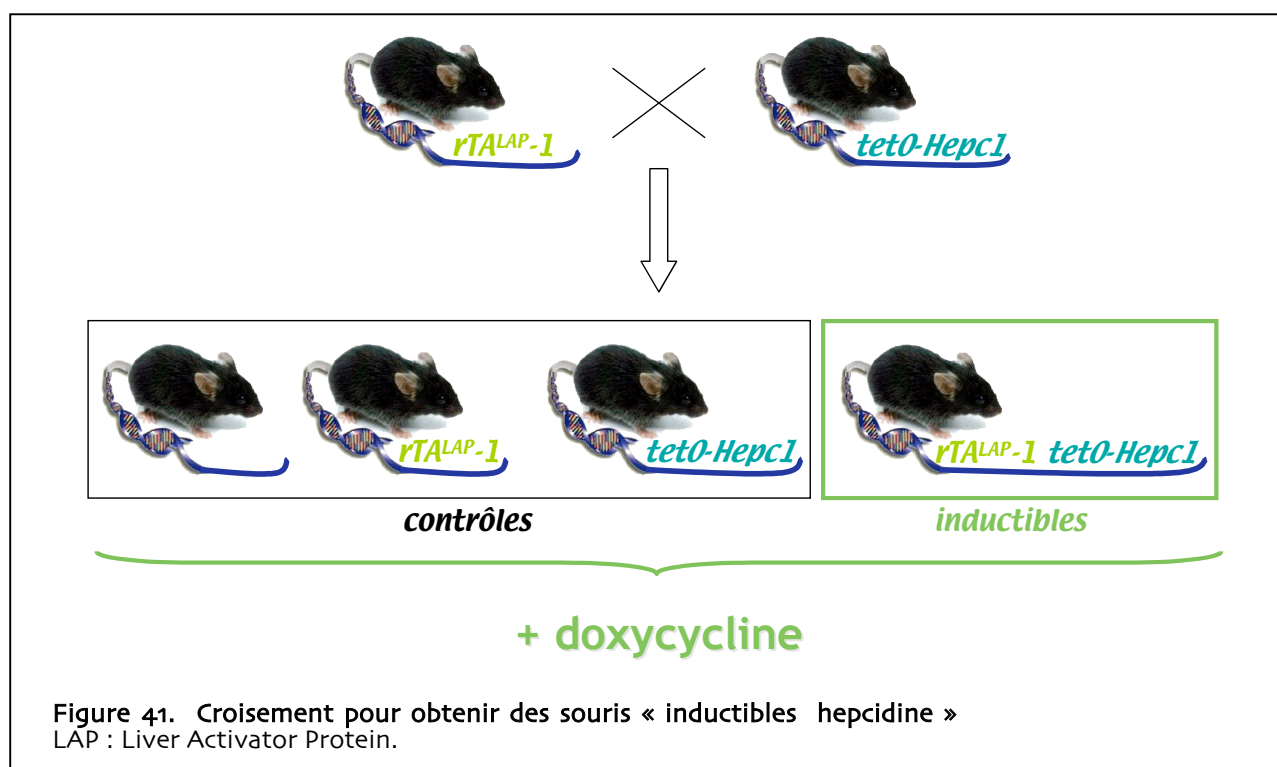
Afin de disposer d'un modèle viable permettant d'étudier le rôle de l'hepcidine à l'âge adulte, nous avons donc décidé de créer des souris surexprimant l'hepcidine de façon inductible. Nous avons choisi pour cela le système Tet ON mis au point par l'équipe d'Hermann Bujard à Heidelberg[131] (pour une revue sur ce système d'expression conditionnelle de transgène, voir[226]). Le système Tet ON est dérivé de l'opéron tétracycline développé par *Escherichia coli* pour résister à cet antibiotique. Ce système repose sur l'interaction, dépendante de la tétracycline, d'une protéine TetR et de l'opérateur tétracycline *tetO*. Chez la bactérie, la tétracycline interagit avec TetR empêchant sa liaison à la séquence *tetO* (principe du système Tet OFF). Dans le système Tet ON, la protéine TetR a été modifiée pour que sa liaison aux séquences opérateurs *tetO* ne se fasse qu'en présence de l'inducteur, la doxycycline (analogue de la tétracycline). La protéine modifiée est appelée rTA. La séquence du gène *rTA* est fusionnée aux séquences codant pour le domaine de transactivation VP16. Le ciblage tissu spécifique de la protéine hybride rTA-VP16 est garanti par l'ajout en amont d'un promoteur tissu spécifique. Dans notre cas, ce sont les séquences promotrices du gène *LAP* (pour Liver Activator Protein aussi appelé *C/EBPβ*) qui ont été utilisées pour induire l'expression du transgène dans le foie. Ce transgène est appelé rTA<sup>LAP</sup>-1[339]. Des souris portant ce transgène produisent constamment la protéine rTA dans le foie. En présence de doxycycline, rTA se lie à l'opérateur *tetO* et fait s'exprimer par son domaine de transactivation VP16 la séquence codante du gène d'intérêt, dans notre cas *Hepc1*, située en aval de cet opérateur (**Figure 1A de l'article**).

Nous avons choisi ce système inductible parmi d'autres car il permet d'induire de façon reproductible et à de hauts niveaux l'expression d'un transgène par l'administration d'antibiotique et car cette induction est réversible par retrait de l'antibiotique. Il permet également d'étudier les effets d'une induction à court ou bien long terme du gène d'intérêt.

Nous avons utilisé ce modèle afin de tester, non plus le rôle préventif de l'hepcidine dans la surcharge en fer de l'hémochromatose (voir « Article 1 »)[284] mais le rôle éventuel thérapeutique de l'hepcidine dans un organisme où la surcharge en fer est déjà présente.

## Résultats

Pour surexprimer l'hepcidine de manière inductible, nous avons croisé deux lignées de souris transgéniques afin d'obtenir des souris capables d'induire l'hepcidine par administration de l'inducteur. Les souris transgéniques  $rTA^{LAP-1}$  proviennent du laboratoire d'Hermann Bujard[339]. Nous avons créé au laboratoire les souris *tetO-Hepc1* qui porte un transgène composé des séquences de l'opérateur *tetO* en amont de l'ADNc codant pour *Hepc1* et des séquences codant pour la queue polyA de la  $\beta$ -globine. Le croisement de ces deux types de souris transgéniques génère des souris ne portant aucun transgène, des souris portant un des deux transgènes ou bien des souris possédant les deux transgènes. Ce sont ces dernières qui sont susceptibles d'exprimer *Hepc1* après induction par la doxycycline (**Figure 1A de l'article**). Les autres souris sont utilisées comme contrôles (**Figure 41**). Nous appellerons par la suite les souris possédant les deux transgènes *tetO-Hepc1* et  $rTA^{LAP-1}$  les souris « inductibles ».



Onze lignées transgéniques ont été testées pour savoir si, après induction, les souris  $rTA^{LAP-1} tetO-Hepc1$  issues de ces lignées exprimaient bien le transgène. Seule une lignée parmi les 11 exprimait le transgène après induction. C'est cette lignée qui a été utilisée pour les expériences. Toutes les souris sont traitées à la doxycycline car il a été montré que celle-ci était capable de chélater le fer[133]. Ainsi, pour ne pas biaiser les expériences, les souris inductibles traitées à la doxycycline sont comparées à des souris contrôles également traitées à la doxycycline (**Figure 41**).

#### ◆ Caractérisation du modèle transgénique inductible hepcidine

Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser ces souris inductibles après induction à court terme et à long terme de l'hepcidine transgénique. L'induction à court terme se fait par injection intrapéritonéale de doxycycline. Les souris ont ensuite été sacrifiées 3h, 6h, 9h ou 18h après l'injection pour mesurer l'expression d'*Hepc1* et des gènes endogènes hepcidine dans le foie. Le sérum a été prélevé pour observer l'effet de l'expression de l'hepcidine transgénique sur le fer sérique. Les Northern blots faits à partir de foie de ces souris montrent que le transgène *tetO-Hepc1* est exprimé dès 3h après injection. Son expression est maximale 9h après l'injection et semble diminuer 18h après l'injection (**Figure 1B de l'article**). L'expression du transgène hepcidine est accompagnée d'une diminution du fer sérique qui est significative 6h après l'injection et toujours présente 18h après l'injection (**Figure 1C de l'article**). Ces résultats montrent pour la première fois l'effet hyposidérémiant in vivo de l'hepcidine produite par le foie dans une souris adulte.

Pour connaître les effets à long terme dans une souris adulte d'une production prolongée d'hepcidine dans le foie, nous avons donné aux souris inductibles de la doxycycline dans l'eau de boisson et observé les paramètres hématologiques (mesure du nombre de globules rouges, du taux d'hémoglobine, de l'hématocrite et du volume globulaire moyen) de ces souris après 10, 14 et 20 jours d'induction. Après 3 semaines d'induction par la doxycycline, les souris inductibles expriment fortement le transgène, répriment leur gène endogène et diminuent leur fer sérique (**Figure 2A de l'article**). L'expression du transgène est associée à une diminution des paramètres hématologiques dès 14 jours d'induction (**Figures 2A et 2B de l'article**). Nous avons également étudié les quantités de fer dans la rate des souris inductibles par coloration de Perls<sup>22</sup> et nous avons observé une rétention du fer dans les macrophages spléniques de souris inductibles exprimant fortement le transgène (résultats non montrés). Ces résultats montrent qu'une anémie, par défaut de fer disponible pour l'érythropoïèse, s'est installée suite à l'expression continue du transgène hepcidine. De plus, l'anémie est réversible par retrait de l'agent inducteur (résultats non montrés).

Ce modèle de surexpression inductible d'*Hepc1* est donc capable de reproduire les effets attendus de l'hepcidine : une diminution du fer sérique à court terme, probablement par inhibition du relargage du fer macrophagique, et l'installation d'une anémie à long terme probablement suite à l'action combinée d'une inhibition de l'absorption intestinale de fer et de son recyclage macrophagique.

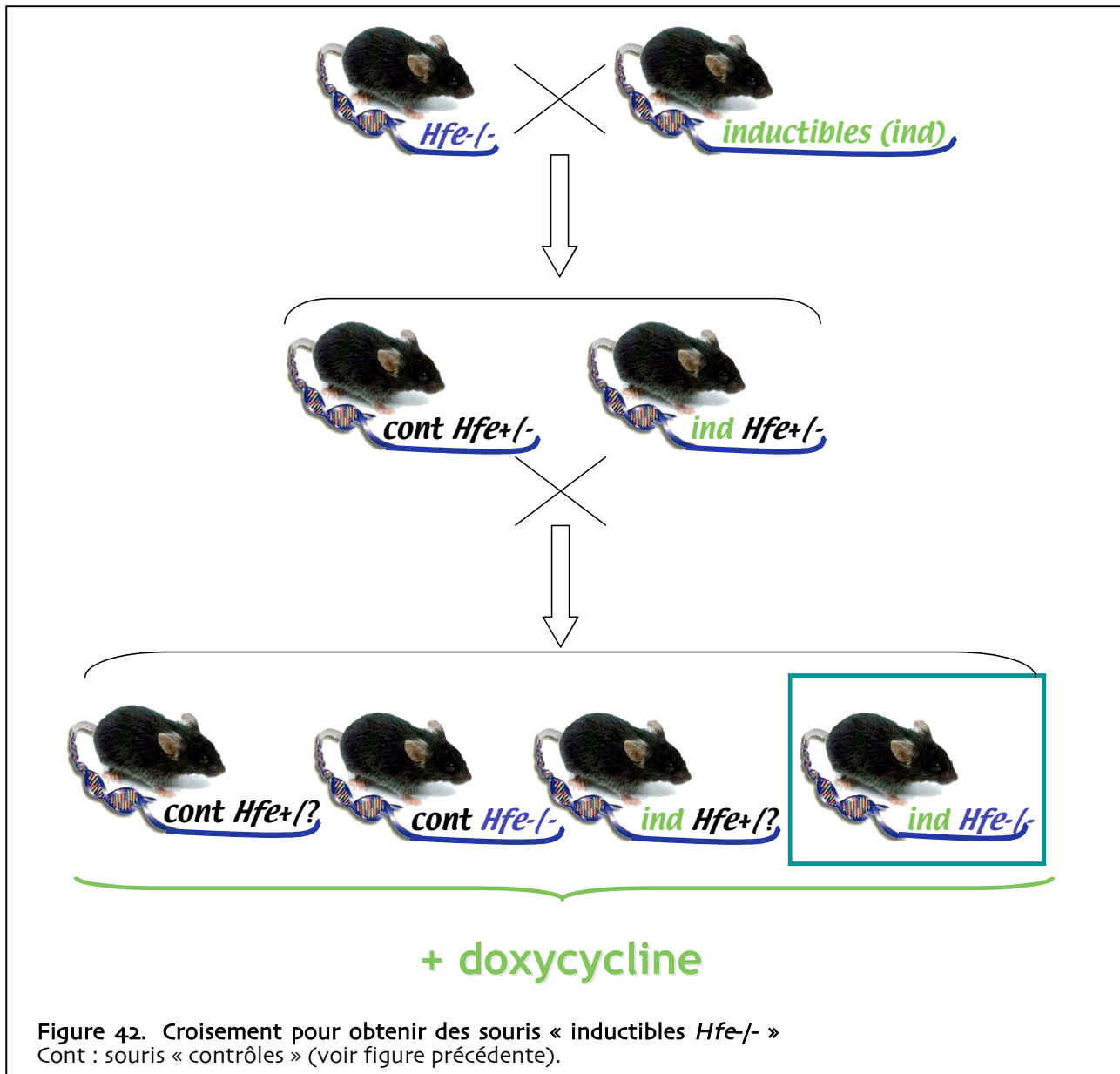
#### ◆ Effet thérapeutique de l'hepcidine sur la surcharge en fer des souris *Hfe*<sup>-/-</sup>

Afin de tester l'effet thérapeutique de l'hepcidine, nous avons décidé d'utiliser ce modèle transgénique inductible pour apporter de l'hepcidine supplémentaire dans un organisme déjà surchargé en fer. Pour cela nous avons croisé les souris inductibles avec les souris hémochromatosiques *Hfe*<sup>-/-</sup>. Les souris inductibles *Hfe*<sup>+/-</sup> obtenues ont ensuite été

---

<sup>22</sup> Nous avons également dosé le fer splénique total mais les grandes variations obtenues dans les valeurs de dosage d'un animal à l'autre ne nous permettent pas de dégager de tendances significatives entre le fer splénique des souris inductibles et celui des souris contrôles.

croisées entre elles afin d'obtenir des souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> (Figure 42). À deux mois, lorsque la surcharge en fer des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> est déjà installée, nous avons commencé le traitement à la doxycycline pour induire le transgène hepcidine.

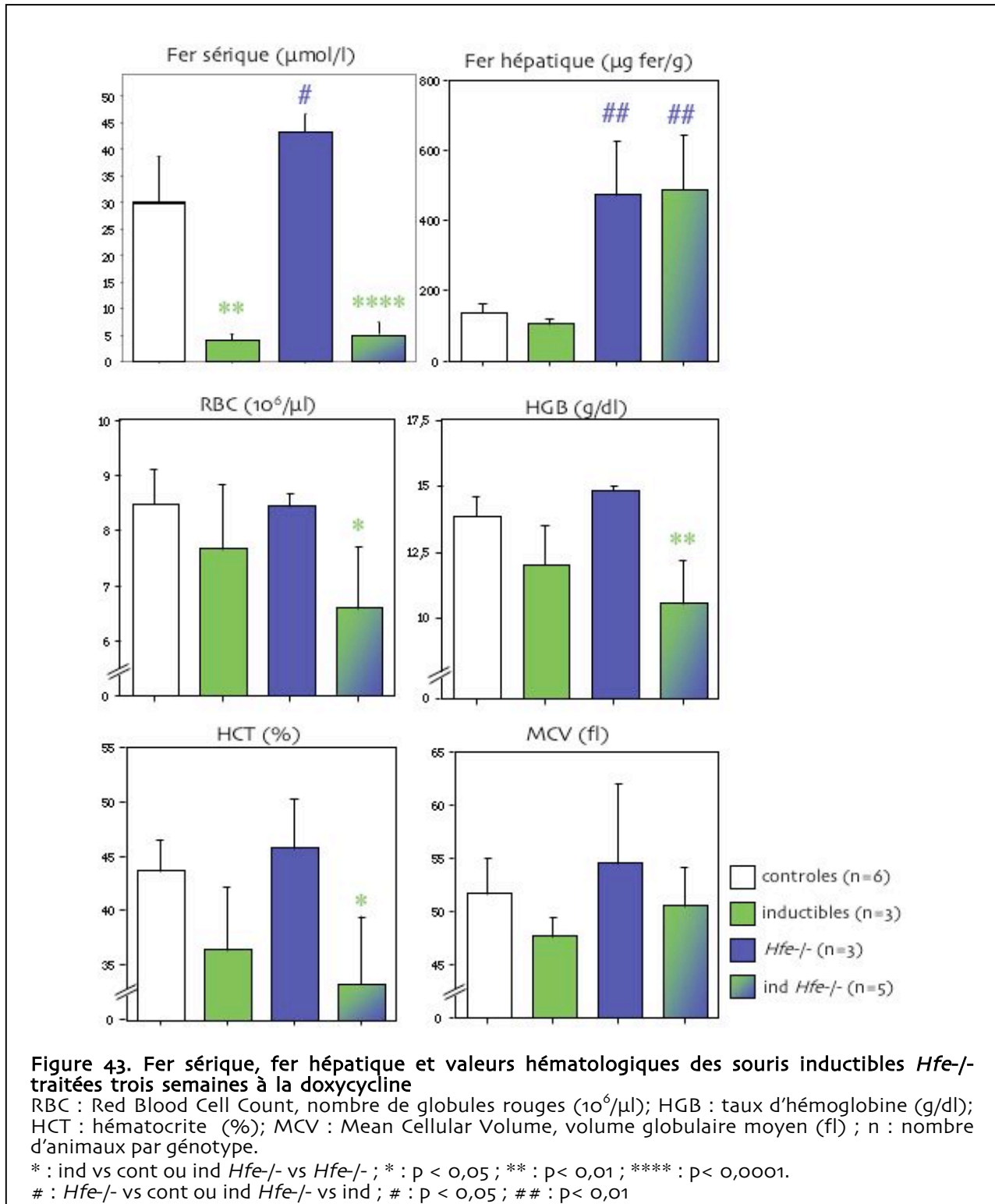


Après trois semaines de traitement à la doxycycline, le duodénum, le foie et la rate de ces souris ont été prélevés pour mesurer les quantités d'hepcidine, de ferroportine, de ferritine et de fer présentes dans ces organes. Le sang a également été prélevé pour mesurer le fer sérique et les paramètres hématologiques.

On retrouve dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> une quantité inappropriée de transcrits hepcidine endogènes au regard de la surcharge en fer, comme nous l'avons vu précédemment (voir « Article 1 ») (Figure 3A de l'article). Comme attendu, les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> ont plus de fer hépatique et de fer sérique que les souris contrôles (Figure 43 et Figure 3 de l'article). Dans le foie des souris *Hfe*<sup>-/-</sup>, le fer s'accumule dans les hépatocytes situés autour des espaces portes (Figure 4A de l'article). L'augmentation du fer hépatique dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> est associée à une augmentation de la quantité de ferritine L dans le foie probablement par



régulation du fer intracellulaire via les IRP (**Figure 3B de l'article**). La rate des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> est, comme nous l'avons précédemment décrit, déficiente en fer. Nous n'avons ainsi pas pu détecter la ferritine L par western blot (**Figure 3B de l'article**) et peu de macrophages sont colorés au Perls dans la rate des *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figure 4A b de l'article**).



L'expression du transgène hepcidine est toujours accompagnée d'une forte diminution du fer sérique quel que soit le génotype *Hfe* (**Figure 43** et **Figure 3 de l'article**). Il est à noter que le fond génétique des souris inductibles a été modifié suite au croisement avec les souris

KO *Hfe*. Cette différence de fond génétique pourrait expliquer le fait que la diminution des paramètres hématologiques des souris inductibles ne soient ici pas significative après 3 semaines d'induction (**Figure 43**) contrairement à ce que l'on a observé lors de l'étude cinétique à long terme (**Figure 2B de l'article**). Les souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> ont la même quantité de fer hépatique que les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> et, par conséquent, la même quantité de ferritine L dans le foie (**Figure 43** et **Figure 3B de l'article**). En revanche, le fer n'est pas réparti de la même façon dans le foie des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> et des inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup>. En effet, la coloration de Perls montre, qu'à quantité égale, le fer est localisé dans les hépatocytes chez la souris *Hfe*<sup>-/-</sup> alors qu'on retrouve ce fer à la fois dans les hépatocytes et les macrophages des souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figure 4A a et c de l'article**). De la même façon, on observe plus de fer dans les macrophages de la rate des inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> comparés à ceux des *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figure 4A b et d de l'article**). Cette augmentation du fer macrophagique de la rate est accompagnée d'une augmentation de la ferritine L dans la rate des inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figure 3B de l'article**). Enfin, lorsqu'on observe les quantités de fer présentes dans le duodénum par une méthode sensible de détection (Perls DAB), on constate une rétention du fer dans les entérocytes des souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> comparé aux souris *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figure 4C b et d de l'article**). Il semble donc que l'induction de l'hepcidine transgénique dans les souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> a conduit à la rétention du fer dans les macrophages et les entérocytes.

Nous avons ensuite voulu étudier les niveaux de ferroportine dans les souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> traitées pendant trois semaines avec la doxycycline. En effet, la ferroportine est une cible reconnue de l'hepcidine : il a été montré, comme nous l'avons vu précédemment, qu'*in vitro*, l'hepcidine se lie, internalise et dégrade la ferroportine[277] et nous avons montré que l'absence d'hepcidine dans les souris KO *Usp2* conduit à l'augmentation de la quantité de protéine ferroportine *in vivo* (voir « Article 2 »)[369]. Alors que la ferroportine est bien présente dans les cellules de Kupffer, nous détectons difficilement la ferroportine dans les hépatocytes de souris contrôles (résultats non montrés). Les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> augmentent légèrement la quantité de ferroportine par rapport aux souris contrôles et la ferroportine semble présente essentiellement dans les cellules des Kupffer dans le foie des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figures 3B et 4B a et c de l'article**). Dans la rate, la ferroportine des macrophages de la pulpe rouge (**Figure 4B b de l'article**) semble également présente en plus grande quantité dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> comparées aux souris contrôles (**Figure 3B de l'article**). Chez les souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> l'expression du transgène hepcidine est associée à une diminution de la ferroportine des macrophages du foie et de la rate (**Figures 3B et 4B de l'article**). Dans le duodénum, on observe également une diminution de la ferroportine à la membrane basolatérale des entérocytes des souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> comparées aux souris *Hfe*<sup>-/-</sup> (**Figure 4C a et c de l'article**). On observe donc, à l'inverse des souris *Usp2*<sup>-/-</sup> (voir « Article 2 »)[369], une diminution de la quantité de ferroportine dans le duodénum, le foie et la rate après induction du transgène hepcidine.

## Discussion

Cet article décrit un nouveau modèle d'expression inductible du gène *Hepc1* permettant l'étude de l'effet de l'hepcidine à l'âge adulte.

Nous avons montré que le premier paramètre modifié par l'expression du transgène hepcidine 6h après induction est le fer sérique qui diminue. L'équipe de T. Ganz a également voulu étudier le rôle de l'hepcidine *in vivo* sur le métabolisme du fer en injectant de l'hepcidine humaine purifiée[320]. L'injection intrapéritonéale de 50  $\mu$ g d'hepcidine humaine purifiée entraîne une diminution du fer sérique dans une souris normale dès 4 h après injection[320]. Cette même équipe a par la suite montré que la diminution du fer sérique par de l'hepcidine synthétique apparaissait dans l'heure qui suit l'injection et qu'elle dure jusqu'à 48 h après l'injection d'hepcidine[321]. Ainsi l'effet hyposidérémiant de l'hepcidine transgénique que nous observons est-il tout à fait compatible avec celui obtenu avec de l'hepcidine purifiée ou synthétique. Le délai de la réponse (1 h pour l'hepcidine synthétique vs 6 h pour l'hepcidine transgénique) peut simplement s'expliquer par les processus d'activation de la transcription de la traduction et la sécrétion de l'hepcidine transgénique.

Curieusement, alors que nous voyons une répression des gènes endogènes hepcidine dans nos souris inductibles, Rivera *et al.* ne retrouvent pas de répression du gène endogène *Hepc1* chez la souris après injection de l'hepcidine humaine purifiée[320]. Nos résultats nous font nous demander, qui de l'hepcidine elle-même et/ou de la diminution du fer sérique a entraîné la répression des gènes endogènes hepcidine. Dans le cas d'une influence de l'hepcidine elle-même, il faut envisager une spécificité d'espèces, l'hepcidine humaine n'étant pas capable de réprimer les gènes hepcidine murins. Nous envisageons, afin de répondre à cette question, de cultiver des hépatocytes primaires de souris inductibles et d'induire lors de la culture l'expression du transgène, en prenant toujours comme contrôle, des hépatocytes de souris contrôles traités de la même manière à la doxycycline. Une répression du gène endogène suite à l'induction du transgène dans l'hépatocyte en culture, favoriserait l'hypothèse d'un effet de rétrocontrôle négatif de l'hepcidine sur elle-même dans un contexte où le fer environnant ne devrait pas varier. Lorsque l'hepcidine synthétique humaine et murine sera disponible en grande quantité, nous envisageons également de tester leur activité *ex vivo* dans des hépatocytes en culture primaire sur l'expression des gènes hepcidine.

Nous avons observé l'installation d'une anémie, avec diminution de tous les paramètres hématologiques étudiés, dès 14 jours d'induction continue d'hepcidine transgénique dans nos souris inductibles. Pour faire exprimer sur une longue période de l'hepcidine : l'équipe de T. Ganz a induit dans des souris immunodéficientes (souris NOD-SCID) des tumeurs par injection de cellules hépatomateuses porteuses d'un transgène codant pour l'hepcidine humaine[320]. Les tumeurs produisent alors de l'hepcidine humaine retrouvée dans l'urine des souris. Comme nous l'avons observé dans nos souris, cette production d'hepcidine est accompagnée d'une diminution significative des taux d'hémoglobine. De façon surprenante, l'équipe de T. Ganz a observé cette diminution des taux d'hémoglobine uniquement lorsque les souris sont sous un régime riche en fer. En régime pauvre en fer, l'hémoglobine est diminuée dans les souris formant des tumeurs

contrôles et les tumeurs produisant de l'hepcidine ne diminuent pas de façon significative le taux d'hémoglobine par rapport aux tumeurs contrôles<sup>23</sup>[320].

Le modèle transgénique que nous avons développé semble donc un outil important dans l'étude des mécanismes d'action de l'hepcidine et, en particulier, c'est le seul modèle physiologique permettant d'étudier l'effet de l'hepcidine à long terme chez l'adulte. En effet, on peut penser que la production de tumeurs dans un modèle de souris immunodéficientes n'est pas le modèle idéal pour étudier le métabolisme du fer qui est sensible à l'état inflammatoire de l'organisme. Une alternative serait d'injecter de façon répétée de l'hepcidine (purifiée, recombinante ou synthétique) tous les jours ou tous les deux jours afin de maintenir un taux élevé d'hepcidine sérique. En effet, une injection unique d'hepcidine diminue le fer sérique durablement, jusqu'à 48h et l'hepcidine humaine injectée est éliminée du sang dans les 24h[321]. On ne sait pas encore si l'apport répété d'hepcidine par injection n'est pas toxique pour l'organisme. Enfin, l'injection quotidienne pourrait apporter un stress supplémentaire qui pourrait se répercuter sur le métabolisme du fer des souris.

Notre modèle transgénique inductible sera utilisé pour étudier de façon exhaustive l'expression des gènes du métabolisme du fer par mesure des taux d'ARNm et de protéines. La comparaison des souris induites à court ou bien long terme nous donnera peut-être des indices supplémentaires sur l'effet de l'hepcidine dans ses organes cibles. On peut imaginer que l'hepcidine agisse à différents niveaux de régulation (transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel) ou sur des cibles moléculaires différentes (d'abord la ferroportine puis d'autres cibles moléculaires par exemple) à court terme et long terme. De plus, l'étude comparative des souris inductibles *Hepc1* et des souris KO *Hepc1* récemment développées dans le laboratoire (voir « Résultats complémentaires ») nous permettra peut-être d'identifier de nouvelles cibles de l'hepcidine en utilisant par exemple les puces à ARN ou la protéomique.

Nous avons montré pour la première fois, que l'expression d'hepcidine transgénique dans une souris *Hfe*<sup>-/-</sup> était capable d'entraîner un changement de distribution du fer. Les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> accumulent le fer dans les hépatocytes et présentent une déficience en fer des macrophages du foie et de la rate. Après induction de l'hepcidine, on observe une rétention du fer dans les macrophages et les entérocytes que l'on peut attribuer à une diminution de la ferroportine dans ces cellules. Il semble également que le fer est diminué dans les hépatocytes des souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Hfe*<sup>-/-</sup>. En effet, si l'on compare les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> avec les souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup>, le dosage du fer total du foie ne bouge pas avec l'expression du transgène hepcidine, mais le fer augmente dans les macrophages, on peut donc penser que les hépatocytes de souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> contiennent moins de fer que ceux des souris *Hfe*<sup>-/-</sup>. De façon surprenante, Rivera *et al.* observent que le fer hépatocytaire des souris formant des tumeurs produisant de l'hepcidine est augmenté. Les auteurs de cet article concluent que l'hepcidine a entraîné la rétention de fer dans les hépatocytes probablement par diminution de la ferroportine. Nous avons mesuré la ferroportine dans nos

---

<sup>23</sup> Le laps de temps entre la formation des tumeurs chez les souris et les mesures de fer sérique, hépatique, splénique et hématologiques n'est pas précisé dans l'article cité.

souris et n'avons pas été capables de la détecter dans les hépatocytes de souris inductibles. De plus nous observons que le fer a pu sortir des hépatocytes après induction de l'hepcidine transgénique. Nous pensons donc que la ferroportine n'est pas impliquée dans cet export mais qu'il pourrait exister une autre protéine permettant au fer de sortir de l'hépatocyte lorsque les demandes de l'organisme sont accrues. La création récente de souris KO ferroportine avec délétion du gène spécifiquement dans l'hépatocyte semble montrer que l'absence de ferroportine entraîne une accumulation du fer dans les hépatocytes et suggère donc que la ferroportine est essentielle à l'export du fer hépatocytaire[75]. Il serait intéressant de faire, par exemple, des saignées à ces souris afin de voir si en situation d'érythropoïèse augmentée le fer n'est toujours pas capable de sortir des hépatocytes en absence de ferroportine.

L'accumulation du fer dans les macrophages plutôt que dans les hépatocytes est souvent associée en clinique humaine à un moindre risque de complications hépatiques. Ainsi, certains patients atteints d'hémochromatose par mutation du gène codant pour la ferroportine (*SLC40A1*) accumulent le fer d'abord dans les macrophages puis dans les hépatocytes[308]. Ces patients développent rarement les fibroses et carcinomes observés chez les patients ayant une mutation dans le gène *HFE*[412]. On peut ainsi penser que le changement de distribution du fer observé dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> suite à l'expression du transgène hepcidine, s'il est reproduit chez l'homme, pourrait avoir un effet bénéfique sur l'état général du patient. D'autant plus que, contrairement à ce qui est observé chez les patients porteurs d'une mutation de *SLC40A1*[53], les souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> retiennent du fer dans les entérocytes. Ce fer étant probablement perdu lors de l'exfoliation des entérocytes dans la lumière intestinale, la rétention du fer dans les entérocytes des souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> entraînerait une diminution de l'entrée de fer dans le sang. Nos résultats suggèrent donc, qu'en plus de changer la distribution du fer dans les souris *Hfe*<sup>-/-</sup>, l'hepcidine transgénique diminue l'absorption intestinale totale du fer.

Nous apportons ainsi pour la première fois un espoir de traitement alternatif pour les patients atteints d'hémochromatose liée à HFE. En effet, cette maladie est souvent diagnostiquée tardivement, une fois que la surcharge en fer a déjà perturbé les fonctions endocriniennes ou cardiaques. Ainsi, si l'hepcidine est capable de modifier la distribution du fer en réduisant sa toxicité et de limiter l'entrée de fer dans l'organisme, elle pourrait être une alternative efficace aux saignées couramment utilisées pour traiter les patients et qui peuvent être mal tolérées par certains patients.

## Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice

Running title: Conditional hepcidin expression in transgenic mice

Scientific heading: Red cells

Lydie Viatte<sup>1</sup>, Gaël Nicolas<sup>2</sup>, Dan-Qing Lou<sup>1</sup>, Myriam Bennoun<sup>1</sup>, Jeanne-Claire Lesbordes-Brion<sup>1</sup>, François Canonne-Hergaux<sup>3</sup>, Kai Schönig<sup>4</sup>, Hermann Bujard<sup>4</sup>, Axel Kahn<sup>1</sup>, Nancy C. Andrews<sup>5</sup> and Sophie Vaulont<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Cochin, Département de Génétique, Développement et Pathologie Moléculaire, Paris, F-75014 France. Inserm, U567, Paris, F-75014 France. CNRS, UMR 8104, Paris, F-75014 France. Université Paris Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, UMR-S 8104, Paris, F-75014 France.

<sup>2</sup>Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, F-75015, France. Inserm, U665, Paris, F-75015 France.

<sup>3</sup>Inserm, U409, Paris, F-75018 France. Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris, F-75018 France.

<sup>4</sup>Zentrum für Molekulare Biologie, 69120 Heidelberg, Germany

<sup>5</sup>Children's Hospital Boston, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Howard Hughes Medical Institute, Boston, Massachusetts, USA.

**Financial support:** This work was supported by INSERM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the French Ministry of Education and Research ("Action Concertée Incitative"). Dan-Qing Lou and Jeanne Lesbordes received grants from ANVAR.

### Authors contributions

Lydie Viatte: designed and performed research, analyzed data, wrote the paper

Gaël Nicolas: designed and performed research

Dan-Qing Lou: analyzed data

Myriam Bennoun: performed research

Jeanne-Claire Lesbordes-Brion: performed research

Nancy Andrews: provided mouse model and wrote the paper

Kai Schonig: provided mouse model

Hermann Bujard: provided mouse model

François Canonne-Hergaux: contributed key reagents

Axel Kahn: analyzed data

Sophie Vaulont: designed research, analyzed data and wrote the paper.

### Corresponding author:

Sophie Vaulont

Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin Port Royal, 24, rue du Faubourg Saint Jacques 75014 Paris, France

e-mail [vaulont@cochin.inserm.fr](mailto:vaulont@cochin.inserm.fr)

Telephone (33)1 44412408

Fax (33)1 44412421

**Abstract:** 192

**Body:** 4179 words

**Figures:** 4

**References:** 41

## Abstract

We report the generation of a tetracycline-regulated (Tet ON) transgenic mouse model for acute and chronic expression of the iron regulatory peptide hepcidin in the liver. We demonstrate that short-term and long-term tetracycline-dependent activation of hepcidin in adult mice leads to hypoferremia and iron-limited erythropoiesis, respectively. This clearly establishes the key role of hepcidin in regulating the extracellular iron concentration. We previously demonstrated that, when expressed early in fetal development, constitutive transgenic hepcidin expression prevented iron accumulation in an *Hfe*<sup>-/-</sup> mouse model of hemochromatosis. We now explore the effect of chronic hepcidin expression in adult *Hfe*<sup>-/-</sup> mice that have already developed liver iron overload. We demonstrate that induction of chronic hepcidin expression in two month old *Hfe*<sup>-/-</sup> mice alters their pattern of cellular iron accumulation, leading to increased iron in tissue macrophages and duodenal cells but less iron in hepatocytes. This hepcidin-induced changes in the pattern of cellular iron accumulation are associated with decreased expression of the iron exporter ferroportin in macrophages but no detectable alteration of ferroportin expression in the hepatocytes. We speculate that this change in iron homeostasis could offer a therapeutic advantage by protecting against damage to parenchymal cells.



## Introduction

Although iron is essential for many cellular processes, particularly for mammalian erythropoiesis, iron in excess can be deleterious as it triggers production of free radicals. To maintain iron homeostasis, there is tight regulation of iron absorption by the duodenum and iron recycling from senescent erythrocytes by tissue macrophages. The recently identified hepatic peptide hepcidin has been proposed to be central to this regulation, acting as the principal iron-regulatory hormone to maintain iron homeostasis. Hepcidin is a 25 amino acid peptide synthesized by the liver, secreted into the bloodstream and excreted by the kidney <sup>1,2</sup>. Hepcidin expression is increased in iron overload <sup>3</sup> and decreased in iron deficiency <sup>4,5</sup>. Hepcidin-deficient mice accumulate iron in parenchymal cells with sparing of the reticuloendothelial system <sup>6</sup> and conversely, transgenic mice constitutively expressing hepcidin have markedly lower iron stores resulting in severe anemia <sup>7</sup>. In humans, the important physiological role of hepcidin was demonstrated by the identification of homozygous mutations of the hepcidin gene in patients with juvenile hemochromatosis <sup>8</sup>, a severe iron overload disorder characterized by increased intestinal iron absorption, increased serum iron and deposition of excess iron in parenchymal cells. Together, these observations are all consistent with that idea that hepcidin is a key regulator of iron homeostasis that acts by limiting both intestinal iron absorption and macrophage iron release. Recent studies indicate that, to achieve this function, hepcidin binds to ferroportin <sup>9</sup>, a transmembrane iron transporter necessary for iron export out of intestinal epithelial cells and macrophages <sup>10</sup>. Hepcidin binding induces internalization of ferroportin and its subsequent degradation <sup>9</sup>.

In humans, hepcidin dysregulation was demonstrated in two phenotypically opposite iron disorders, hereditary hemochromatosis (HH) and the anemia of inflammation (also referred to as the anemia of chronic disease). Hepcidin production was reported to be deficient in patients with HH attributable to mutations in *HFE*, *TFR2* or *HJV* <sup>11-13</sup>, thus explaining their

persistently increased iron absorption in the face of iron overload. In contrast, excessive hepcidin production was reported in patients with inflammatory and infectious disorders associated with the anemia of inflammation<sup>14,15</sup>. Increased hepcidin expression is expected to rapidly sequester iron in the macrophages and inhibit duodenal iron absorption, two hallmarks of the anemia of inflammation.

Recently, transgenic and mutant mouse models with hepcidin deficiency have provided significant insights into the important role of the hepcidin-ferroportin axis in iron metabolism<sup>16-19</sup>. In these models, hepcidin deficiency correlated with upregulated ferroportin protein in enterocytes, leading to increased intestinal iron absorption and increased plasma iron levels. In contrast, there have been few models developed to study the effects of hepcidin overexpression. We previously reported a transgenic mouse model in which the transthyretin (TTR) promoter was used to drive constitutive hepcidin synthesis<sup>20</sup>. Due to the very early activity of the TTR promoter in the fetal liver, the majority of the transgenic pups died within a few hours after birth from systemic iron deficiency associated with severe microcytic, hypochromic anemia. This phenotype suggested a hepcidin-dependent blockade of placental iron transport resulting from transgenic fetal hepcidin production late in gestation, when the endogenous hepcidin gene is not detectably expressed. To circumvent the early effects of hepcidin, we developed a conditional transgenic mouse model using a tetracycline-dependent inducible system (Tet ON)<sup>21</sup>. This model allows overexpression of hepcidin in the liver in response to doxycycline (a tetracycline analogue) treatment, allowing investigation of the effects of hepcidin on iron absorption and recycling in adult animals. Here, we report the effects of induced transgenic hepcidin expression on iron homeostasis in normal mice and mice with genetic hemochromatosis (*Hfe*<sup>-/-</sup> mice).

## Material and methods

### Animals

All mice used in the experiments were cared for according to criteria outlined by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals. Animals were maintained in a temperature- and light-controlled environment and were given free access to tap water and standard laboratory mouse chow (AO3, iron content 280 mg/kg, UAR, France). Only male mice were used in this study.

### Generation of transgenic mice

Null *Hfe*-deficient mice (*Hfe*<sup>-/-</sup> mice) have been described previously<sup>22</sup>. Full-length murine *Hepc1* cDNA was amplified using the forward primer 5'-GGGGGATATCAGGCCTCTGCACAGCAGAACAGAAGG-3' and the reverse primer 5'-GGGGGATATCAGGCCTCTATGTTTTGCAACAGATACC-3'. The *Hepc1* PCR fragment was subcloned into the P<sub>tet</sub>bi-1 plasmid (Clontech) containing a minimal CMV promoter regulated by a tet operator sequence, *tetO*, which is responsive to the regulatory rTA transactivator. The construct was confirmed by DNA sequence analysis. The 3.4-kbp *tetO*-*Hepc1* transgene was separated from the plasmid sequence by digestion with *AseI* and used for pronuclear microinjection. rTA<sup>LAP</sup>-1 mice, in which rTA is driven by the liver activator protein (LAP) promoter, were previously described<sup>23</sup>. Both transgenic lines (*tetO*-*Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1) had mixed genetic backgrounds that included contributions from C57BL/6, 129/Sv and DBA/2 strains.

Mice harboring only one of the two transgenes (either *tetO*-*Hepc1* or rTA<sup>LAP</sup>-1) were used as controls as they do not express transgenic hepcidin. Mice harboring both transgenes (*tetO*-*Hepc1*/rTA<sup>LAP</sup>-1 mice), referred to as “inducible mice”, expressed transgenic hepcidin

after doxycycline treatment.

Inducible mice were crossed with *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, to generate inducible/*Hfe*<sup>+/-</sup> mice (i.e. *tetO-Hepc1/rTA*<sup>LAP</sup>-1/*Hfe*<sup>+/-</sup> mice). Inducible/*Hfe*<sup>+/-</sup> mice were then intercrossed to generate inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (i.e. *tetO-Hepc1/rTA*<sup>LAP</sup>-1/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice). In this set of experiments littermates with *tetO-Hepc1/Hfe*<sup>+/-</sup>, *rTA*<sup>LAP</sup>-1/*Hfe*<sup>+/-</sup>, *tetO-Hepc1/Hfe*<sup>+/+</sup> or *rTA*<sup>LAP</sup>-1/*Hfe*<sup>+/+</sup> genotypes were considered controls and animals with *tetO-Hepc1/Hfe*<sup>-/-</sup> and *rTA*<sup>LAP</sup>-1/*Hfe*<sup>-/-</sup> genotypes were considered *Hfe*<sup>-/-</sup> mice.

### **Genotyping of transgenic mice by PCR analysis and Southern blotting**

Southern blot genotyping of *tetO-Hepc1* mice was done as described<sup>7</sup>. *AseI*-digested DNA was electrophoresed, transferred to a nylon membrane (Hybond-N, Amersham Pharmacia), and hybridized with a probe corresponding to the 3.4-kbp *AseI* fragment of the *tetO* plasmid. The probe was labeled with [32P]dCTP by random priming with a commercially available kit (Megaprime DNA labeling systems, Amersham Pharmacia).

Genomic DNA (0.5–1 µg) was used in 50-µl PCR reactions. The *tetO-Hepc1* transgene was amplified using forward primer 5'-CGTGCTAGCGCGGCCTCGAC-3' (annealing to a sequence in multicloning site I of the P<sub>tet</sub>bi-1 plasmid) and reverse primer 5'-AACAGATAACCACACTGGGAA-3' (annealing in *Hepc1* cDNA). The PCR was performed for 34 cycles (40 s at 94°C, 40 s at 60°C and 40 s at 72°C), after initial denaturation at 94°C for 4 min, concluding with a final elongation step at 72°C for 5 min. A 297-bp-specific product corresponded to the *tetO-Hepc1* transgene. The *rTA*<sup>LAP</sup>-1 transgene was amplified using forward primer 5'-CCATGTCTAGACTGGACAAGA-3' and reverse primer 5'-CTCCAGGCCACATATGATTAG-3'. The PCR was performed for 37 cycles (30 s at 94°C, 60 s at 57°C and 30 s at 72°C) after initial denaturation at 94°C for 4 min, concluding with a final elongation step at 72°C for 5 min. PCR reactions were carried out in 20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.05% W-1, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM each dNTP, 0.2 µM of each primer,

and 4 units of *Taq* polymerase (Invitrogen). The reaction mixtures were analyzed on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide. Genotyping results from Southern blot and PCR analyses were consistent. Finally, *Hfe* genotyping was performed using primers specific for the wild-type *Hfe* allele (forward 5'-TTCTTTAGATAGCCTCTCAC-3' and reverse 5'-GTGGCGAGTCACTTTCACCA-3') and the targeted *Hfe* allele (forward 5'-AGTTGGGAGTGGTGTCCGA-3' and reverse 5'-CTAGCTTCGGCCGTGACG-3'), resulting in 502 bp and 190 bp products, respectively. The PCR was performed for 40 cycles (30 s at 94°C, 56 s at 56°C and 30 s at 72°C) after initial denaturation at 94°C for 4 min, concluding with a final elongation step at 72°C for 5 min.

### **Doxycycline administration**

Doxycycline, a derivative of tetracycline, is the substance of choice for the induction of the Tet ON system. Mice of all genotypes were treated with doxycycline. For short-term induction, doxycycline hydrochloride (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was freshly dissolved in 0.9% NaCl at a final concentration of 4 mg/ml and filter-sterilized prior to intraperitoneal (IP) injection. A dose of 2 mg of doxycycline was given once to each mouse.

For long-term induction, doxycycline hydrochloride (2 mg/ml final concentration) and sucrose (3% final concentration) were dissolved in distilled sterile water and administered *ad libitum* from foil-covered water bottles. The doxycycline-sucrose solution was prepared fresh every 3 to 4 days.

### **Hematological analysis**

Blood was sampled before sacrifice by retro-orbital phlebotomy into heparinized tubes (Capiject™ T-MLH, Terumo Medical Corporation). Blood cell counts and erythrocyte parameters were determined using a MaxM coulter automatic analyzer.

## **Northern blotting**

Total RNA from mouse tissues was isolated using RNAlplus (QBiogene, Illkirch, France). Twenty micrograms of liver RNA was denatured in formaldehyde-containing buffer and electrophoresed through 1% agarose, 2.2 M formaldehyde gels. Northern blot analysis was performed as previously described <sup>6,24</sup>. Briefly, after electrophoresis, RNA was transferred to a nylon membrane (GeneScreen Plus, Dupont-NENTM Life Science Products) in 20X SSC buffer and probed simultaneously with cDNA probes specific for hepcidin and ribosomal 18S mRNAs. The probe used to detect hepcidin was prepared from a plasmid isolated by suppressive subtractive hybridization, pT-Adv/*Hepc1* <sup>6</sup>.

## **Iron measurements**

Quantification of serum or liver iron content was performed as previously described by Torrance and Bothwell <sup>25</sup> using IL test (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) on an Olympus AU400 automat. For histology, tissues were fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin, mounted onto slides and stained with Prussian blue and nuclear red counterstain using standard procedures. For Perls 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) staining, tissue sections were incubated for 20 min in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1M PBS, immersed in Perls solution (1:1, 2% HCl and 2% potassium ferrocyanide) at room temperature for 30 min and then incubated for 10 min in 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DAB.

## **Immunoblotting**

Microsomal and cytosolic fractions from frozen tissues of 3 month old mice were prepared as previously described <sup>16</sup>. Twenty µg of cytosolic protein solubilized in 1X Laemmli buffer and incubated for 30 min at room temperature (RT), or 20 to 50 µg of microsomal protein solubilized in 1X Laemmli buffer and incubated for 5 min at 100°C was electrophoresed by SDS PAGE and transferred to PVDF filters. Ponceau red staining

confirmed similar gel loading and similar transfer of proteins to the membranes. Immunoblots were pre-incubated with blocking solution [7% skim milk in TBST (0.15% Tween20 in Tris buffered saline)] prior to incubation with primary antibodies. Rabbit polyclonal anti-mouse ferroportin antibody was previously described <sup>16,18</sup> and rabbit polyclonal anti-mouse L-ferritin antibody was a kind gift from P. Santambrogio and S. Levi <sup>26</sup>. Antibodies were diluted in blocking solution as follows: anti-mouse ferroportin: 1/600 and anti-mouse L-ferritin: 1/1000. After incubation with antibodies, membranes were washed in TBST and then incubated with peroxidase-labeled anti-rabbit immunoglobulin (1/8000, Amersham). Signals were visualized by enhanced chemiluminescence (Supersignal West Pico, Pierce).

### **Immunohistochemistry**

Tissues from 3 month old mice were fixed in 4% formaldehyde. Paraffin sections were subjected to microwave treatment and then processed for immunohistochemistry using the EnVision+ System-HRP (DAB) kit (DAKO, Trappes, France) according to the manufacturer's recommendations. Primary antibody against ferroportin was diluted 1:75 before use. As a negative control, immunohistochemistry with no primary antibody was performed (not shown).



## Results

### Generation of a mouse line controlling hepcidin expression

To inducibly express transgenic hepcidin we chose a tetracycline-dependent Tet ON system that permits quantitative and deliberately regulated control of gene activity in the liver (Figure 1A). To develop transgenic mice, *Hepc1* cDNA controlled by the tet operator (*tetO-Hepc1* transgene) was transferred into mice by pronucleus injection and 11 potential founder animals carrying the transgene were generated. To select for the best trans-responder line, the *tetO-Hepc1* mice were crossed with rTA<sup>LAP</sup>-1 mice (previously described, see ref. <sup>23</sup>), harboring the coding sequence of the tetracycline-dependent transactivator under the control of a liver-specific promoter (LAP). The mothers were given doxycycline (2 mg/ml in 3% sucrose) in their drinking water from day 7 after birth until weaning to induce transgenic hepcidin expression in the breastfeeding pups. Expression of the *Hepc1* transgene was analyzed in offspring carrying both transgenes by assessing liver transgenic hepcidin mRNA on Northern blots. Of the 11 lines examined, only one showed high levels of transgenic *Hepc1* mRNA expression. This line was selected for further study.

### Short-term induction of transgenic hepcidin causes hypoferremia

Short-term expression of transgenic hepcidin was induced in two month old inducible mice (i.e. double transgenic mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes) by a single IP injection of doxycycline. Mice were sacrificed 3, 6, 9 or 18 hours after injection. Liver hepcidin mRNA levels were assessed by Northern blot and serum iron was determined. As shown in Figure 1B, transgenic hepcidin mRNA (Thepc, distinguished from endogenous hepcidin mRNA by its longer  $\beta$ -globin polyA) was detected as early as 3h after doxycycline injection. It reached a maximum level at 9 hours and then declined by 18 hours after injection. Doxycycline-induction of transgenic hepcidin was associated with decreased serum iron

beginning after 6 hours and lasting up to 18 hours (Figure 1C). Of interest, expression of endogenous hepcidin was repressed 3 hours after serum iron decreased (i.e., 9 hours after injection of doxycycline).

### **Long-term induction of transgenic hepcidin results in iron-restricted erythropoiesis**

Long-term induction of transgenic hepcidin was achieved by administering doxycycline to inducible mice in their drinking water. After three weeks of treatment, high levels of transgenic hepcidin mRNA were detected in the livers of the inducible mice (Figure 2A). As a consequence, these mice developed iron-restricted erythropoiesis and anemia as demonstrated by decreased serum iron, hemoglobin and red blood cell numbers (Figure 2A). The sustained expression of transgenic hepcidin resulted in decreased levels of the endogenous hepcidin mRNA (Figure 2A), as previously reported in mice constitutively expressing transgenic hepcidin <sup>7</sup>. To assess the time course of the development of anemia in inducible mice, blood was sampled and analyzed at different time-points during the three-week treatment (Figure 2B). Hematological indices tended to change ten days after induction. Decreased values became significant for all hematological parameters after 2 weeks of doxycycline treatment and lasted for at least three weeks. The effect of a 2-week doxycycline course was reversible, with red cell and hemoglobin levels returning to control values 10 days after doxycycline withdrawal (not shown).

### **Transgenic hepcidin induces altered pattern of iron distribution in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice**

We next asked whether hepcidin-induced iron depletion might alter the pattern of cellular iron accumulation seen in hereditary hemochromatosis. To this end, inducible mice were crossed with *Hfe*<sup>-/-</sup> mice. Inducible/*Hfe*<sup>+/-</sup> offspring were intercrossed to yield inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (i.e., mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes and with

*Hfe*<sup>-/-</sup> genotype). Two month old animals (control, *Hfe*<sup>-/-</sup> and inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice) were given doxycycline in their drinking water for three weeks.

As compared to control mice, *Hfe*<sup>-/-</sup> mice had increased serum iron levels ( $43 \pm 3$   $\mu\text{mol/l}$  in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, n=3 vs  $30 \pm 9$  in control mice, n=5; p = 0.05), increased liver iron content ( $471 \pm 166$   $\mu\text{g iron/g}$  of wet tissue in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, n= 3 vs  $127 \pm 33$  in control mice, n= 6; p = 0.0012) and concomitant accumulation of liver L-ferritin proteins (as assessed by immunoblot, Figure 3B). Ferritin levels in the spleens of *Hfe*<sup>-/-</sup> mice were, as in control mice, at the limit of detection. Finally, as previously reported<sup>11,20,27,28</sup>, hepatic endogenous hepcidin mRNA levels were inappropriately low relative to the iron burden in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice (Figure 3A).

High levels of transgenic hepcidin mRNA were detected in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice; endogenous hepcidin mRNA was undetectable (Figure 3A). Similar to inducible transgenic mice with wild type *Hfe* alleles, inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice had severe hypoferrremia ( $5 \pm 2.5$   $\mu\text{mol/l}$  in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice, n = 5 vs  $43 \pm 3$   $\mu\text{mol/l}$  in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, n = 5; p < 0.0001) and developed signs of iron-restricted erythropoiesis. Surprisingly, total liver non-heme iron content and liver L-ferritin protein levels were similar in mice of both genotypes ( $472 \pm 166$   $\mu\text{g iron/g}$  of wet tissue in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice, n= 5 vs  $485 \pm 169$  in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, n= 5) (Figure 3B). However, Perls staining of liver sections indicated that, although total liver iron content was unchanged, induction of hepcidin in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice resulted in an altered pattern of cellular iron accumulation. Indeed, while iron was primarily detected in hepatocytes of *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, iron was predominantly found in tissue macrophages (Kupffer cells) in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4A, c vs a). Similarly, splenic macrophage iron content was increased in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice as shown by increased splenic L-ferritin levels (Figure 3B) and markedly enhanced Perls staining of splenic red pulp macrophages (Figure 4A, d vs b).

### **Altered pattern of iron distribution is associated with changes in ferroportin expression**

As ferroportin is a major target of hepcidin<sup>9</sup>, we examined ferroportin expression in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice using immunoblotting and immunohistochemistry. In the livers of control mice, ferroportin is normally expressed at low levels (Figure 3B). Its expression was increased in the livers of *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, due to enhanced expression of ferroportin in Kupffer cells (Figure 4B a). The sustained expression of hepcidin in the inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice leads to a decrease in ferroportin in Kupffer cells as observed by both immunoblot analysis and immunohistochemistry (Figure 3B and Figure 4B, c vs a). Ferroportin expression varied in a similar fashion in splenic macrophages, with increased levels in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice and decreased levels in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (Figure 3B and Figure 4B, d vs b).

To assess the effect of transgenic hepcidin expression on intestinal iron absorption, Perls DAB staining and ferroportin immunodetection were used to evaluate the duodenum of *Hfe*<sup>-/-</sup> and inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice.

While ferroportin was clearly detected at the basolateral membrane of the absorptive enterocytes lining the intestinal villi of the *Hfe*<sup>-/-</sup> mice, a marked decrease in the amount of ferroportin was observed in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4C, a vs c). Concomitantly, there was a strong increase in the amount of stainable iron present in duodenal enterocytes in inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice as compared to *Hfe*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4C, d vs b).

## Discussion

We report the characterization of a new mouse model that allows inducible expression of the iron-regulatory hormone hepcidin. The effect of short-term induction of hepcidin was evaluated by giving a single dose of the inducer doxycycline to mice carrying transgenes mediating hepcidin expression. We found that induction was associated with decreased serum iron within 6 hours, consistent with a direct role of murine hepcidin *in vivo* in the development of hypoferremia. This result is in accord with the recent work of Rivera et al. who demonstrated that injection of synthetic human hepcidin triggered hypoferremia in mice 1 hour later<sup>29</sup>. The delay in decreased serum iron observed in our model is likely explained by the time needed for transactivation, transcription, and processing of hepcidin prior to its secretion in the bloodstream. The rapid effect of hepcidin in these models is most likely due to blockade of export of recycled iron from macrophages, a process which supplies most of the iron needed for erythropoiesis. Hepcidin-induced hypoferremia lasted at least 18 hours after a single dose of inducing drug in our transgenic model, a time course effect which is compatible with that reported by Rivera et al. using human radiolabeled hepcidin<sup>29</sup>.

The mechanism of regulation of hepcidin gene expression in response to iron status is not yet known. It was recently proposed that circulating diferric transferrin may directly regulate hepcidin gene expression and that transferrin receptor 2 (TFR2) is responsible for homeostatic iron sensing by the liver (reviewed in ref.<sup>30</sup>). Our observation that endogenous hepcidin gene expression was decreased 3 hours after serum iron decreased is consistent with the hypothesis that decreased iron bound to transferrin is involved in rapid down regulation of hepcidin synthesis.

To study the chronic effects of hepcidin, chronic induction was achieved by giving doxycycline in the drinking water. Under these conditions, mice carrying the inducible transgene showed iron retention in the macrophages (data not shown) and developed iron-

limited erythropoiesis two weeks after treatment. These characteristics are reminiscent of anemia of inflammation (also referred to as anemia of chronic disease) as already discussed by Rivera et al.<sup>31</sup>. These authors reported that mice implanted with tumor xenografts engineered to overexpressed human hepcidin developed severe anemia<sup>31</sup>. However, while those authors reported that hepcidin was shunting iron away from erythropoiesis by sequestering it predominantly in hepatocytes, we were unable to detect a significant amount of iron in the hepatocytes of our inducible mice (data not shown). Instead, iron was sequestered in macrophages as demonstrated for the inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice. This discrepancy may be explained by the different mouse strains and the complexity of the model used by Rivera and colleagues, who introduced hepatoma tumor cells into immunodeficient NOD-SCID mice maintained on a high iron diet<sup>31</sup>.

We previously reported that hepcidin could prevent iron overload in HFE-associated hemochromatosis by crossing transgenic mice constitutively expressing hepcidin TTR-*Hepc1* mice with *Hfe*<sup>-/-</sup> mice<sup>20</sup>. However, to consider possible therapy for affected patients, it was important to determine whether hepcidin treatment would be beneficial after iron overload was established. Indeed, hemochromatosis remains substantially under-diagnosed and, if untreated, can cause serious illness with complications including liver cirrhosis, fibrosis and hepatocellular carcinoma. It could be advantageous to manipulate iron homeostasis in patients with more advanced disease.

Therefore, we used an inducible transgene to effect chronic hepcidin replacement in adult animals that already had increased liver iron deposition. We demonstrated that supplementary expression of hepcidin in our murine hemochromatosis model leads to an altered pattern of cellular iron accumulation. Iron sequestration in the macrophage is associated with, and likely explained by hepcidin-induced ferroportin degradation. The link between ferroportin and hepcidin was first established by Nemeth et al., who demonstrated *ex vivo* that hepcidin was

able to bind to ferroportin, thereby inducing internalization and degradation of ferroportin, resulting in decreased export of cellular iron<sup>9</sup>. This finding has been replicated in several transfected cell lines<sup>3+2,33</sup> and, more recently, in bone marrow-derived macrophages expressing endogenous ferroportin<sup>34</sup>. In this study, we observed iron retention in splenic macrophages and enterocytes of *Hfe*<sup>-/-</sup> mice induced to express hepcidin, providing further evidence that hepcidin-induced ferroportin degradation explains the pleiotropic effects of hepcidin in the regulation of iron homeostasis *in vivo*.

The altered pattern of iron distribution in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice expressing the hepcidin transgene is the phenotypic opposite of the liver iron overload that occurs in genetic hemochromatosis associated with insufficient hepcidin. Interestingly, hepatocyte ferroportin expression is not appreciably different from normal in either case<sup>16,17</sup>. It is tempting to speculate that hepatocyte iron egress is governed by a hepcidin-ferroportin independent pathway. Alternatively, there may be distinct mechanisms for regulating ferroportin expression and/or activity in hepatocytes. However, ferroportin protein is difficult to detect in hepatocytes under normal conditions, and it remains possible that subtle changes in ferroportin expression would be impossible to discern under our experimental conditions.

Iron accumulation in splenic macrophages and consequent decreased serum iron in *Hfe*<sup>-/-</sup> mice expressing the inducible hepcidin transgene is reminiscent of the clinical features of patients with autosomal dominant iron overload due to pathogenic mutations in the ferroportin gene (reviewed in ref.<sup>35</sup>). In most cases, ferroportin mutations result in loss of protein function. Patients typically present with increased iron deposition in Kupffer cells (rather than hepatocytes) and low serum transferrin saturation. Some do not tolerate phlebotomy and develop a mild anemia<sup>36-38</sup>. Furthermore, in contrast to the other forms of hemochromatosis associated with hepcidin deficiency, hepcidin levels are elevated in these patients<sup>39</sup>. These patients rarely develop liver fibrosis or cirrhosis and they have few, if any



clinical manifestations of iron-storage disease. As recently suggested by Zoller et al., it appears that iron deposition in Kupffer cells is well tolerated<sup>40</sup>. Based on these observations, we speculate that the altered pattern of cellular iron distribution following hepcidin treatment could ameliorate hemochromatosis by reducing iron-induced damage of parenchymal cells. Furthermore, the hepcidin-induced down regulation of ferroportin and iron retention that we observed in enterocytes suggest that further iron absorption will be abrogated, thus preventing additional body iron accumulation. This result contrasts with studies of patients with three different types of ferroportin mutations, in which no enterocyte iron retention was observed<sup>41</sup>.

In conclusion, our results provide further support for the attractive hypothesis that hepcidin acts to decrease intestinal iron absorption and iron egress from the macrophages by down regulating ferroportin. It provides a rationale for using hepcidin or a hepcidin agonist in the treatment of iron overload disorders.

## Figure legends

### Figure 1. Development of mice expressing an inducible hepcidin transgene.

A. Schematic outline of the Tet ON regulatory system. The rTA protein acts as a strong transcriptional activator in the presence of doxycycline by binding to its cognate operator sequence (*tetO*).

B. Hepcidin mRNA levels in the livers of control mice and inducible mice (i.e. double transgenic mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes), 3, 6, 9 or 18 hours after a single intraperitoneal injection of doxycycline. Total liver RNA (20 µg) was fractionated by electrophoresis, blotted, and hybridized with hepcidin and 18S-labeled probes. A typical experiment is shown.

C. Serum iron levels (µmol/l) in animals injected with doxycycline 3, 6, 9 or 18 hours after treatment. Results are expressed relative to control serum iron (arbitrarily 100). White bars indicate control animals; black bars indicate inducible mice. Statistical analysis was performed using Student's t-test (unpaired, two tailed): \*p<0.05, at least 3 animals. Thepc - transgenic hepcidin mRNA; endo hepc - endogenous hepcidin mRNA.

### Figure 2. Long-term induction of transgenic hepcidin

A. Liver hepcidin mRNA levels. Control mice and inducible mice (i.e. double transgenic mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes) were given doxycycline in their drinking water for 3 weeks. Total liver RNA (20 µg) was fractionated by electrophoresis, blotted, and hybridized with hepcidin and 18S-labeled probes. Values for red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), and serum iron are shown for each animal. Thepc - transgenic hepcidin mRNA; endo hepc - endogenous hepcidin mRNA.

B. Hematologic indices of mice treated for 10, 14, or 20 days with doxycycline. Results are expressed relative to control serum parameters (arbitrarily 100). White bars indicate control

animals; black bars indicate inducible mice. Statistical analysis was performed using Student's t-test (unpaired, two tailed): \* $p < 0.05$   $n =$  at least 5 animals. RBC - red blood cell count ( $10^6/\mu\text{l}$ ); HGB- hemoglobin (g/dl); HCT - hematocrit (%); MCV - mean cell volume (fl).

**Figure 3. Characterization of mice carrying the inducible hepcidin transgenes crossed with *Hfe*<sup>-/-</sup> mice after treatment for 3 weeks with doxycycline**

In this figure, each column represents the same animal.

A. Hepcidin mRNA levels in the livers of control (cont), *Hfe*<sup>-/-</sup> and inducible/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (ind/*Hfe*<sup>-/-</sup>, i.e., mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes and with *Hfe*<sup>-/-</sup> genotype) treated for 3 weeks with doxycycline. Total liver RNA (20  $\mu\text{g}$ ) was fractionated by electrophoresis, blotted, and hybridized with hepcidin and 18S-labeled probes.

B. Ferritin and ferroportin levels as assessed by immunoblot analysis of livers and spleens of control, *Hfe*<sup>-/-</sup> and ind/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice treated for 3 weeks with doxycycline.

Anti-mouse L-ferritin antibody was used to probe 20  $\mu\text{g}$  of hepatic (upper panel) or splenic (lower panel) cytosolic extract. Anti-mouse ferroportin antibody was used to probe 50  $\mu\text{g}$  of hepatic (upper panel) or 20  $\mu\text{g}$  splenic (lower panel) microsomal extract.

Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left. The levels of serum iron and liver iron are shown for each animal.

**Figure 4. Perls staining and tissue ferroportin protein levels of liver, spleen and duodenum sections from mice carrying the inducible hepcidin transgenes crossed with *Hfe* knockout (*Hfe*<sup>-/-</sup>) mice and treated for 3 weeks with doxycycline**

A. & B. Typical Perls staining (A.) and ferroportin immunodetection (B.) using anti-mouse ferroportin antibody of liver (*a* and *c*; original magnification x40 in A., and x20 in B.) and spleen (*b* and *d*; original magnification x10) sections from *Hfe*<sup>-/-</sup> (*a* and *b*) and ind/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (i.e., mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes and with *Hfe*<sup>-/-</sup> genotype) (*c* and *d*). Non-heme iron stains blue. The liver iron content for each animal is shown.

C. Duodenum (original magnification x20) was stained for iron (*b* and *d*, Perls DAB staining, non-heme iron stains brown) and ferroportin immunodetection (*a* and *c*) in *Hfe*<sup>-/-</sup> (*a* and *b*) and in ind/*Hfe*<sup>-/-</sup> mice (i.e., mice harboring both *tetO-Hepc1* and rTA<sup>LAP</sup>-1 transgenes and with *Hfe*<sup>-/-</sup> genotype) (*c* and *d*).

## References

1. Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000;480:147-150.
2. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001;276:7806-7810.
3. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276:7811-7819.
4. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002;110:1037-1044.
5. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, et al. Heparin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology.* 2002;123:835-844.
6. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. 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.* 2001;98:8780-8785.
7. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:4596-4601.
8. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2003;33:21-22.
9. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306:2090-2093.
10. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1:191-200.
11. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet.* 2003;361:669-673.

12. Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Heparin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*. 2005;105:1803-1806.
13. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004;36:77-82.
14. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 2002;100:3776-3781.
15. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101:2461-2463.
16. Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, et al. Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood*. 2005;105:4861-4864.
17. Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest*. 2005;115:2187-2191.
18. Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, Wang H-j, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;00227.02005.
19. Mok H, Jelinek J, Pai S, et al. Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development*. 2004;131:1859-1868.
20. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;34:97-101.
21. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, et al. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10933-10938.
22. Levy JE, Montross LK, Cohen DE, Fleming MD, Andrews NC. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood*. 1999;94:9-11.
23. Schonig K, Schwenk F, Rajewsky K, Bujard H. Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:e134.
24. Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, et al. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. 2004;103:2816-2821.
25. Torrance JD, Bothwell TH. Tissue iron stores. *Methods Hematol*. 1980;1:90-115.
26. Santambrogio P, Cozzi A, Levi S, et al. Functional and immunological analysis of recombinant mouse H- and L-ferritins from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2000;19:212-218.
27. Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, et al. Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29:361-366.
28. Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, et al. Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and *Cybrd1* expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;34:102-107.
29. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*. 2005;106:2196-2199.
30. Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289:G631-635.
31. Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen OE, Ganz T. Heparin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood*. 2005;105:1797-1802.

32. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1324-1328.
33. Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, et al. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 2005;106:1092-1097.
34. Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005;106:3979-3984.
35. Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:131-138.
36. Jouanolle AM, Douabin-Gicquel V, Halimi C, et al. Novel mutation in ferroportin 1 gene is associated with autosomal dominant iron overload. *J Hepatol*. 2003;39:286-289.
37. ~~Wallace DF, Dixon JL, Ramm GA, Anderson GJ, Powell LW, Subramaniam N. Hemojuvelin (HJV) associated hemochromatosis: analysis of HJV and HFE mutations and iron overload in three families. *Haematologica*. 2005;90:254-255.~~ Wallace DF, Browett P, Wong P, Kua H, Ameratunga R, Subramaniam VN. Identification of ferroportin disease in the Indian subcontinent. *Gut*. 2005;54:567-568.
38. Morris TJ, Litvinova MM, Ralston D, Mattman A, Holmes D, Lockitch G. A novel ferroportin mutation in a Canadian family with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35:309-314.
39. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005;2004-2012-4844.
40. ~~Barisani D, Parafioriti A, Bardella MT, et al. Adaptive changes of duodenal iron transport proteins in celiac disease. *Physiol Genomics*. 2004;17:316-325.~~ Zoller H, McFarlane I, Theurl I, et al. Primary iron overload with inappropriate hepcidin expression in V162del ferroportin disease. *Hepatology*. 2005;42:466-472.
41. Corradini E, Montosi G, Ferrara F, et al. Lack of enterocyte iron accumulation in the ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35:315-318.

Figure 1

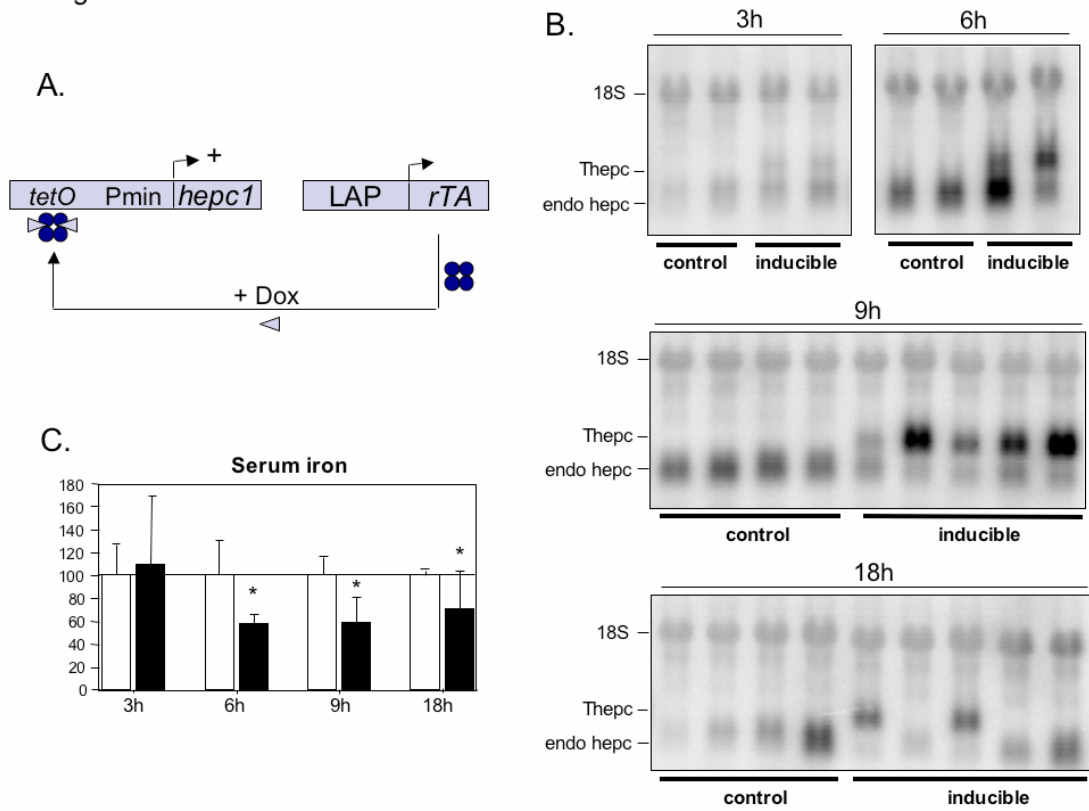


Figure 2 A.

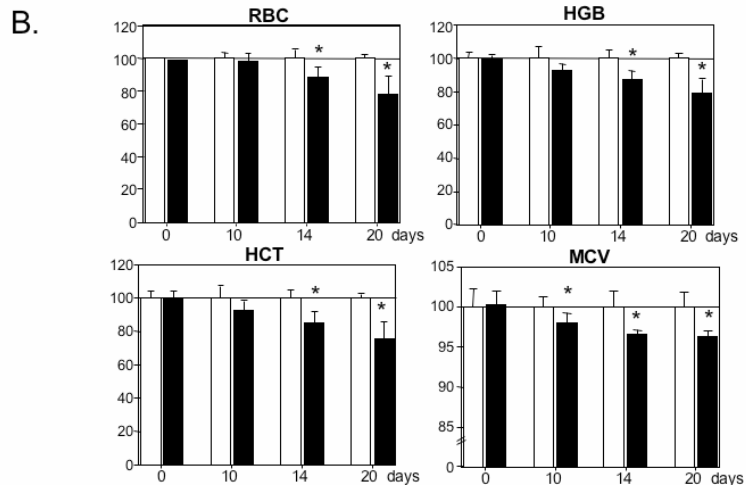
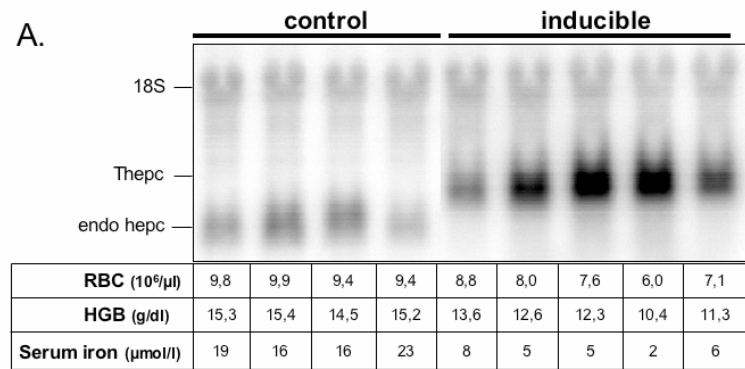


Figure 3

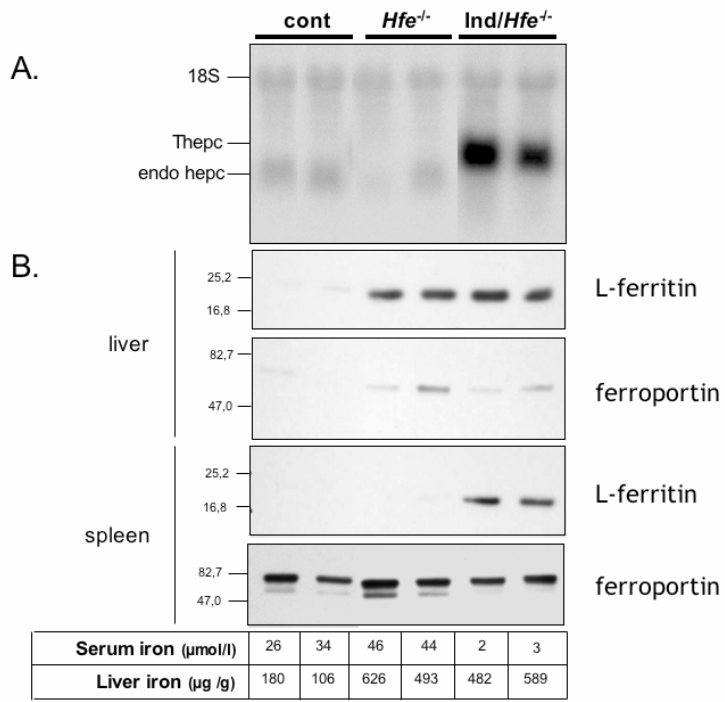


Figure 4 A.

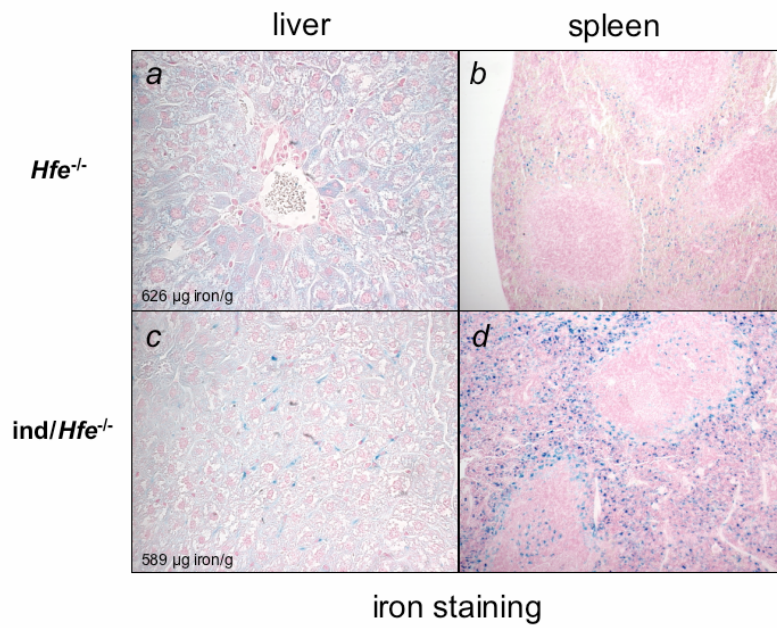




Figure 4 B.

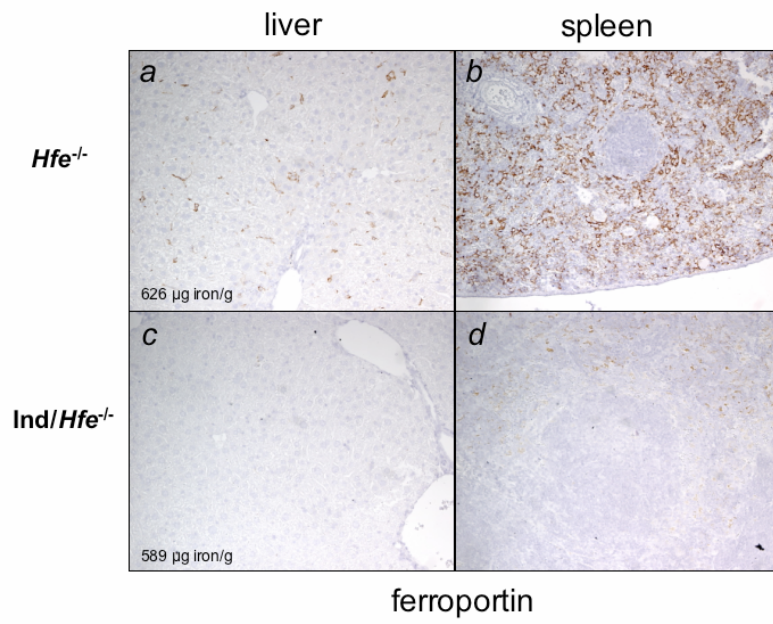
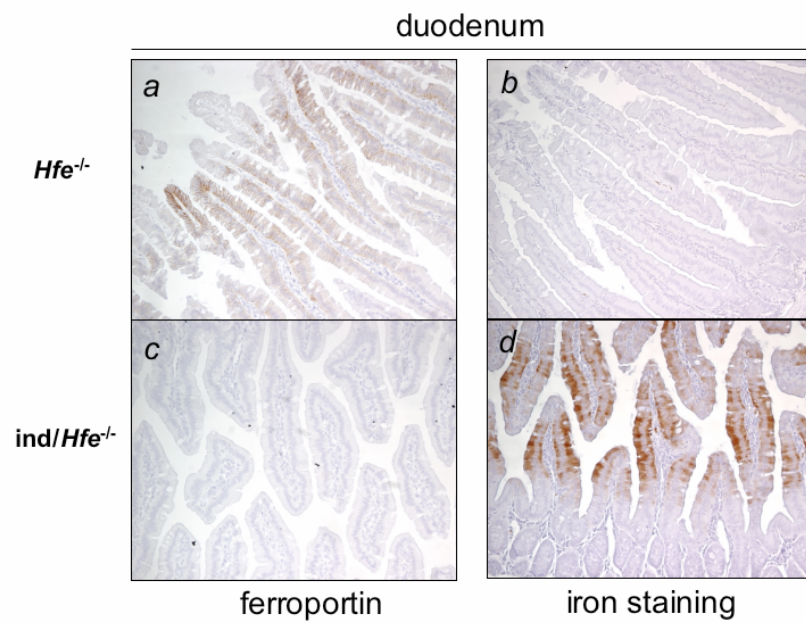


Figure 4 C.



## **Résultats complémentaires: Caractérisation d'un modèle de souris invalidées pour le gène *Hepc1***

Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Houbbron C, Hamard G, Kahn A and Vaulont S. **Targeted disruption of hepcidin1 gene results in severe hemochromatosis**,  
*manuscrit en préparation*

### **Introduction**

Comme nous l'avons vu précédemment, nous disposions au laboratoire du modèle KO *Usf2* ayant un déficit fonctionnel en *Hepc1* et *Hepc2*[280]. Ces souris ont une surcharge martiale multiviscérale et une déficience en fer des macrophages. Le déficit en *Usf2* dans ces souris entraîne également une forte létalité périnatale limitant les analyses.

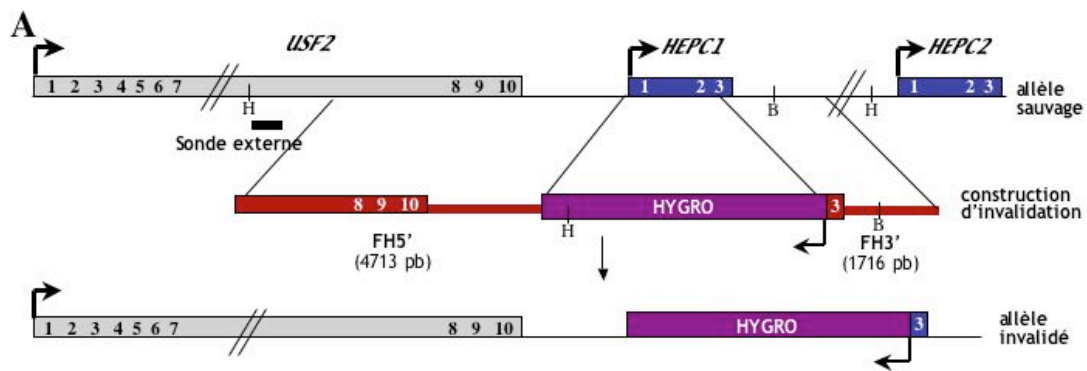
Nous avons entrepris au laboratoire de générer des souris KO *Hepc1* et KO *Hepc2* afin de déterminer les rôles respectifs de ces deux gènes hepcidine chez la souris, de disposer d'un modèle d'étude de l'hémochromatose liée à un défaut d'hepcidine et plus généralement pour étudier les mécanismes d'action de l'hepcidine.

Des deux gènes *Hepc1* et *Hepc2*, c'est le gène *Hepc1* qui est le plus proche du gène *HAMP* humain. Nous avons vu que le gène *Hepc1* est capable, à lui seul, lorsqu'il est surexprimé, d'entraîner l'apparition d'une anémie[281, 370] (voir « Article 3 ») et de prévenir[284] (voir « Article 1 ») et peut-être guérir[370] (voir « Article 3 ») la surcharge en fer d'une hémochromatose HFE-dépendante. Pour ces raisons, nous avons généré dans un premier temps les souris KO *Hepc1*. Pour invalider le gène *Hepc1*, la stratégie utilisée a été de remplacer la plupart du gène *Hepc1* (les deux premiers exons et une partie de l'exon 3) par une cassette de sélection à l'hygromycine insérée dans le gène par recombinaison homologue dans des cellules ES 129 (Figure 44A). Les clones recombinés ont été identifiés par Southern blot et PCR. Les souris mâles chimères (issus du transfert de ces cellules ES modifiées dans le blastocyste de souris C57BL6) ont été croisés avec des souris femelles C57BL/6. La transmission de l'allèle recombiné a été vérifiée par analyse PCR et les souris *Hepc1*<sup>+/-</sup> ont été croisées entre elles pour obtenir des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup>. C'est la caractérisation de ces souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> que je vais vous présenter.

### **Résultats**

Les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> issues des croisements entre *Hepc1*<sup>+/-</sup> ont été sacrifiées à 2, 3, 4, 6 et 8 mois après pesée pour analyse des paramètres hématologiques, de divers dosages sériques, et contenu en fer des organes.

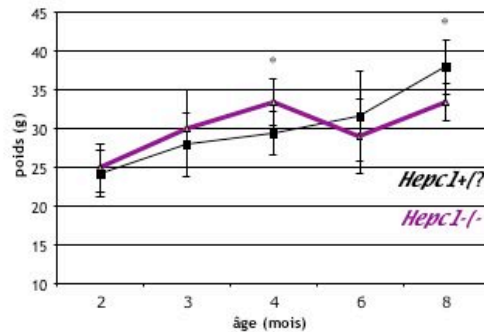
Nous avons vérifié dans un premier temps que l'insertion de la cassette a conduit à l'invalidation du seul gène *Hepc1* sans perturbation des gènes *Usf2* et *Hepc2* par RT-PCR sur les ARN de foie des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> (résultats non montrés). L'étude du nombre de souris âgées de 10 jours montre que, contrairement aux souris *Usf2*<sup>-/-</sup>, les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de létalité périnatale (Figure 44B). Les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> se développent normalement, sans perte de poids, excepté à l'âge de 8 mois (Figure 44C).



**B**

Génotype	<i>Hepc1</i> <sup>+/+</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>+/-</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>-/-</sup>	Total
Nombre d'animaux	43	81	47	171
Pourcentage	25%	47%	28%	100%

**C**



**Figure 44. Création de la souris knock-out *Hepc1* : survie et poids**

A. Schéma de la stratégie utilisée pour invalider le gène *Hepc1*. HYGRO : cassette de sélection hygromycine ; FH : fragment d'homologie. H : site de restriction *HindIII*. B : site de restriction *BamHI*

B. Nombre d'animaux de 10 jours issus du croisement entre souris *Hepc1*<sup>+/-</sup>.

C. Courbe de poids des souris KO *Hepc1*. \* :  $p < 0,05$  *Hepc1*<sup>-/-</sup> vs *Hepc1*<sup>+/?</sup> de même âge. n = au moins 6 animaux par âge et par génotype.

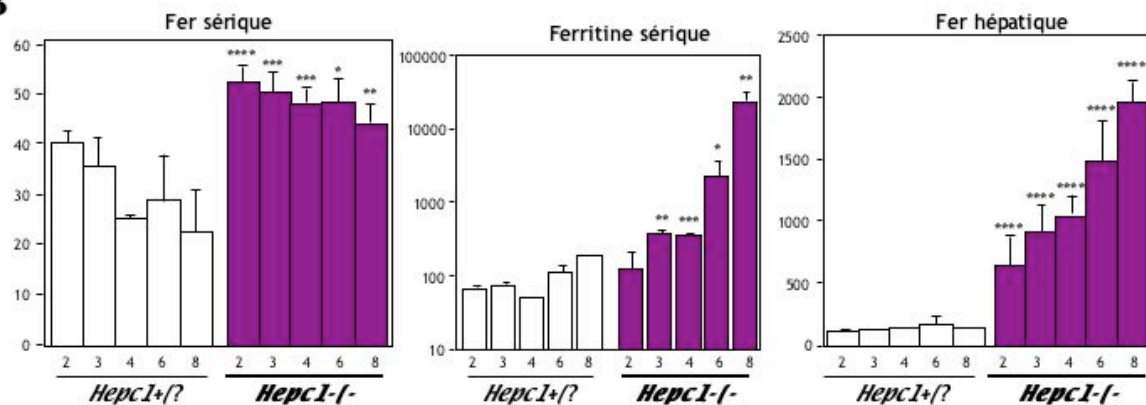
Les paramètres hématologiques des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> tendent à augmenter entre 2 et 4 mois de vie puis reviennent à la normale comparées aux souris contrôles (Figure 45A).

Les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> ont plus de fer sérique que les souris contrôles dès l'âge de 2 mois et le fer sérique reste élevé chez les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> plus âgées (Figure 45B). L'augmentation de la ferritine sérique est observée chez les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> de 3 mois et la ferritine sérique augmente fortement chez les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> avec l'âge (Figure 45B, échelle logarithmique). De même, le dosage du fer hépatique montre une accumulation rapide du fer dans le foie des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> dès l'âge de 2 mois (Figure 45B). Le fer hépatique des souris KO *Hepc1* continue d'augmenter avec l'âge et, à 8 mois, les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> ont presque 25 fois plus de fer que les souris contrôles (Figure 45B).

**A**

âge	RBC		HGB		HCT		MCV	
	<i>Hepc1</i> <sup>+/?</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>+/?</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>+/?</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>+/?</sup>	<i>Hepc1</i> <sup>-/-</sup>
2 mois	9,0 ± 0,4	9,1 ± 0,2	15,0 ± 0,7	15,9 ± 0,6 <sup>~</sup>	44,2 ± 3,7	49,1 ± 4,3 <sup>~</sup>	49,1 ± 3,4	54,0 ± 4,0 <sup>~</sup>
3 mois	9,1 ± 0,5	10,1 ± 0,4 <sup>~</sup>	14,9 ± 0,6	16,4 ± 0,7 <sup>~</sup>	43,2 ± 2,3	49,9 ± 3,5 <sup>~</sup>	47,3 ± 1,0	49,5 ± 3,2
4 mois	8,8 ± 0,1	9,2 ± 0,5	14,2 ± 0,5	15,8 ± 0,7 <sup>~</sup>	41,2 ± 1,6	48,4 ± 2,6 <sup>~</sup>	46,4 ± 1,5	52,8 ± 3,4 <sup>~</sup>
6 mois	8,8 ± 1,0	9,4 ± 0,4	14,1 ± 1,7	15,5 ± 0,9	41,8 ± 5,1	47,2 ± 3,6	47,3 ± 1,8	50,2 ± 2,2
8 mois	9,2 ± 0,5	9,5 ± 0,4	14,7 ± 0,4	15,4 ± 0,8	45,3 ± 1,8	48,4 ± 3,7	49,3 ± 4,0	50,8 ± 2,5

**B**



**Figure 45. Évolution du phénotype des souris KO *Hepc1* avec l'âge**

A. Numération des souris KO *Hepc1*. RBC : Red Blood Cell Count, nombre de globules rouges ( $10^6/\mu\text{l}$ ); HGB : taux d'hémoglobine (g/dl); HCT : hémocrite (%); MCV : Mean Cellular Volume, volume globulaire moyen (fl). n = au moins 4 animaux par âge et par génotype. \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ .

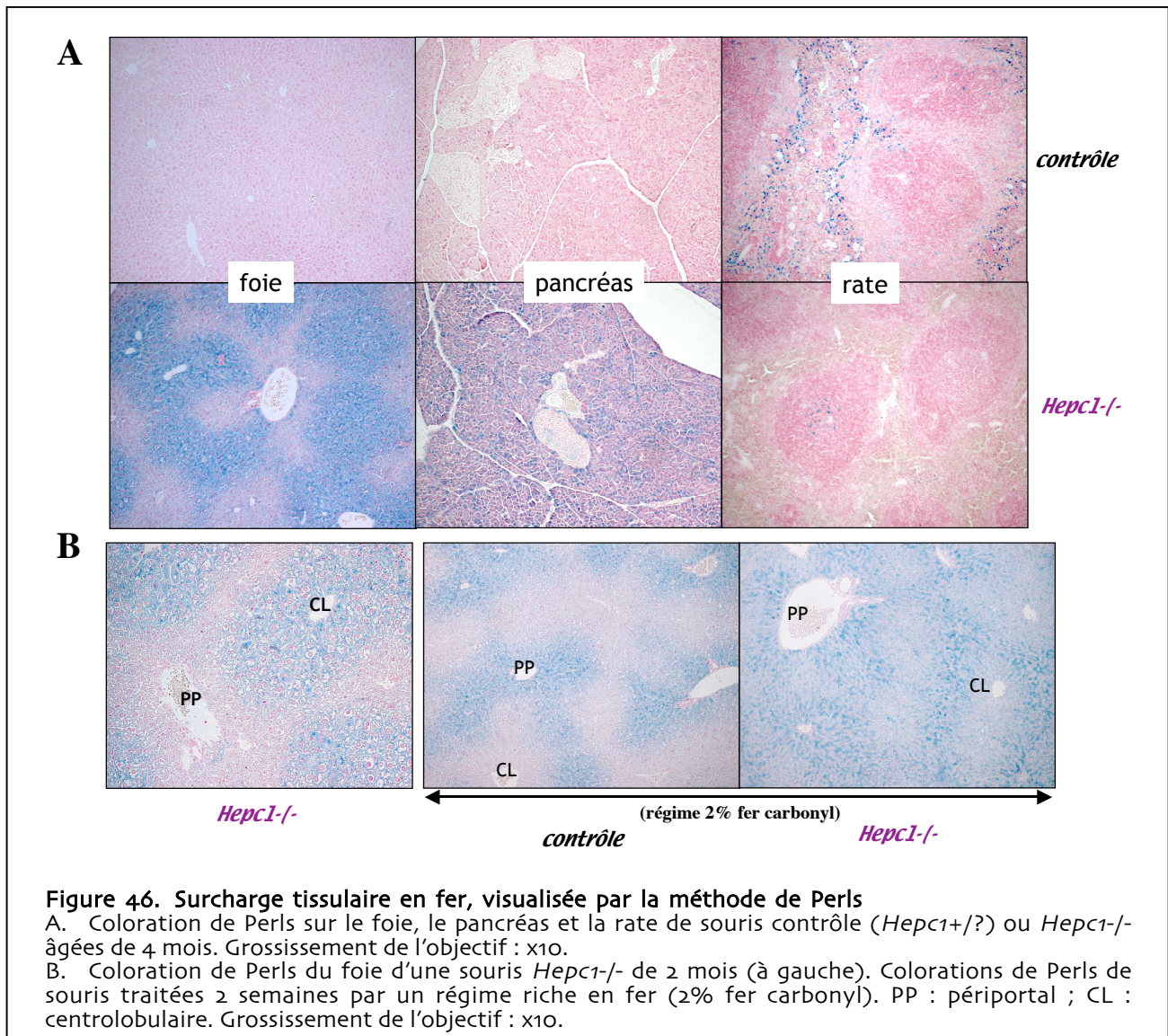
B. Fer sérique ( $\mu\text{mol/l}$ ), ferritine sérique (ng/ml), fer hépatique ( $\mu\text{g}$  de fer / g de tissu humide). En abscisses est figuré l'âge des souris en mois. n = au moins 4 animaux par âge et par génotype. \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

Afin de détecter la présence de fer dans le foie et les autres tissus des souris KO *Hepc1*, nous avons coloré au Perls des coupes de ces organes. Nous avons observé, comme dans les souris *Usp2*<sup>-/-</sup>, une accumulation massive de fer dans le foie et le pancréas des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> et une déficience en fer de la rate (Figure 46A). Dans le pancréas, le fer s'accumule préférentiellement dans le pancréas exocrine dès l'âge de 2 mois puis dans les îlots de Langerhans dans les souris de 4 mois (Figure 46A). Nous avons également détecté du fer dans le cœur, les poumons, le rein, le muscle squelettique et le cerveau (résultats non montrés).

De façon surprenante, alors que le fer des souris hémochromatosiques et des patients atteints d'HH s'accumule d'abord autour des espaces portes du foie, nous avons observé dans les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> une accumulation du fer préférentiellement autour de la veine centrolobulaire (Figure 46B). En effet, il est admis que la surcharge martiale de l'hémochromatose primaire est due à une hyperabsorption intestinale du fer. Or, le fer provenant de la digestion arrive au foie par la veine porte et se déverse par l'espace porte. Afin de tester la capacité des hépatocytes périportaux des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> à accumuler du fer venant de l'alimentation, nous avons traité des souris âgées de 2 mois pendant deux semaines par un régime riche en fer (2% de fer carbonyl). Comme attendu, les souris contrôles ayant reçu un régime riche en fer accumulent ce fer dans les hépatocytes périportaux (Figure 46B).



Dans le foie des souris *Hepc1*<sup>-/-</sup>, on retrouve du fer dans tout le foie, montrant ainsi que les hépatocytes périportaux ont été capables d'accumuler le fer du régime (Figure 46B).



## Discussion

L'ensemble de ces résultats montre que le modèle KO *Hepc1* reproduit les anomalies du fer retrouvées dans les souris KO *Usp2*, confirmant le rôle primordial de la déficience en hepcidine dans les souris KO *Usp2* pour les perturbations du métabolisme du fer. De plus, ce phénotype est observé dans les souris KO *Hepc1* alors qu'*Hepc2* est exprimé dans le foie ce qui montre qu'*Hepc2* n'est pas capable de compenser l'absence d'*Hepc1* pour la régulation du métabolisme du fer. En accord avec l'absence d'anomalies de répartition du fer observée dans les souris *TTR-Hepc2*[234], ces résultats suggèrent qu'*Hepc2* n'est pas essentiel à la régulation du métabolisme du fer. La démonstration directe de cette hypothèse viendra de l'étude des souris KO *Hepc2*, en cours de réalisation dans le laboratoire.

La surcharge massive du fer associée à la déficience en fer des macrophages dans les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> est similaire à celle observée dans les souris KO *Hjv* dont les niveaux d'hepcidine hépatiques sont très bas[158, 287]. Ces modèles murins d'inactivation de

l'hepcidine et de l'hémojuvéline reproduisent les anomalies du métabolisme du fer observées chez les patients avec une surcharge en fer massive et précoce. De façon intéressante, les souris *Hepc1*<sup>-/-</sup> ont une accumulation du fer préférentiellement autour des veines centrolobulaires. Cette accumulation de fer centrolobulaire est également retrouvée dans les souris KO *Usf2* jeunes, suggérant qu'elle est liée à l'absence d'hepcidine dans les souris (résultats non publiés). Il est difficile de déterminer si cette zonation de la surcharge martiale est retrouvée chez les patients porteurs de mutation du gène *HAMP* car, d'une part, ces patients sont rares, et, d'autre part, il faut pour cela faire une biopsie de foie du patient à un stade précoce de la maladie. Matthes *et al.* rapportent toutefois que la sœur de 24 ans d'un patient propositus qui possède comme lui l'allèle muté du gène *HAMP* (mutation dans la région 5'-UTR créant un nouveau site AUG de début de traduction) à l'état homozygote mais pas de signes cliniques évidents, a une surcharge en fer hépatique modérée prédominante en périportal[246]. Dans les souris KO *Hjv*[158] et les patients porteurs de mutations dans ce gène[171], la surcharge en fer semble périportale plutôt que centrolobulaire. On peut penser que cette différence entre les souris KO *Hepc1* et les situations où l'hémojuvéline n'est pas produite est due au fait que lorsque *HJV* est muté, l'expression du gène hepcidine est fortement réprimée, mais de l'hepcidine est quand même présente en faible quantité alors que dans nos souris, *Hepc1* est totalement absent. Ainsi l'hepcidine serait capable, même présente en faible quantité, d'influencer la répartition du fer de l'organisme.

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la zonation de la surcharge martiale nous envisageons d'étudier la localisation des protéines impliquées dans la régulation et le transport du fer des hépatocytes. Peu de données existent en effet sur une éventuelle zonation des protéines du métabolisme du fer. Niederkofler *et al.*[287] ont étudié l'expression de *Hjv* dans le foie en analysant l'expression du gène *LacZ* inséré par recombinaison homologue dans la séquence codante du gène *Hjv* et ont montré que ce gène est exprimé par les hépatocytes périportaux. Zhang *et al.*[407] ont également montré que le gène codant pour la ferroportine est exprimé préférentiellement par les hépatocytes périportaux. Nous avons étudié l'expression des gènes hepcidine par hybridation *in situ* et des premiers résultats montrent que ces gènes sont exprimés dans les hépatocytes situés dans des zones éloignées des vaisseaux (M. Bennoun et D.Q. Lou, résultats non publiés du laboratoire), en accord avec le signal hepcidine détecté par hybridation *in situ* dans les souris sauvages par Niederkofler *et al.*[287].

Enfin, l'accumulation graduelle massive du fer dans le foie des souris KO *Hepc1* entre 2 mois et 8 mois suggère que l'hepcidine est le régulateur-clé du métabolisme du fer et qu'en son absence, il ne semble pas y avoir de mécanisme capable de freiner la surcharge en fer. Ceci contraste avec ce qui est observé dans les souris KO *Hfe* qui voient leur fer hépatique atteindre un plateau avec l'âge lié à une perte de l'hyperabsorption intestinale du fer[5].

Le modèle KO *Hepc1* est un modèle viable d'étude de l'hepcidine qui nous permettra par la suite, par comparaison avec les souris inductibles *Hepc1*[370] (voir « Article 3 »), d'identifier les cibles de l'hepcidine. Ce modèle nous servira également à évaluer le rôle de l'hepcidine dans des situations subphysiologiques comme l'inflammation ou l'hypoxie.

## Discussion

### Régulation par le fer de l'hepcidine via HFE, RTf2 et HJV

#### ◆ Expression basale du(des) gène(s) hepcidine en absence de HFE, RTf2 et HJV

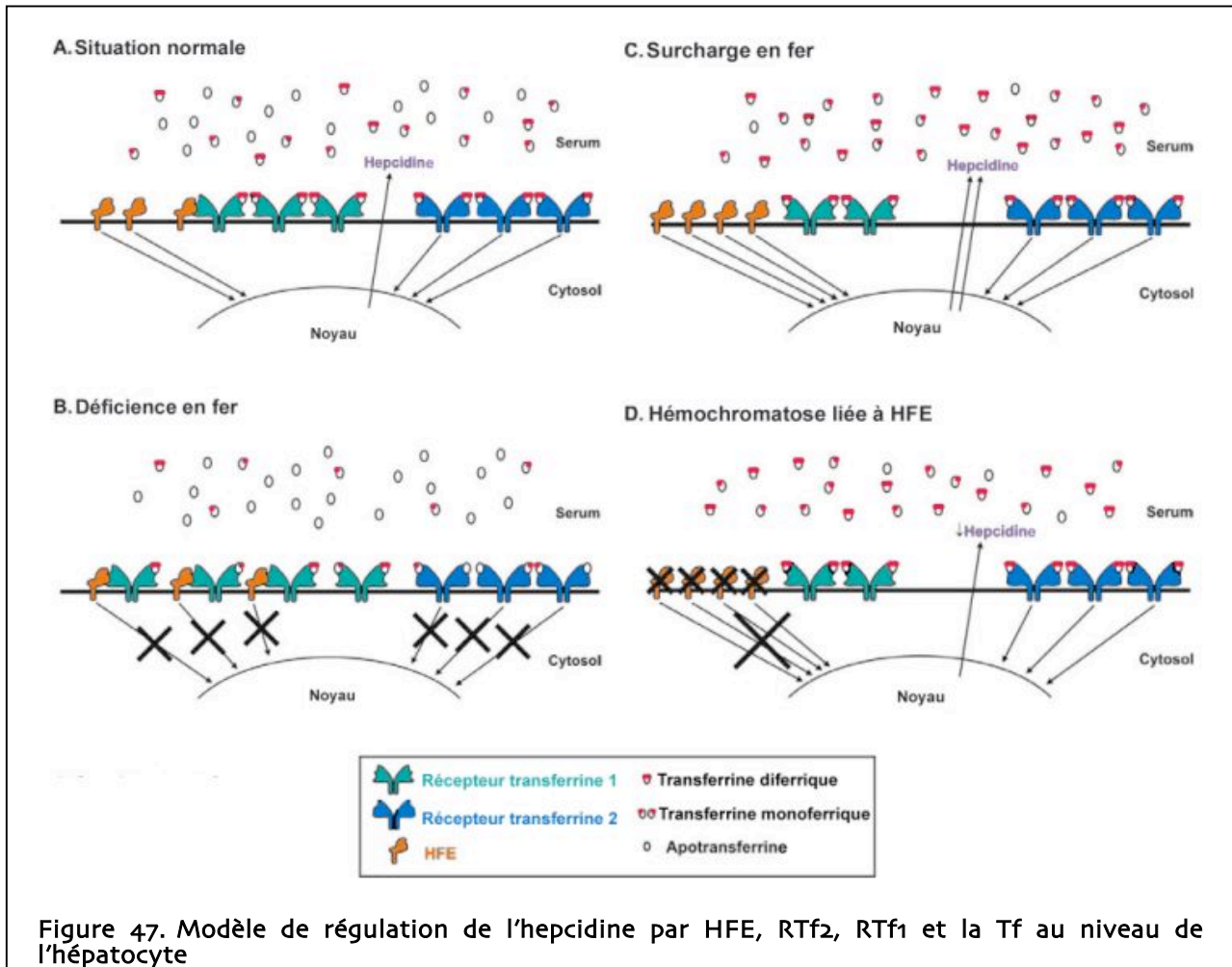
Nous avons montré que les gènes hepcidine sont exprimés de façon inappropriée au regard de la surcharge en fer dans les souris KO *Hfe*[284] (voir « Article 1 »). D'autres équipes ont décrit le même phénomène à la fois chez la souris KO *Hfe*[3, 30, 269] et chez les patients atteints d'hémochromatose HFE-dépendante[30, 116, 185, 275]. De même, dans les modèles d'hémochromatose liée à RTf2, les taux d'hepcidine sont diminués[180, 278] ou identiques[381] par rapport aux contrôles. Enfin, dans les hémochromatoses sévères liées à HJV, les taux d'hepcidine sont très faibles, voire indétectables[158, 287, 297]. Il semble donc que lorsque *HFE*, *TFR2* ou *HJV* est muté, la réponse de l'hepcidine au fer est altérée.

Ces résultats ont amené à reconsidérer le rôle de HFE dans le métabolisme du fer et à éclaircir le rôle de RTf2 en replaçant le centre de régulation du métabolisme du fer non pas au niveau de la crypte (voir « Modèle de la crypte ») mais au niveau du foie. Frazer *et al.* ont alors proposé un modèle d'action de HFE et RTf2 à la surface de l'hépatocyte pour la régulation de l'hepcidine (Figure 47)[106]. Ce modèle est basé :

- sur la capacité de HFE de se lier à RTf1 au site de liaison de la Tf ;
- sur l'induction du(des) gène(s) hepcidine lorsque HFE est libre à la surface de l'hépatocyte et sur le fait que RTf1 peut ainsi lier l'holoTf et l'internaliser par endocytose ;
- sur l'induction du(des) gène(s) hepcidine après interaction de RTf2 avec l'holoTf ;
- sur le fait que les besoins en fer de l'organisme sont reflétés par la saturation de la transferrine circulante.

Ainsi, selon ce modèle, lorsque la saturation de la transferrine en fer est élevée (Figure 47C), l'holoTf se fixe sur RTf1 et RTf2. HFE qui est libre à la surface de l'hépatocyte et RTf2-holoTf induiraient alors l'expression de l'hepcidine. À l'inverse, en cas de déficience en fer (Figure 47B), la saturation de la transferrine est basse, l'holoTf lie faiblement RTf1 qui interagit alors avec HFE, et peu d'holoTf se fixe sur RTf2. Les signaux inducteurs sont réprimés, peu d'hepcidine est produite. De fait quand *HFE* est muté mais que la quantité de RTf2 n'est pas affectée, de l'hepcidine est produite par l'hépatocyte. À l'inverse, lorsque des patients sont mutés pour le gène *TFR2* mais que *HFE* est intact, on détecte de l'hepcidine dans l'hépatocyte. En revanche, lorsque les deux gènes *TFR2* et *HFE* sont mutés chez des patients (mutation à l'état homozygote pour *TFR2* et mutation hétérozygote composite C282Y/H63D pour *HFE*), ceux-ci présentent alors une hémochromatose sévère probablement

associée à une diminution importante de l'expression du gène hepcidine<sup>24</sup>[309]. Cette hypothèse n'a pas encore été testée chez la souris, il serait en effet intéressant d'évaluer les niveaux d'hepcidine dans des souris contenant des quantités variables des protéines Hfe ou RTf2 (souris *Hfe*<sup>-/-</sup> *Tfr2*<sup>+/-</sup>, souris *Tfr2*<sup>-/-</sup> *Hfe*<sup>+/-</sup> et souris *Hfe*<sup>-/-</sup> *Tfr2*<sup>-/-</sup>) et de corrélérer la quantité d'hepcidine à la surcharge en fer des souris.



L'importance d'un autre signal que la saturation de la Tf reflétant les besoins en fer de l'organisme, le RTf1 soluble, a récemment été relevée par l'équipe de H. Fuchs[61]. Fuchs *et al.* ont montré que la quantité de RTfs ne dépendait pas uniquement de l'activité érythropoïétique[160] mais que l'holoTf était capable de diminuer de façon dose-dépendante la libération de RTfs[61]. Il a été montré par ailleurs que le RTfs peut se lier, comme RTf1, à HFE[213]. On peut alors émettre l'hypothèse suivante : lorsque l'organisme est en état de déficience en fer, plus de RTfs est libéré de la surface des cellules dans le sérum. Le RTfs se lie ensuite à HFE au niveau de l'hépatocyte, réprimant l'expression du(des) gène(s) hepcidine.

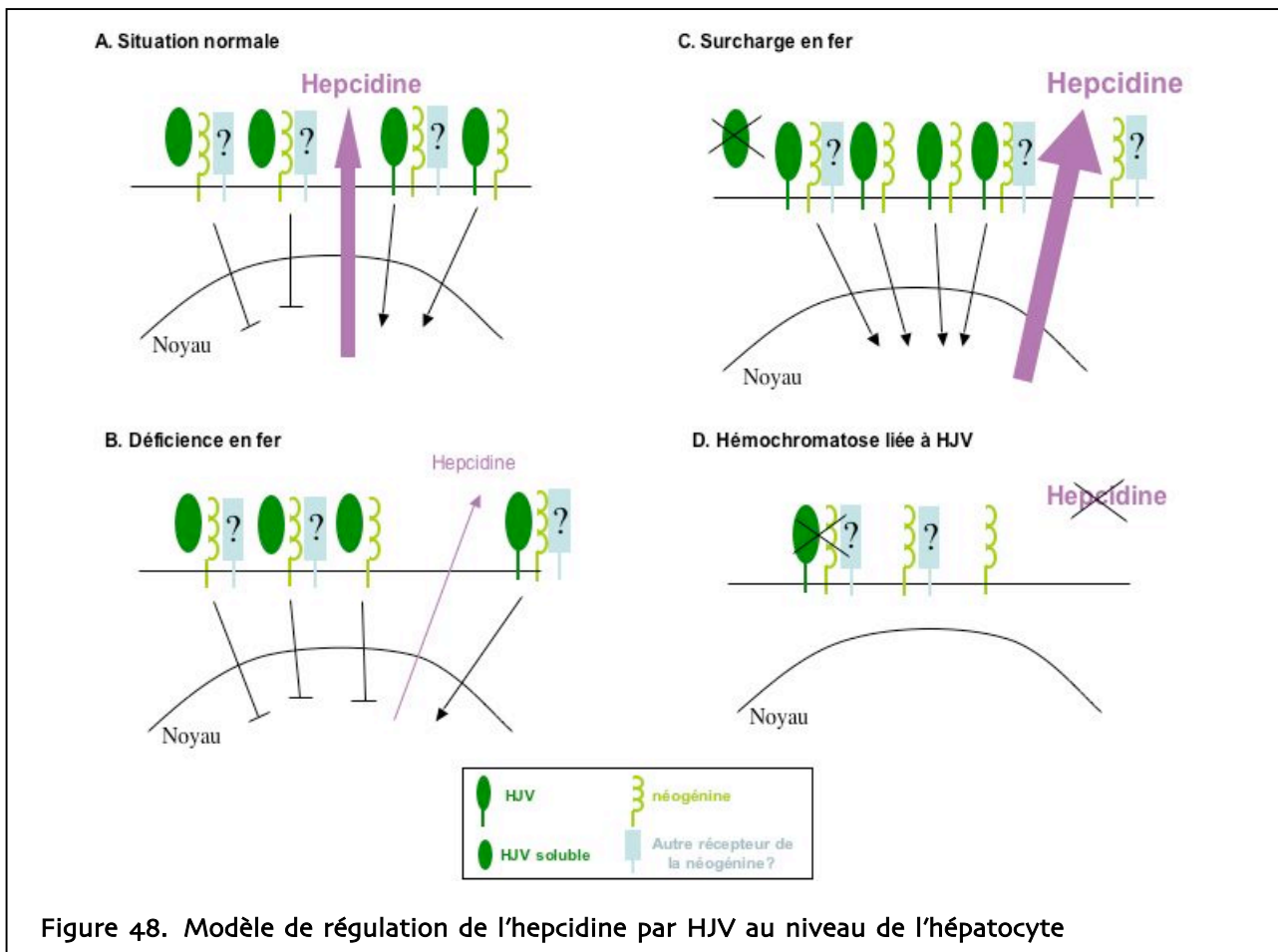
<sup>24</sup> Les auteurs de cet article ont dosé la pro-hepcidine sérique chez ces patients et n'ont pas trouvé de différences entre les patients présentant une hémochromatose sévère et les deux patients mutés à la fois pour les gènes *TFR2* et *HFE*. Toutefois, les auteurs restent prudents sur la validation de ce dosage de pro-hepcidine sérique et proposent que l'hepcidine mature est fortement diminuée chez ces patients.



Concernant la régulation de l'hepcidine par l'hémojuvéline, des travaux récents ont permis d'avancer des hypothèses. Comme les autres protéines de la famille RGM, l'hémojuvéline membranaire serait capable d'interagir avec la néogénine et cette interaction semble importante pour l'accumulation du fer liée à la présence d'hémojuvéline à la surface cellulaire[408]. De plus, la mutation la plus souvent retrouvée parmi les patients atteints d'hémochromatose juvénile, la mutation G320V, empêche l'interaction entre HJV et néogénine et l'accumulation du fer dans la cellule[408]. Toutefois, l'absence d'accumulation du fer observée observée par Zhang et al. lorsque *HJV(G320V)* est surexprimé dans des cellules est surprenante puisque l'on observe une surcharge en fer des hépatocytes chez les patients porteurs de la mutation. Le rôle de HJV dans le transport de fer reste donc à élucider. La néogénine est capable d'interagir avec une grande variété de ligands[245], on peut supposer alors que, dans le foie, de tels ligands puissent exister et éventuellement moduler l'interaction HJV-néogénine. Des travaux menés par l'équipe de T. Ganz en collaboration avec la société Xenon genetics ont par ailleurs mis en évidence un rôle majeur de la forme soluble d'HJV dans la régulation de l'hepcidine[230]. Ils ont observé la diminution de la quantité de formes solubles présentes dans le surnageant de culture de lignées hépatiques en présence de fer. De façon surprenante, alors que l'inactivation par siRNA de l'hémojuvéline entraîne une diminution des taux d'ARNm hepcidine, le traitement de ces cellules par la forme soluble d'HJV entraîne également la diminution des taux d'hepcidine. Les auteurs proposent un modèle d'action de l'hémojuvéline pour réguler le gène hepcidine faisant intervenir les deux formes d'HJV(Figure 48) basé sur les hypothèses suivantes :

- la forme membranaire entraîne l'induction de l'hepcidine ;
- la forme soluble réprime l'expression du(des) gène(s) hepcidine et sa quantité est diminuée en présence de fer.

Il semblerait qu'en situation de surcharge en fer (Figure 48C), la forme soluble est pas ou peu produite. Le signal inducteur provoqué par la présence d'HJV membranaire à la surface des hépatocytes entraînerait alors une production importante d'hepcidine. La société Xenon genetics qui a participé à l'étude sur la régulation de l'hepcidine par la forme soluble de l'hémojuvéline envisage d'utiliser celle-ci afin de diminuer les taux d'hepcidine souvent trop élevés chez les patients atteints d'anémie chronique inflammatoire.



Ces modèles de régulation de l'hepcidine par HFE/RTf2 et HJV semblent coexister dans l'organisme, il reste donc à déterminer s'il existe une interrelation entre les deux types de régulation : existe-t-il une interaction moléculaire entre HFE, RTf2 et HJV ou entre les éventuelles voies de signalisation intracellulaires médiées par ces protéines ? De plus, l'absence d'hémojuvéline entraîne une diminution drastique l'hepcidine, contrairement à ce que l'on observe en absence de HFE ou RTf2. Dans ce cas, à quoi est due la prédominance du signal médié par HJV par rapport à celui médié par HFE et RTf2 ?

◆ Quelle forme de fer et quel type cellulaire sont impliqués dans l'induction de l'hepcidine ?

Les modèles de régulation de l'hepcidine proposés ne font intervenir qu'un seul type cellulaire, l'hépatocyte. Or nous avons vu que les hépatocytes en culture ne sont pas capables de reproduire l'induction par le fer de l'hepcidine retrouvée in vivo. Des expériences utilisant diverses drogues pour dépléter des souris de leurs macrophages hépatiques ont montré que ceux-ci ne semblent pas avoir de rôle essentiel dans la régulation par le fer de l'hepcidine[235, 267, 353]. Néanmoins, Makui *et al.*[242] proposent un rôle de régulation de l'hepcidine par la protéine Hfe produite par des macrophages dérivés de moelle osseuse. En effet, lorsque ces auteurs font une transplantation de moelle osseuse de souris sauvage à des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> ayant subi une irradiation létale, la quantité d'hepcidine produite par le foie des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> est augmentée et les niveaux de fer hépatique sont diminués[242].

Il reste à déterminer si d'autres types cellulaires présents dans le foie, comme les cellules endothéliales, pourraient être impliquées dans cette régulation. Pour cela on pourrait co-cultiver des hépatocytes avec des cellules endothéliales afin de tester la capacité des hépatocytes, dans ces conditions, à augmenter leur quantité d'hepcidine après traitement à différentes formes de fer.

Se pose également la question de savoir quelle forme de fer est capable d'induire l'hepcidine *in vivo*. Deux formes de fer sont présentes dans le sérum, le fer lié à la Tf et le fer non lié à la Tf, NTBI. Ce dernier, en quantité physiologique faible, est difficile à doser. Le LPI est une composante du NTBI qui représente le fer réactif et chélatable et serait responsable des dysfonctions organiques observées lors des surcharges en fer. Il semble que la composante restante de NTBI est formée de fer ferreux complexé, par exemple, à de l'ascorbate ou des ions sulfates. L'équipe de Z. I. Cabantchik a récemment développé des sondes fluorescentes, afin d'évaluer les quantités de LPI (Labile Plasma Iron) présents dans le sérum[29] ou dans des cellules[126]. Cette équipe a pu déterminer que le LPI était présent dans le sérum de patients atteints d'hémochromatose avant que la saturation de la Tf n'atteigne 100%[212]. Le LPI pourrait rentrer librement dans la cellule et/ou par un transporteur membranaire tel que DMT1, contrairement à l'holoTf qui entre dans la cellule après endocytose du complexe Tf-RTf. On peut donc se demander si ces deux formes de fer agissent différemment sur l'expression du(des) gène(s) hepcidine. On ne sait pas non plus si l'induction par le fer de l'hepcidine passe par la diminution de l'activité des IRP de l'hépatocyte (et/ou des macrophages, voir plus haut).

◆ Induction par le fer de l'expression des gènes hepcidine en absence de Hfe, RTf2 ou Hjv

L'expression du(des) gènes(s) hepcidine semble altérée dans les modèles de déficience en HFE, RTf2 et HJV. Plusieurs équipes ont également voulu savoir si la quantité d'hepcidine, inappropriée dans ces modèles, pouvait tout de même augmenter après stimulation par différentes formes de fer. Deux équipes ont montré que des souris KO *Hfe* ayant reçu un régime riche en fer[3] ou une injection de fer dextran[269], ne voient pas leur quantité de transcrits hépatiques de l'hepcidine augmenter. Ces résultats contrastent avec de récentes études qui montrent que chez les patients atteints d'HH et dans le modèle *Hfe*<sup>-/-</sup>, l'hepcidine garde une certaine capacité de réponse au fer. Gehrke *et al.*[117], ont étudié cette question en séparant des patients hémochromatosiques selon leur surcharge hépatique en fer et ont pu montrer que plus les patients étaient surchargés, plus ils produisaient de l'hepcidine dans le foie. Ils ont retrouvé le même résultat dans le modèle murin *Hfe*<sup>-/-</sup>[117]. De même, Ludwiczek *et al.* observent que des souris *Hfe*<sup>-/-</sup> traitées par un régime riche ou un régime pauvre en fer voient leur taux de transcrits hépatiques hepcidine augmentés ou diminués respectivement[238]. Les divergences entre les observations faites par Ludwiczek *et al.*[238] et celles de Ahmad *et al.*[3] peuvent être liées au fond génétique des souris utilisées (C57/129 et AKR respectivement) ou à l'âge des souris. En effet, Ahmad *et al.* ont montré que dans un même modèle KO *Hfe*, les taux hépatiques d'ARNm hepcidine de souris KO *Hfe* de 4 semaines étaient diminués par rapport aux souris contrôles alors que, dans les souris de 8 semaines, les taux d'ARNm hepcidine hépatiques des souris KO *Hfe* étaient normalisés[3].

L'augmentation de l'hepcidine dans les souris KO *Hfe* et les patients atteints d'HH en fonction du fer suggère un rôle important d'HFE dans l'expression basale de l'hepcidine mais également, qu'en son absence, l'hepcidine est toujours capable d'être régulée par le fer. Cette régulation persistante de l'hepcidine chez les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> pourrait expliquer l'observation d'une correcte augmentation de l'absorption intestinale lors d'un régime pauvre en fer[5] ou en situation d'hypoxie[202] faite dans ce modèle par d'autres équipes.

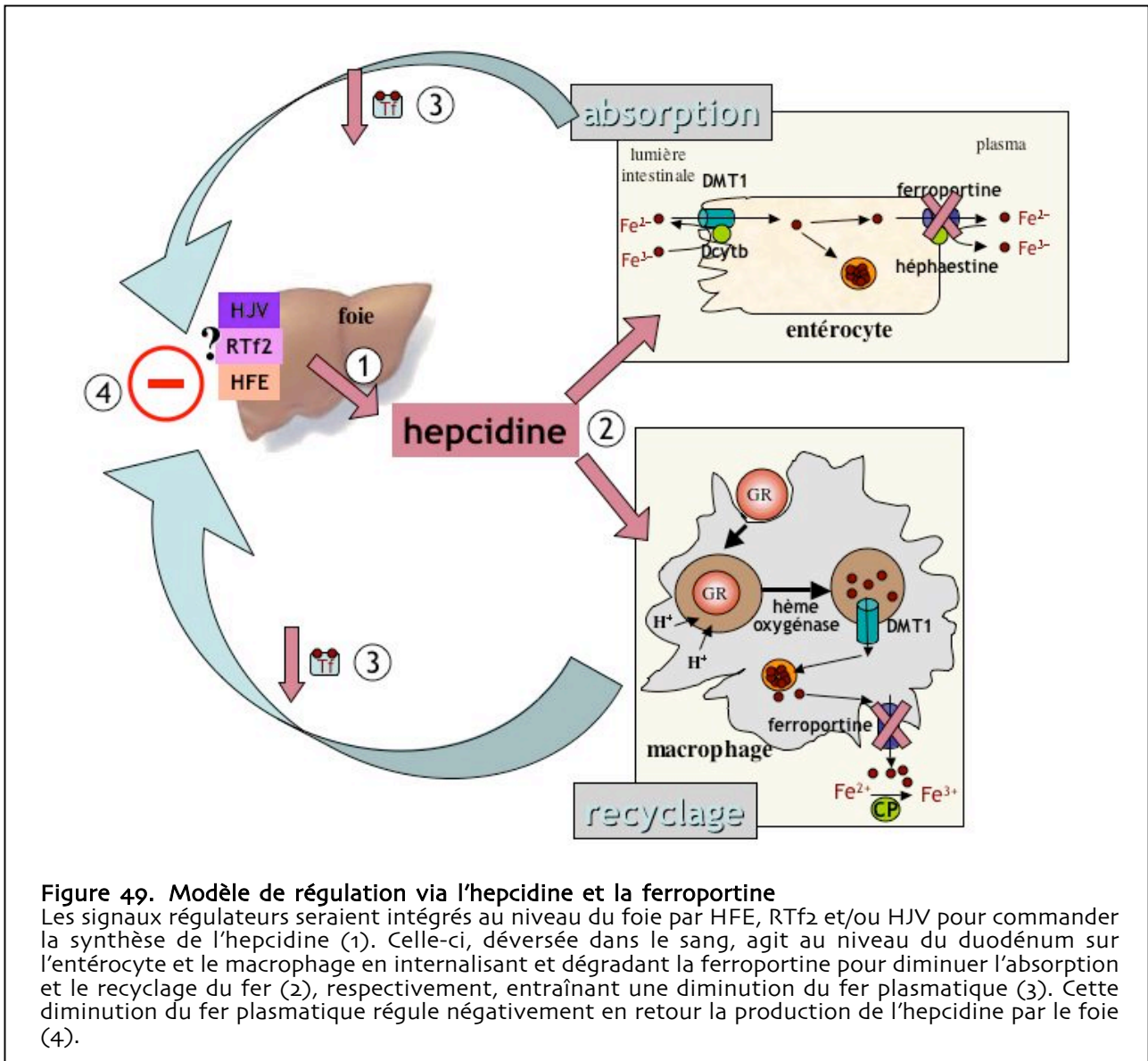
En revanche, dans les souris déficientes en RTf2 (KI *Tfr2* portant la mutation Y245X homologue de la mutation humaine Y250X)[180] et KO *Hju*[287], l'hepcidine ne répond plus à une augmentation du fer par injection de fer dextran. Il semble donc que RTf2 et HJV soient indispensables à la régulation du fer (en tout cas au fer délivré sous forme de fer dextran) de l'hepcidine chez la souris.

## Mode d'action de l'hepcidine

### ◆ Hepcidine et ferroportine

Dans un modèle *in vitro* exprimant un transgène codant pour la ferroportine, Nemeth *et al.* montrent une interaction directe de la ferroportine avec de l'hepcidine synthétique radiomarquée et démontrent que cette interaction induit l'internalisation de la ferroportine et sa dégradation dans le système lysosomal[277]. Ces résultats ont ensuite été confirmés dans d'autres conditions *in vitro*[77, 190] et notamment sur la ferroportine endogène de macrophages dérivés de moelle osseuse[66]. *In vivo*, nous avons trouvé qu'une absence d'hepcidine dans les souris KO *Usp2* entraînait une augmentation de la ferroportine dans le duodénum, le foie et la rate[369] (voir « Article 2 ») et, qu'à l'inverse, la surproduction d'hepcidine dans nos souris inductibles *Hfe*<sup>-/-</sup> était accompagnée d'une diminution de la ferroportine dans ces trois organes[370] (voir « Article 3 »). Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet-il de proposer une boucle de régulation assurant le contrôle de l'homéostasie du fer (Figure 49). L'excès de fer induit l'expression du gène hepcidine, hepcidine qui, sécrétée dans la circulation, va agir sur l'absorption intestinale et le relargage du fer en inhibant l'export de fer de l'entérocyte et du macrophage via la dégradation de la ferroportine dans ces cellules. L'érythropoïèse qui doit être maintenue pour produire suffisamment de globules rouges, pompe alors sur les réserves en fer ce qui conduit peu à peu à dépléter celles-ci et à rétablir un état d'équilibre. Il reste à déterminer le devenir de l'hepcidine après liaison de celle-ci à la ferroportine. On peut se demander en effet, si l'hepcidine est dégradée avec la ferroportine dans le lysosome, si elle interagit avec d'autres molécules à l'intérieur de la cellule ou si elle est recyclée vers la circulation.

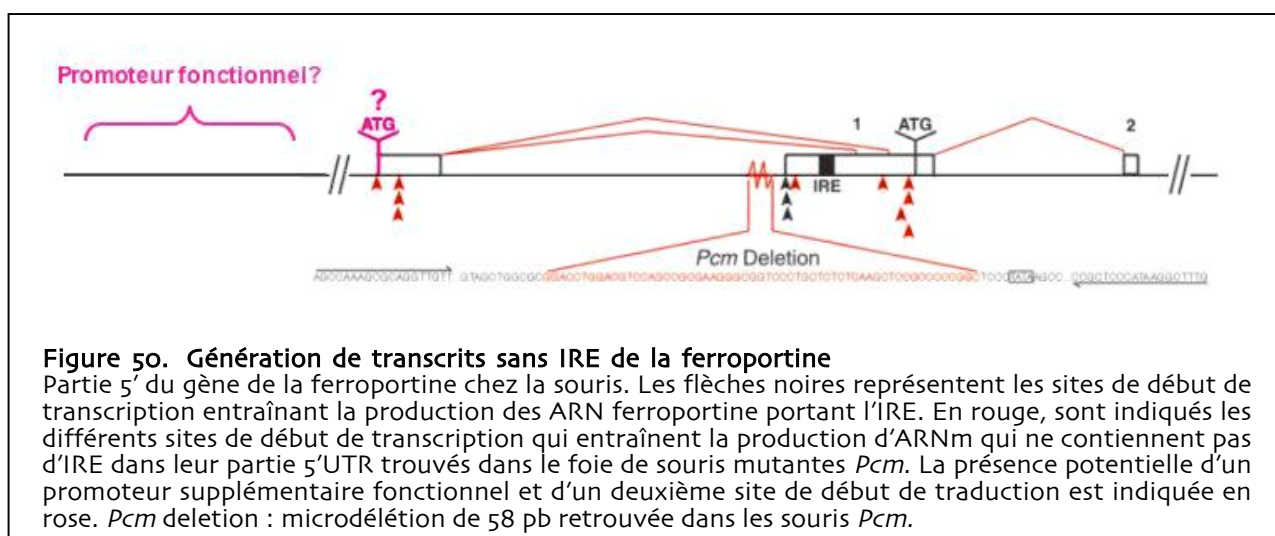
Le mécanisme décrit par Nemeth *et al.* ne met en jeu qu'une régulation post-traductionnelle sur la stabilité et la localisation de la ferroportine. Or, il a été montré, notamment par l'équipe de Greg Anderson, qu'une augmentation et une diminution de l'hepcidine s'accompagnent d'une diminution[8] et d'une augmentation[105, 108] respectives des quantités d'ARNm de la ferroportine dans le duodénum. Ainsi, on peut se demander si l'hepcidine ne pourrait pas également contrôler la ferroportine en agissant sur la transcription du gène ou la stabilité de l'ARNm de la ferroportine.



◆ Rôle de l'IRE de l'ARNm ferroportine

On pourrait également envisager un rôle traductionnel de l'hepcidine sur le 5'-IRE de l'ARNm de la ferroportine. Dans ce cas, la diminution de la ferroportine par l'hepcidine serait due à une augmentation de l'activité des IRP directement ou via une diminution du fer intracellulaire (voir « Système IRP/IRE »). Néanmoins, si l'IRE de la ferroportine semble fonctionnel *in vitro*[239], *in vivo*, les taux de ferroportine ne semblent pas être dépendants d'une régulation par le fer intracellulaire via les IRP. En effet, dans le duodénum des souris mutantes *sla*, dont les entérocytes sont surchargés en fer suite à une mutation du gène codant pour l'héphaestine, les quantités de ferroportine ne sont pas diminuées par l'accumulation du fer dans l'entérocyte mais augmentées[43]. De même, des souris ayant reçu un bolus de fer dans l'intestin entraînant l'accumulation de ferritine dans l'entérocyte, n'ont pas plus de ferroportine à la membrane basolatérale de leurs entérocytes que des souris contrôles[107]. Nous avons également montré que, dans le foie de souris traitées par un régime riche en fer, la protéine ferroportine n'est pas présente en plus grande quantité[369] (voir « Article 2 », Figure 39).

Il a été montré récemment que des transcrits ferroportine ne présentant pas d'IRE sont présents dans des précurseurs érythroïdes[50]. De tels transcrits ont également été trouvés dans le foie de souris *Pcm* (pour Polycythémique)[263]<sup>25</sup>. Enfin, des résultats préliminaires du laboratoire ont permis de mettre en évidence la présence de transcrits sans IRE de la ferroportine dans le foie et le duodénum de souris sauvages (G. Nicolas, communications personnelles non publiées). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir un autre site de début de transcription dans le promoteur de la ferroportine conduisant à la formation de ces transcrits sans IRE (Figure 50). La présence de transcrits ferroportine sans IRE et l'absence de régulation in vivo par les quantités de fer intracellulaire suggèrent que des modulations du système IRP/IRE n'auraient que peu d'influence sur les quantités de ferroportine dans le duodénum et le foie.



Dans les macrophages, il est difficile d'évaluer s'il existe une régulation des niveaux de ferroportine par l'IRE puisqu'on observe une augmentation à la fois de la quantité d'ARNm et de protéines ferroportine après traitement des macrophages par du fer[189, 401]. Des transcrits sans IRE de la ferroportine ont été détectés en très faible quantité dans ces cellules (C. Delaby et F. Canonne-Hergaux, communications personnelles non publiées).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que, suivant la quantité de transcrits ferroportine portant ou non l'IRE et suivant la force des signaux transcriptionnels, on peut concevoir des régulations très différentes d'un tissu à l'autre.

#### ◆ Rôle des modifications post-traductionnelles de la ferroportine

Enfin, nous avons observé, associé à la stabilisation de la protéine, une différence de poids moléculaire apparent entre la ferroportine présente dans la rate de souris contrôles et la ferroportine détectée dans la rate des souris KO *Usp2*[369] (voir « Article 2 »). Ces différences de poids moléculaires apparents pourraient refléter des modifications post-traductionnelles apparues en absence d'hepcidine dans les souris KO *Usp2*. D'autres équipes

<sup>25</sup> Ces souris *Pcm* ont été générées par irradiations et l'étude par clonage positionnel a révélé la présence d'une microdélétion de 58 pb dans le promoteur de la ferroportine.



ont montré que la ferroportine était glycosylée in vivo dans le foie, la rate et le duodénum[37, 311]. La ferroportine contient également plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Figure 40). Afin de déterminer si l'hepcidine est capable de modifier la glycosylation ou la phosphorylation de la ferroportine, on pourra par exemple traiter des extraits cellulaires de souris inductibles ou de souris KO *Hepc1* avec des endoglycosidases ou révéler la présence de sérine ou thréonine phosphorylées par western blot à partir de ces extraits cellulaires avec des anticorps spécifiques. Il est intéressant de noter que, dans notre étude des souris KO *Usp2*, seule la ferroportine de la rate semble avoir subi des modifications post-traductionnelles. On peut donc imaginer que la ferroportine n'est pas régulée de la même façon en fonction des tissus.

#### ◆ Autres cibles moléculaires de l'hepcidine

Dans nos souris KO *Usp2* nous avons vu que l'absence d'hepcidine était associée non seulement à une augmentation de la ferroportine dans le foie, le duodénum et la rate mais également que DMT1 et Dcytb dans le duodénum et la céruloplasmine dans le foie voyaient leur quantité modifiée dans ces souris[369] (voir « Article 2 »). Ces résultats suggèrent que l'hepcidine pourrait avoir d'autres cibles moléculaires que la ferroportine soit de façon directe, soit de façon indirecte suite à l'augmentation du fer intracellulaire provoquée par la dégradation de la ferroportine, soit, enfin, via une voie de transduction encore inconnue (existence d'un autre récepteur que la ferroportine ?). Pour tester ces différentes hypothèses, on pourrait étudier l'effet de l'hepcidine dans les souris délétées de façon tissu spécifique pour le gène ferroportine chez la souris. En effet, si l'apport d'hepcidine n'entraîne pas de modifications du métabolisme du fer de ces souris, on peut penser que l'hepcidine n'exerce pas d'action directe sur d'autres cibles moléculaires.

De plus, il reste à déterminer pour chaque molécule si la transcription, la stabilité des ARN, leur traductibilité, la stabilité des protéines sont modifiées. Il sera particulièrement intéressant d'étudier l'activité des IRP en présence ou en absence d'hepcidine. Ce système permet en effet de contrôler les quantités d'un grand nombre de molécules impliquées dans le métabolisme du fer. En particulier, l'augmentation de DMT1 dans le duodénum des souris KO *Usp2*[369] (voir « Article 2 ») pourrait se faire via une augmentation de l'activité des IRP. Afin de déterminer si la présence des IRP est impliquée dans l'action hyposidérémiant de l'hepcidine on pourra, par exemple, regarder si l'effet hyposidérémiant est retrouvé lorsqu'on apporte de l'hepcidine à des souris KO *Irp*. L'absence totale d'*Irp* étant embryonnaire létale, il faudrait pour cela utiliser les souris développées par l'équipe de M. W. Hentze qui permettent la délétion conditionnelle des gènes *Irp1* et *Irp2* dans des tissus spécifiques. Avec la possibilité maintenant d'avoir de l'hepcidine synthétique ou recombinante, on peut également tester sur des modèles cellulaires de types intestinale, hépatocytaire ou macrophagique, les effets de l'hepcidine sur les transports de fer ou l'expression des gènes après invalidation fonctionnelle par siRNA de molécules candidates (voir « Perspectives »).

Enfin, en plus d'une approche gène candidat, l'étude de l'expression différentielle de gènes par microarrays (Iron Chip développée par M. Muckenthaler ou puce Affimetrix) ainsi

que l'étude des protéomes sur les souris inductibles et les souris KO *Hepc1* permettra peut-être d'identifier de nouvelles cibles moléculaires de l'hepcidine.

La présence d'une zonation particulière de la surcharge en fer en absence d'hepcidine (voir « Résultats complémentaires ») suggèrent que, dans le foie, la zonation des molécules impliquées dans le métabolisme du fer pourrait jouer un rôle. Cette notion est nouvelle et mérite une étude approfondie par des méthodes classiques d'hybridation in situ et immunohistochimie sur des coupes de foie afin de déterminer la localisation de ces molécules. On pourra également mesurer les ARNm et protéines contenus dans des populations distinctes d'hépatocytes périportaux ou centrolobulaires séparées par perfusion séquentielle du foie ou microdissection laser. La zonation des molécules du métabolisme du fer dans le foie apporterait un niveau de régulation supplémentaire de l'homéostasie du fer.

#### ◆ Hepcidine thérapeutique, test de sa bioactivité

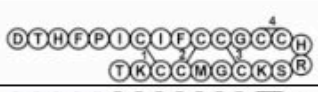




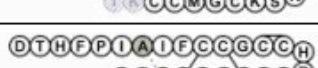


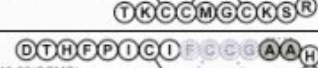

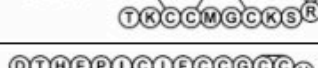

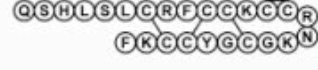
La difficulté pour étudier le mode d'action de l'hepcidine réside dans la difficulté de produire des anticorps dirigés contre ce peptide très conservé dans les espèces[186]. Chez la souris, les seuls anticorps disponibles ne reconnaissent que la pro-hepcidine[200, 382]. Chez l'homme, on ne dispose que d'anticorps détectant la forme urinaire du peptide mature ce qui limite leur utilisation pour étudier le mode d'action de l'hepcidine.

L'autre difficulté est de pouvoir produire de l'hepcidine dont l'activité est préservée. En effet, la formation des quatre ponts disulfure du peptide mature dont un impliquant deux cystéines adjacentes est difficile à obtenir par des méthodes classiques d'oxydation. C'est pourquoi nous avons créé un modèle de souris transgéniques inductibles hepcidine, modèle se rapprochant le plus de la synthèse endogène d'hepcidine. D'autres équipes ont entrepris de produire de l'hepcidine synthétique ou recombinante ou bien encore de produire des milieux conditionnés enrichis en hepcidine (par exemple, des milieux de culture provenant de clones stables surexprimant l'hepcidine). Une fois l'hepcidine produite, se pose alors la question de savoir si celle-ci est fonctionnelle.

Plusieurs tests de l'activité de l'hepcidine sont utilisés actuellement. Tout d'abord on peut tester l'hepcidine pour son activité antimicrobienne in vitro en étudiant la croissance de différents types de pathogènes en présence d'hepcidine[195, 299, 383, 409]. Mais si l'on s'intéresse au rôle de l'hepcidine dans le métabolisme du fer, ce test n'est pas adapté car, les deux activités, antimicrobiennes et régulation du métabolisme du fer, semblent dissociées. Ainsi, le peptide mature de 20 acides aminés qui a la même activité antimicrobienne que le peptide de 25 acides aminés[299] n'a pas, comme nous allons le voir, d'activité biologique liée au métabolisme du fer dans un système cellulaire et in vivo[279, 321] (Figure 51).

Deux tests qui tiennent compte du rôle de l'hepcidine comme régulateur du métabolisme du fer ont été mis au point in vitro et in vivo. In vitro, le test consiste à faire surexprimer de la ferroportine couplée à la GFP dans des cellules et d'observer après traitement à l'hepcidine si le signal GFP est diminué et si la ferritine est augmentée suite à la dégradation de la ferroportine par l'hepcidine[277]. Enfin, in vivo, on peut faire une injection intrapéritonéale d'hepcidine et tester si le fer sérique des souris injectées diminue au bout de

quelques heures[321]. Le choix du test utilisé pour vérifier la fonctionnalité de l'hepcidine est important, comme le montre une étude récente de Nemeth *et al.*[279]. Les auteurs de cet article ont synthétisé différentes formes d'hepcidine puis les ont testées in vitro et in vivo pour déterminer leur bioactivité (Figure 51). Ainsi, ils ont pu montrer que des peptides (dont le premier ou le troisième pont disulfure est modifié) qui diminuaient de façon significative le signal GFP porté par la ferroportine in vitro n'étaient pas capables, une fois injectés dans une souris, de diminuer significativement le fer sérique (Figure 51, peptides appelés C7A/C23A et C15A/C29A). Les auteurs pensent que l'absence d'un pont disulfure pourrait altérer la stabilité de la protéine in vivo. On peut également penser qu'il existe d'autres partenaires ou régulations dans l'organisme entier qui ne sont pas reproduits dans le test in vitro utilisé.

	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
 hep25	100%	100%
 del1-5(DTHFF) aka hep20	12%	20%
 hep3	0%	ND
 Hep6	0%	ND
 hep25(+A)	100%	ND
 del24-25(KT)	90%	72%
 C7A/C23A	85%	0%
 C11A/C19A	92%	0%
 C13A/C14A	100%	72%
 C13A/C14A, del9-12(FCCG), del19-22(CGMC) aka 1SS	54%	8%
 G71D	100%	100%
 K83R	100%	100%
 zebrafish	100%	ND

**Figure 51. Résumé des effets de mutations de l'hepcidine sur la fonction de l'hepcidine in vitro et in vivo**  
 À gauche sont représentées les hepcidines synthétisées et les modifications générées. À droite, sont indiquées le pourcentage d'activité de ces hepcidines in vitro et in vivo par rapport à l'activité du peptide mature de 25 acides aminés fixé à 100%. ND : non déterminé.

Parmi les hepcidines produites par les différents laboratoires ou commercialisées, seules les formes synthétisées par le laboratoire de T. Ganz[277] et l'hepcidine commercialisée par Peptide International[66, 77, 190] sont capables de dégrader in vitro la ferroportine. De plus, ces deux formes d'hepcidine sont capables d'avoir une action hyposidérémiant in vivo([321] et D.Q. Lou, résultats du laboratoire non publiés obtenus avec l'hepcidine commercialisée par Peptide international).

## ***Perspectives et Conclusion***

Si l'action physiologique de l'hepcidine est maintenant bien établie (inhibition des mouvements de fer à travers l'entérocyte, le macrophage et probablement le placenta) grâce à l'étude de modèles murins physiopathologiques, on connaît encore très peu de choses, mis à part l'élégante démonstration de la dégradation de la ferroportine, sur les mécanismes d'action de l'hepcidine au niveau moléculaire. De même, s'il paraît acquis que les protéines impliquées dans l'hémochromatose, HFE, RTf2 et HJV, jouent un rôle important dans la régulation de l'hepcidine, les mécanismes exacts d'induction/répression de la régulation du gène hepcidine, les mécanismes de production (clivage, sécrétion) de cette hormone découverte il y a cinq ans restent encore à définir.

Avec la possibilité maintenant d'avoir de l'hepcidine synthétique ou recombinante, on pourra tester sur des modèles cellulaires de types intestinale (CaCo2), hépatocytaire (hépatocytes primaires, lignées HepG2, Hep3B, Hepa 1-6...), macrophagique (macrophages différenciés à partir de moelle osseuse, de monocytes circulants, lignée RAW264.7, J774, THP-1...), les effets de l'hepcidine sur les transports de fer, l'expression des gènes. On peut également envisager de tester le rôle de molécules dans les effets de l'hepcidine en faisant une invalidation fonctionnelle par siRNA de ces molécules candidates.

In vivo, l'injection d'hepcidine radiomarquée a déjà permis d'obtenir des premiers résultats sur la clairance de l'hepcidine et sur les tissus cibles dans lesquels sont retrouvés le peptide radiomarqué (le foie, la rate et le duodénum). L'utilisation d'hepcidine radiomarquée pourrait également nous permettre d'identifier d'éventuels partenaires de l'hepcidine en effectuant un crible à partir de sérum ou de différents extraits cellulaires.

La production d'anticorps fiables reconnaissant chez la souris et chez l'homme la forme mature de l'hepcidine dans le sérum et le foie est absolument nécessaire afin de compléter nos connaissances sur le mode de clivage, sécrétion de l'hepcidine, sur l'identification des partenaires de l'hepcidine endogène.

Nous avons vu que l'hepcidine transgénique était capable de prévenir l'apparition d'une surcharge en fer et de redistribuer le fer dans une souris hémochromatosique KO *Hfe*. L'apport d'hepcidine dans les autres modèles d'hémochromatose héréditaires ou des modèles de surcharge en fer secondaires permettrait de confirmer l'hypothèse du rôle thérapeutique de l'hepcidine dans ces maladies. À l'inverse, si l'on arrive à produire des anticorps bloquant l'activité de l'hepcidine ou des agents permettant de réprimer son expression, il sera intéressant de les utiliser afin de confirmer le rôle de l'hepcidine dans l'installation des anémies chroniques inflammatoires suggéré par divers travaux de notre laboratoire[282] et d'autres laboratoires[388].

Dans l'attente du développement de ces outils d'étude de l'hepcidine, les modèles murins développés par le laboratoire permettront de répondre à beaucoup de questions concernant cette nouvelle hormone. Ils resteront également des modèles de choix pour valider les données obtenues in vitro ou tester in vivo l'efficacité de ces nouveaux outils.

## Conclusion

### Régulation du métabolisme du fer

Les connaissances sur le métabolisme du fer ont considérablement évolué au cours de ces dix dernières années. D'un modèle de régulation simple faisant intervenir la molécule HFE au niveau du duodénum dit le « Modèle de la crypte », nous sommes passés à un modèle complexe avec le foie en organe central de régulation et l'hepcidine comme hormone du métabolisme du fer. Dans ce modèle, le foie agit comme un senseur des besoins en fer via les protéines HFE, RTf2 et HJV, produisant de l'hepcidine, qui, déversée dans le sang, agit à distance sur l'entérocyte et le macrophage pour produire son effet hyposidérémiant par inhibition de la ferroportine (Figure 52). La découverte du réseau de protéines hémochromatosiques et de l'hepcidine apporte un éclairage nouveau sur la physiopathologie du métabolisme du fer et ouvre de nombreuses perspectives de diagnostique et thérapeutique.

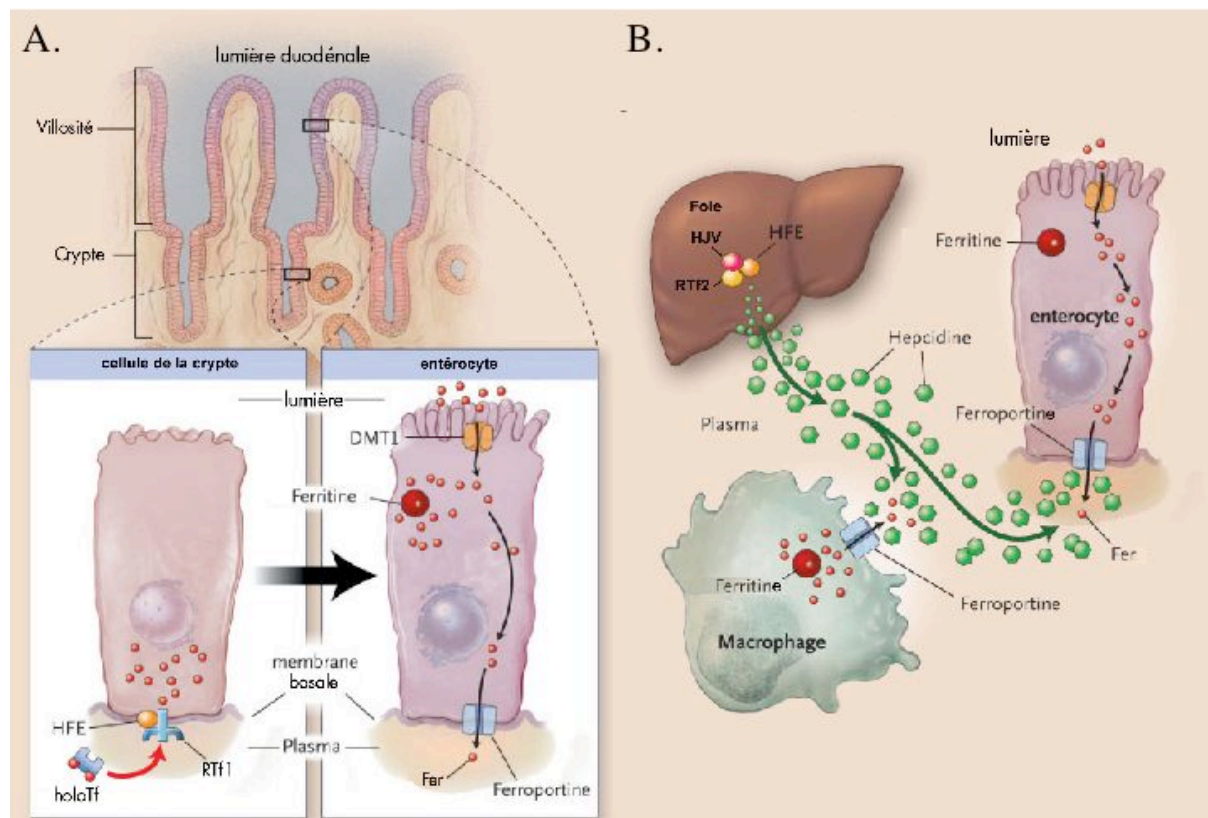


Figure 52. Régulation systémique du fer : modèle de la crypte et modèle de régulation par l'hepcidine  
A. modèle de la crypte. B. modèle de régulation par l'hepcidine.

## **Hepcidine et thérapeutique**

Les perspectives thérapeutiques ouvertes par l'étude des effets de l'hepcidine dans l'HH sont considérables et constituent une étape importante dans le domaine des maladies de l'homéostasie du fer (à la fois dans des situations d'insuffisance ou de surcharge) qui touchent des dizaines de millions de personnes dans le monde. L'utilisation de l'hepcidine, de ses agonistes ou de toute substance stimulant sa production devrait dans le futur pouvoir constituer un traitement logique des surcharges martiales primaires telles que les hémochromatoses. Ces molécules pourraient aussi être bénéfiques dans les surcharges secondaires comme les thalassémies ou les anémies réfractaires par insuffisance de production de globules rouges. Pouvoir disposer de molécules inhibitrices de l'absorption intestinale de fer pourrait ici constituer un traitement de choix puisque le seul traitement disponible face à une surcharge martiale trop importante, est l'administration de molécules chélatrices du fer par voie intraveineuse, qui est souvent très difficile à supporter pour le patient. De plus son efficacité est parfois limitée.

Les cancers, les maladies inflammatoires chroniques (connectivite, lupus, polyarthrite rhumatoïde, etc.), les infections chroniques sont le plus souvent associées à une forme d'anémie inflammatoire caractérisée par une séquestration du fer dans les macrophages, une diminution du fer sérique et de la transferrine circulante, et une diminution de l'absorption intestinale. Ces anémies aggravent considérablement l'état général des malades et, comme cela est bien démontré dans le cas des cancers, diminuent l'efficacité des traitements. L'hyper-expression du gène de l'hepcidine joue un rôle essentiel dans ce type d'anémies inflammatoires. Par conséquent, des antagonistes de l'hepcidine constitueraient le traitement, là encore logique, de ce type d'anémies inflammatoires

Une meilleure compréhension du mode d'action de l'hepcidine est une étape primordiale dans l'utilisation de l'hepcidine, d'agonistes ou d'antagonistes de l'hepcidine.

## Bibliographie

1. Abboud, S. and Haile, D.J., *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
2. Adamsky, K., Weizer, O., Amariglio, N., Breda, L., Harmelin, A., Rivella, S., Rachmilewitz, E., and Rechavi, G., *Decreased hepcidin mRNA expression in thalassemic mice*. Br J Haematol, 2004. **124**(1): p. 123-4.
3. Ahmad, K.A., Ahmann, J.R., Migas, M.C., Waheed, A., Britton, R.S., Bacon, B.R., Sly, W.S., and Fleming, R.E., *Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 361-6.
4. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
5. Ajioka, R.S., Levy, J.E., Andrews, N.C., and Kushner, J.P., *Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1465-9.
6. Ajioka, R.S. and Kushner, J.P., *Clinical consequences of iron overload in hemochromatosis homozygotes*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3351-3; discussion 3354-8.
7. Anderson, G.J., Frazer, D.M., McKie, A.T., and Vulpe, C.D., *The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 367-75.
8. Anderson, G.J., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Millard, K.N., Murphy, T.L., McKie, A.T., and Vulpe, C.D., *Relationship between intestinal iron-transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 724-6.
9. Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F., *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
10. Arden, K.E., Wallace, D.F., Dixon, J.L., Summerville, L., Searle, J.W., Anderson, G.J., Ramm, G.A., Powell, L.W., and Subramaniam, V.N., *A novel mutation in ferroportin1 is associated with haemochromatosis in a Solomon Islands patient*. Gut, 2003. **52**(8): p. 1215-7.
11. Arosio, P. and Levi, S., *Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(4): p. 457-63.
12. Arredondo, M., Munoz, P., Mura, C.V., and Nunez, M.T., *HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Faseb J, 2001. **15**(7): p. 1276-8.
13. Athens, J.W., *The reticuloendothelial (mononuclear phagocyte) system and the spleen*. Wintrobe's Clinical Hematology, ed. G.R. Lee, Ed. 1993, Philadelphia, PA: Lea & Febiger.
14. Bach, V., Remacha, A., Altes, A., Barcelo, M.J., Molina, M.A., and Baiget, M., *Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with two novel Ferroportin 1 mutations in Spain*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(1): p. 41-5.
15. Bach, V., Altés, A., Barcelo, M. J., Cortés, A., Sarda, P., Canals, C., Felez, J., Baiget, M., Remacha, A. *Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE genes in a spanish family with genetic hemochromatosis*. in *European Iron Club*. 2004. Rennes, France.
16. Bahram, S., Gilfillan, S., Kuhn, L.C., Moret, R., Schulze, J.B., Lebeau, A., and Schumann, K., *Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13312-7.
17. Baker, E., Baker, S.M., and Morgan, E.H., *Characterisation of non-transferrin-bound iron (ferric citrate) uptake by rat hepatocytes in culture*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1380**(1): p. 21-30.
18. Beaumont, C., Leneuve, P., Devaux, I., Scoazec, J.Y., Berthier, M., Loiseau, M.N., Grandchamp, B., and Bonneau, D., *Mutation in the iron responsive element of the L ferritin*



- mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract.* Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 444-6.
19. Beaumont, C. and Canonne-Hergaux, F., *[Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]*. Transfus Clin Biol, 2005. **12**(2): p. 123-30.
  20. Beguin, Y., *Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status.* Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 9-22.
  21. Bensaid, M., Fruchon, S., Mazeres, C., Bahram, S., Roth, M.P., and Coppin, H., *Multigenic control of hepatic iron loading in a murine model of hemochromatosis.* Gastroenterology, 2004. **126**(5): p. 1400-8.
  22. Bernstein, S.E., *Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder resembling human atransferrinemia.* J Lab Clin Med, 1987. **110**(6): p. 690-705.
  23. Beutler, E., Felitti, V.J., Koziol, J.A., Ho, N.J., and Gelbart, T., *Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA.* Lancet, 2002. **359**(9302): p. 211-8.
  24. Beutler, E., Barton, J.C., Felitti, V.J., Gelbart, T., West, C., Lee, P.L., Waalen, J., and Vulpe, C., *Ferroportin 1 (SCL40A1) variant associated with iron overload in African-Americans.* Blood Cells Mol Dis, 2003. **31**(3): p. 305-9.
  25. Bezançon, F., De Gennes, L., Delarue, J., and Oumensky, V., *Cirrhose pigmentaire avec infantilisme, insuffisance cardiaque et aplasies endocriniennes multiples.* Bulletins et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris, 1932. **48**: p. 967-974.
  26. Biasiotto, G., Belloli, S., Ruggeri, G., Zanella, I., Gerardi, G., Corrado, M., Gobbi, E., Albertini, A., and Arosio, P., *Identification of new mutations of the HFE, hepcidin, and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload.* Clin Chem, 2003. **49**(12): p. 1981-8.
  27. Biasiotto, G., Roetto, A., Daraio, F., Polotti, A., Gerardi, G.M., Girelli, D., Cremonesi, L., Arosio, P., and Camaschella, C., *Identification of new mutations of hepcidin and hemojuvelin in patients with HFE C282Y allele.* Blood Cells Mol Dis, 2004. **33**(3): p. 338-43.
  28. Biasiotto, G., Daraio, F., Cavallero, G., Polotti, A., Gerardi, G., Arosio, P., and Camaschella, C., *Homozygous or compound heterozygous R59G mutation of hepcidin gene in patients with adult-onset hemochromatosis.* in *BioIron*. 2005. Prague.
  29. Breuer, W. and Cabantchik, Z.I., *A fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron.* Anal Biochem, 2001. **299**(2): p. 194-202.
  30. Bridle, K.R., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Dixon, J.L., Purdie, D.M., Crawford, D.H., Subramaniam, V.N., Powell, L.W., Anderson, G.J., and Ramm, G.A., *Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis.* Lancet, 2003. **361**(9358): p. 669-73.
  31. Brookes, M.J., Sharma, N.K., Tselepis, C., and Iqbal, T.H., *Serum pro-hepcidin: measuring active hepcidin or a non-functional precursor?* Gut, 2005. **54**(1): p. 169-70.
  32. Burdo, J.R., Menzies, S.L., Simpson, I.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Dolan, K.G., Haile, D.J., Beard, J.L., and Connor, J.R., *Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat.* J Neurosci Res, 2001. **66**(6): p. 1198-207.
  33. Cairo, G., Conte, D., Bianchi, L., Fraquelli, M., and Recalcati, S., *Reduced serum ceruloplasmin levels in hereditary haemochromatosis.* Br J Haematol, 2001. **114**(1): p. 226-9.
  34. Cairo, G., Recalcati, S., Pietrangelo, A., and Minotti, G., *The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage.* Free Radic Biol Med, 2002. **32**(12): p. 1237-43.

35. Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., and Gasparini, P., *The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 14-5.
36. Canonne-Hergaux, F., Fleming, M.D., Levy, J.E., Gauthier, S., Ralph, T., Picard, V., Andrews, N.C., and Gros, P., *The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia mk mice but is not properly targeted to the intestinal brush border*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3964-70.
37. Canonne-Hergaux, F., Donovan, A., Delaby, C., Wang, H.J., and Gros, P., *Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(1): p. G156-63.
38. Carlson, H., Zhang, A.S., Fleming, W.H., and Enns, C.A., *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, lowers intracellular iron levels independently of transferrin receptor 1 in TRVb cells*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2564-70.
39. Cazzola, M., *Hereditary hyperferritinaemia/ cataract syndrome*. Best Pract Res Clin Haematol, 2002. **15**(2): p. 385-98.
40. Cazzola, M., Cremonesi, L., Papaioannou, M., Soriani, N., Kioumi, A., Charalambidou, A., Paroni, R., Romtsou, K., Levi, S., Ferrari, M., Arosio, P., and Christakis, J., *Genetic hyperferritinaemia and reticuloendothelial iron overload associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (SLC11A3)*. Br J Haematol, 2002. **119**(2): p. 539-46.
41. Cremonesi, L., Forni, G.L., Soriani, N., Lamagna, M., Fermo, I., Daraio, F., Galli, A., Pietra, D., Malcovati, L., Ferrari, M., Camaschella, C., and Cazzola, M., *Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease*. Br J Haematol, 2005. **131**(5): p. 663-70.
42. Chang-Yeh, A., Mold, D., Brilliant, M., and Huang, R., *The Mouse Intracisternal A Particle-Promoted Placental Gene Retrotransposition is Mouse-Strain-Specific*. PNAS, 1993. **90**(1): p. 292-296.
43. Chen, H., Su, T., Attieh, Z.K., Fox, T.C., McKie, A.T., Anderson, G.J., and Vulpe, C.D., *Systemic regulation of Hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1893-9.
44. Chen, H., Attieh, Z.K., Su, T., Syed, B.A., Gao, H., Alaeddine, R.M., Fox, T.C., Usta, J., Naylor, C.E., Evans, R.W., McKie, A.T., Anderson, G.J., and Vulpe, C.D., *Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3933-9.
45. Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., and Walz, T., *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex*. Cell, 2004. **116**(4): p. 565-76.
46. Cherukuri, S., Potla, R., Sarkar, J., Nurko, S., Harris, Z.L., and Fox, P.L., *Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption*. Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 309-19.
47. Cheung, T.K., Fletcher, L., Bridle, K., Murphy, T., and Crawford, D., *1050 Hpcidin expression is down-regulated in alcohol-fed rats: a possible pathogenic factor in alcohol related hepatic siderosis*. Hepatology, 2003. **38**(Supplement 1): p. 661.
48. Choi, J.W. and Son, B.K., *Soluble transferrin receptor concentration is not superior to log ferritin for evaluating erythropoiesis in adolescents with iron deficiency anemia*. Clin Chim Acta, 2005. **355**(1-2): p. 83-9.
49. Chua, A.C., Olynyk, J.K., Leedman, P.J., and Trinder, D., *Nontransferrin-bound iron uptake by hepatocytes is increased in the Hfe knockout mouse model of hereditary hemochromatosis*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1519-25.
50. Cianetti, L., Segnalini, P., Calzolari, A., Morsilli, O., Felicetti, F., Ramoni, C., Gabbianelli, M., Testa, U., and Sposi, N.M., *Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation*. Haematologica, 2005. **90**(12): p. 1595-606.

51. Clothier, B., Robinson, S., Akhtar, R.A., Francis, J.E., Peters, T.J., Raja, K., and Smith, A.G., *Genetic variation of basal iron status, ferritin and iron regulatory protein in mice: potential for modulation of oxidative stress*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **59**(2): p. 115-22.
52. Cooperman, S.S., Meyron-Holtz, E.G., Olivierre-Wilson, H., Ghosh, M.C., McConnell, J.P., and Rouault, T.A., *Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2*. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 1084-91.
53. Corradini, E., Montosi, G., Ferrara, F., Caleffi, A., Pignatti, E., Barelli, S., Garuti, C., and Pietrangelo, A., *Lack of enterocyte iron accumulation in the ferroportin disease*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(3): p. 315-8.
54. Courselaud, B., Pigeon, C., Inoue, Y., Inoue, J., Gonzalez, F.J., Leroyer, P., Gilot, D., Boudjema, K., Guguen-Guillouzo, C., Brissot, P., Loreal, O., and Ilyin, G., *C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 41163-70.
55. Courselaud, B., Troadec, M.B., Fruchon, S., Ilyin, G., Borot, N., Leroyer, P., Coppin, H., Brissot, P., Roth, M.P., and Loreal, O., *Strain and gender modulate hepatic hepcidin 1 and 2 mRNA expression in mice*. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. **32**(2): p. 283-9.
56. Craven, C.M., Alexander, J., Eldridge, M., Kushner, J.P., Bernstein, S., and Kaplan, J., *Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(10): p. 3457-61.
57. Curtis, A.R., Fey, C., Morris, C.M., Bindoff, L.A., Ince, P.G., Chinnery, P.F., Coulthard, A., Jackson, M.J., Jackson, A.P., McHale, D.P., Hay, D., Barker, W.A., Markham, A.F., Bates, D., Curtis, A., and Burn, J., *Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease*. *Nat Genet*, 2001. **28**(4): p. 350-4.
58. Curzon, G., *The effects of some ions and chelating agents on the oxidase activity of caeruloplasmin*. *Biochem J*, 1960. **77**: p. 66-73.
59. Daraio, F., Ryan, E., Gleeson, F., Roetto, A., Crowe, J., and Camaschella, C., *Juvenile hemochromatosis due to G320V/Q116X compound heterozygosity of hemojuvelin in an Irish patient*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(2): p. 174-6.
60. Darshan, D., Richman, L., and Kühn, L.C. *Conditional ferritin H deletion induces hepcidin and coordinately represses iron transporters in duodenum*. in *BioIron*. 2005. Prague.
61. Dassler, K., Zydek, M., Wandzik, K., Kaup, M., and Fuchs, H., *Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferri-transferrin*. *J Biol Chem*, 2005.
62. Davies, P.S. and Enns, C.A., *Expression of the hereditary hemochromatosis protein HFE increases ferritin levels by inhibiting iron export in HT29 cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25085-92.
63. De Domenico, I., Ward, D.M., Nemeth, E., Vaughn, M.B., Musci, G., Ganz, T., and Kaplan, J., *The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(25): p. 8955-60.
64. de Sousa, M., Reimao, R., Lacerda, R., Hugo, P., Kaufmann, S.H., and Porto, G., *Iron overload in beta 2-microglobulin-deficient mice*. *Immunol Lett*, 1994. **39**(2): p. 105-11.
65. Deaglio, S., Capobianco, A., Cali, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, A., Camaschella, C., and Malavasi, F., *Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3782-9.

66. Delaby, C., Pilard, N., Goncalves, A.S., Beaumont, C., and Canonne-Hergaux, F., *Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3979-84.
67. Delaby, C., Pilard, N., Hetet, G., Driss, F., Grandchamp, B., Beaumont, C., and Canonne-Hergaux, F., *A physiological model to study iron recycling in macrophages*. Exp Cell Res, 2005. **310**(1): p. 43-53.
68. Delatycki, M.B., Allen, K.J., Gow, P., MacFarlane, J., Radomski, C., Thompson, J., Hayden, M.R., Goldberg, Y.P., and Samuels, M.E., *A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis*. Clin Genet, 2004. **65**(5): p. 378-83.
69. Detivaud, L., Nemeth, E., Boudjema, K., Turlin, B., Troadec, M.B., Leroyer, P., Ropert, M., Jacquelinet, S., Courselaud, B., Ganz, T., Brissot, P., and Loreal, O., *Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function*. Blood, 2005. **106**(2): p. 746-8.
70. Devalia, V., Carter, K., Walker, A.P., Perkins, S.J., Worwood, M., May, A., and Dooley, J.S., *Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3)*. Blood, 2002. **100**(2): p. 695-7.
71. Devireddy, L.R., Gazin, C., Zhu, X., and Green, M.R., *A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1293-305.
72. Dini, L., Carbonaro, M., Musci, G., and Calabrese, L., *The interaction of ceruloplasmin with Kupffer cells*. Eur J Cell Biol, 1990. **52**(2): p. 207-12.
73. Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C., and Zon, L.I., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
74. Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., and Andrews, N.C., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 191-200.
75. Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., and Andrews, N.C. *The iron exporter ferroportin (Slc40a1) is essential for iron homeostasis*. in *BioIron*. 2005. Prague.
76. Drakesmith, H., Sweetland, E., Schimanski, L., Edwards, J., Cowley, D., Ashraf, M., Bastin, J., and Townsend, A.R., *The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15602-7.
77. Drakesmith, H., Schimanski, L.M., Ormerod, E., Merryweather-Clarke, A.T., Viprakasit, V., Edwards, J.P., Sweetland, E., Bastin, J.M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K.J., and Townsend, A.R., *Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1092-7.
78. Drapier, J.C., *Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems*. Methods, 1997. **11**(3): p. 319-29.
79. Dupic, F., Fruchon, S., Bensaid, M., Borot, N., Radosavljevic, M., Loreal, O., Brissot, P., Gilfillan, S., Bahram, S., Coppin, H., and Roth, M.P., *Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains*. Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 745-51.
80. Dupic, F., Fruchon, S., Bensaid, M., Loreal, O., Brissot, P., Borot, N., Roth, M.P., and Coppin, H., *Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice*. Gut, 2002. **51**(5): p. 648-53.

81. Dzikaite, V., Holmstrom, P., Stal, P., Eckes, K., Hagen, K., Eggertsen, G., Gafvels, M., Melefors, O., and Hultcrantz, R., *Regulatory effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on HAMP expression in iron loaded rat hepatocytes*. J Hepatol, 2005.
82. Eisenstein, R.S., *Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 627-62.
83. Elbirt, K.K. and Bonkovsky, H.L., *Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 438-47.
84. Fagoonee, S., Gburek, J., Hirsch, E., Marro, S., Moestrup, S.K., Laurberg, J.M., Christensen, E.I., Silengo, L., Altruda, F., and Tolosano, E., *Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading*. Am J Pathol, 2005. **166**(4): p. 973-83.
85. Farnaud, S. and Evans, R.W., *Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties*. Mol Immunol, 2003. **40**(7): p. 395-405.
86. Farnaud, S., Patel, A., Hobby, P., and Evans, R.W. *Is hepcidin an IRP? Modelling of a metal containing hepcidin*. in *BioIron*. 2005. Prague.
87. Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M.C., Fullan, A., Hinton, L.M., Jones, N.L., Kimmel, B.E., Kronmal, G.S., Lauer, P., Lee, V.K., Loeb, D.B., Mapa, F.A., McClelland, E., Meyer, N.C., Mintier, G.A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Wolff, R.K., and et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.
88. Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V.K., Mapa, F.A., Morikang, E., Prass, C.E., Starnes, S.M., Wolff, R.K., Parkkila, S., Sly, W.S., and Schatzman, R.C., *The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 14025-8.
89. Feeney, G.P. and Worwood, M., *The effects of wild-type and mutant HFE expression upon cellular iron uptake in transfected human embryonic kidney cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1538**(2-3): p. 242-51.
90. Feo, F., De Miglio, M.R., Simile, M.M., Muroli, M.R., Calvisi, D.F., Frau, M., and Pascale, R.M., *Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition*. Biochim Biophys Acta, 2005.
91. Ferreira, C., Bucchini, D., Martin, M.E., Levi, S., Arosio, P., Grandchamp, B., and Beaumont, C., *Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3021-4.
92. Ferreira, C., Santambrogio, P., Martin, M.E., Andrieu, V., Feldmann, G., Henin, D., and Beaumont, C., *H ferritin knockout mice: a model of hyperferritinemia in the absence of iron overload*. Blood, 2001. **98**(3): p. 525-32.
93. Filali, M., Le Jeune, C., Durand, E., Grinda, J.M., Roetto, A., Daraio, F., Bruneval, P., Jeunemaitre, X., and Gimenez-Roqueplo, A.P., *Juvenile hemochromatosis HJV-related revealed by cardiogenic shock*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **33**(2): p. 120-4.
94. Fillet, G., Beguin, Y., and Baldelli, L., *Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation*. Blood, 1989. **74**(2): p. 844-51.
95. Finch, C., *Regulators of iron balance in humans*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1697-702.
96. Fleming, M.D., Trenor, C.C., 3rd, Su, M.A., Foerzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., and Andrews, N.C., *Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 383-6.
97. Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., and Andrews, N.C., *Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1148-53.

98. Fleming, R.E., Holden, C.C., Tomatsu, S., Waheed, A., Brunt, E.M., Britton, R.S., Bacon, B.R., Roopenian, D.C., and Sly, W.S., *Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in Hfe knockout model of hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2707-11.
99. Fleming, R.E., Ahmann, J.R., Migas, M.C., Waheed, A., Koeffler, H.P., Kawabata, H., Britton, R.S., Bacon, B.R., and Sly, W.S., *Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10653-8.
100. Fletcher, L.M., Bridle, K.R., and Crawford, D.H., *Effect of alcohol on iron storage diseases of the liver*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(4): p. 663-77.
101. Fletcher, L.M., Bridle, K.R., Cheung, T.K., Murphy, T.L., Walters, M.M., Anderson, G.J., and Crawford, D.H. *Alcohol-induced liver injury involves hepcidin and C/EBPalpha down-regulation, lipid peroxidation and interleukin-6*. in *BioIron*. 2005. Prague.
102. Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 917-21.
103. Fortna, R.R., Watson, H.A., and Nyquist, S.E., *Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions*. Biol Reprod, 1999. **61**(4): p. 1042-9.
104. Frazer, D.M., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Wilkins, S.J., Trinder, D., Cleghorn, G.J., and Anderson, G.J., *Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron transport proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(4): p. G931-9.
105. Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Trinder, D., and Anderson, G.J., *Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 835-44.
106. Frazer, D.M. and Anderson, G.J., *The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?* Blood Cells Mol Dis, 2003. **30**(3): p. 288-97.
107. Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Murphy, T.L., Vulpe, C.D., McKie, A.T., and Anderson, G.J., *A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption*. Gut, 2003. **52**(3): p. 340-6.
108. Frazer, D.M., Inglis, H.R., Wilkins, S.J., Millard, K.N., Steele, T.M., McLaren, G.D., McKie, A.T., Vulpe, C.D., and Anderson, G.J., *Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis*. Gut, 2004. **53**(10): p. 1509-15.
109. Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Millard, K.N., McKie, A.T., Vulpe, C.D., and Anderson, G.J., *Increased hepcidin expression and hypoferraemia associated with an acute phase response are not affected by inactivation of HFE*. Br J Haematol, 2004. **126**(3): p. 434-6.
110. Galy, B., Ferring, D., Benesova, M., Benes, V., and Hentze, M.W., *Targeted mutagenesis of the murine IRP1 and IRP2 genes reveals context-dependent RNA processing differences in vivo*. Rna, 2004. **10**(7): p. 1019-25.
111. Galy, B., Ferring, D., and Hentze, M.W., *Generation of conditional alleles of the murine iron regulatory protein (IRP)-1 and -2 genes*. Genesis, 2005. **43**(4): p. 181-188.
112. Galy, B., Ferring, D., Minana, B., Bell, O., Janser, H.G., Muckenthaler, M., Schumann, K., and Hentze, M.W., *Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2)*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2580-9.
113. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
114. Ganz, T., *Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease*. Pediatr Blood Cancer, 2005.

115. Garrick, M., Scott, D., Walpole, S., Finkelstein, E., Whitbred, J., Chopra, S., Trivikram, L., Mayes, D., Rhodes, D., Cabbagestalk, K., Oklu, R., Sadiq, A., Mascia, B., Hoke, J., and Garrick, L., *Iron supplementation moderates but does not cure the Belgrade anemia*. *Biometals*, 1997. **10**(2): p. 65-76.
116. Gehrke, S.G., Kulaksiz, H., Herrmann, T., Riedel, H.D., Bents, K., Veltkamp, C., and Stremmel, W., *Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron*. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 371-6.
117. Gehrke, S.G., Herrmann, T., Kulaksiz, H., Merle, U., Bents, K., Kaiser, I., Riedel, H.D., and Stremmel, W., *Iron stores modulate hepatic hepcidin expression by an HFE-independent pathway*. *Digestion*, 2005. **72**(1): p. 25-32.
118. Gehrke, S.G., Pietrangelo, A., Kascak, M., Braner, A., Eisold, M., Kulaksiz, H., Herrmann, T., Hebling, U., Bents, K., Gugler, R., and Stremmel, W., *HJV gene mutations in European patients with juvenile hemochromatosis*. *Clin Genet*, 2005. **67**(5): p. 425-8.
119. Gelvan, D., Fibach, E., Meyron-Holtz, E.G., and Konijn, A.M., *Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway*. *Blood*, 1996. **88**(8): p. 3200-7.
120. Gerardi, G., Biasiotto, G., Santambrogio, P., Zanella, I., Ingrassia, R., Corrado, M., Cavadini, P., Derosas, M., Levi, S., and Arosio, P., *Recombinant human hepcidin expressed in Escherichia coli isolates as an iron containing protein*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(2): p. 177-81.
121. Ghosh, S., Hevi, S., and Chuck, S.L., *Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2369-76.
122. Giannetti, A.M., Snow, P.M., Zak, O., and Bjorkman, P.J., *Mechanism for multiple ligand recognition by the human transferrin receptor*. *PLoS Biol*, 2003. **1**(3): p. E51.
123. Girelli, D., Olivieri, O., De Franceschi, L., Corrocher, R., Bergamaschi, G., and Cazzola, M., *A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract*. *Br J Haematol*, 1995. **90**(4): p. 931-4.
124. Girelli, D., Bozzini, C., Roetto, A., Alberti, F., Daraio, F., Colombari, R., Olivieri, O., Corrocher, R., and Camaschella, C., *Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(5): p. 1295-302.
125. Gitlin, J.D., *Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(13): p. 6281-7.
126. Glickstein, H., El, R.B., Shvartsman, M., and Cabantchik, Z.I., *Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells*. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3242-50.
127. Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N., and Strong, R.K., *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition*. *Mol Cell*, 2002. **10**(5): p. 1033-43.
128. Goldberg, Y.P., Kamboj, R., Hayden, M.R., and Ganz, T., *Hemojuvelin deficiency blunts the normal hepcidin response to inflammation*. *J Clin Invest*, 2005.
129. Gomme, P.T., McCann, K.B., and Bertolini, J., *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(4): p. 267-73.
130. Gordeuk, V.R., Caleffi, A., Corradini, E., Ferrara, F., Jones, R.A., Castro, O., Onyekwere, O., Kittles, R., Pignatti, E., Montosi, G., Garuti, C., Gangaidzo, I.T., Gomo, Z.A., Moyo, V.M., Rouault, T.A., MacPhail, P., and Pietrangelo, A., *Iron overload in Africans and African-Americans and a common mutation in the SCL40A1 (ferroportin 1) gene*. *Blood Cells Mol Dis*, 2003. **31**(3): p. 299-304.



131. Gossen, M. and Bujard, H., *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
132. Graversen, J.H., Madsen, M., and Moestrup, S.K., *CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(4): p. 309-14.
133. Grenier, D., Huot, M.P., and Mayrand, D., *Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of Actinobacillus actinomycetemcomitans to these antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 763-6.
134. Griffiths, W.J., Kelly, A.L., Smith, S.J., and Cox, T.M., *Localization of iron transport and regulatory proteins in human cells*. Qjm, 2000. **93**(9): p. 575-87.
135. Griffiths, W.J. and Cox, T.M., *Co-localization of the mammalian hemochromatosis gene product (HFE) and a newly identified transferrin receptor (TfR2) in intestinal tissue and cells*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(5): p. 613-24.
136. Griffiths, W.J.H., MacFarlane, I., Halsall, D., and Cox, T.M. *Ferroportin-type haemochromatosis: novel mutations, clinical features and effect of treatment*. in *BioIron*. 2005. Prague.
137. Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S., and Gros, P., *Identification and characterization of a second mouse Nramp gene*. Genomics, 1995. **25**(2): p. 514-25.
138. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
139. Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A.O., Drenzo, C., Robine, S., and Andrews, N.C., *Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1258-66.
140. Gunshin, H., Starr, C.N., Drenzo, C., Fleming, M.D., Jin, J., Greer, E.L., Sellers, V.M., Galica, S.M., and Andrews, N.C., *Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2879-83.
141. Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B., Kennedy, M.C., Blondin, G.A., Beinert, H., and Klausner, R.D., *Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11735-9.
142. Hanson, E.S. and Leibold, E.A., *Regulation of iron regulatory protein 1 during hypoxia and hypoxia/reoxygenation*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7588-93.
143. Hanson, E.S., Foot, L.M., and Leibold, E.A., *Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5047-52.
144. Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K., and Gitlin, J.D., *Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10812-7.
145. Harrison, P.M. and Arosio, P., *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
146. Harrison-Findik, D., Schafer, D., Klein, E., and Gollan, J.L. *Hepatic hepcidin expression is regulated by ethanol and acetaldehyde: role of IL-6 and oxidative stress*. in *BioIron*. 2005. Prague.
147. Hashimoto, K., Hirai, M., and Kurosawa, Y., *Identification of a mouse homolog for the human hereditary haemochromatosis candidate gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(1): p. 35-9.

148. Hattori, A., Wakusawa, S., Hayashi, H., Harashima, A., Sanae, F., Kawanaka, M., Yamada, G., Yano, M., and Yoshioka, K., *AVAQ 594-597 deletion of the TfR2 gene in a Japanese family with hemochromatosis*. Hepatol Res, 2003. **26**(2): p. 154-156.
149. Heilmeyer, L., Keller, W., Vivell, O., Betke, K., Woehler, F., and Keiderling, W., [*Congenital atransferrinemia*]. Schweiz Med Wochenschr, 1961. **91**: p. 1203.
150. Hellman, N.E. and Gitlin, J.D., *Ceruloplasmin metabolism and function*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 439-58.
151. Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., and Andrews, N.C., *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**(3): p. 285-97.
152. Hentze, M.W. *Towards a systems biology of mammalian iron metabolism*. in *BioIron*. 2005. Prague.
153. Herrmann, T., Muckenthaler, M., van der Hoeven, F., Brennan, K., Gehrke, S.G., Hubert, N., Sergi, C., Grone, H.J., Kaiser, I., Gosch, I., Volkmann, M., Riedel, H.D., Hentze, M.W., Stewart, A.F., and Stremmel, W., *Iron overload in adult Hfe-deficient mice independent of changes in the steady-state expression of the duodenal iron transporters DMT1 and Ireg1/ferroportin*. J Mol Med, 2004. **82**(1): p. 39-48.
154. Hetet, G., Devaux, I., Soufir, N., Grandchamp, B., and Beaumont, C., *Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11a3) mutations*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1904-10.
155. Hirling, H., Henderson, B.R., and Kuhn, L.C., *Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase*. Embo J, 1994. **13**(2): p. 453-61.
156. Holmstrom, P., Dzikaite, V., Hultcrantz, R., Melefors, O., Eckes, K., Stal, P., Kinnman, N., Smedsrod, B., Gafvels, M., and Eggertsen, G., *Structure and liver cell expression pattern of the HFE gene in the rat*. J Hepatol, 2003. **39**(3): p. 308-14.
157. Huang, F.W., Rubio-Aliaga, I., Kushner, J.P., Andrews, N.C., and Fleming, M.D., *Identification of a novel mutation (C321X) in HJV*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2176-7.
158. Huang, F.W., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Fleming, M.D., and Andrews, N.C., *A mouse model of juvenile hemochromatosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2187-2191.
159. Hubert, N. and Hentze, M.W., *Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12345-50.
160. Huebers, H., Beguin, Y., Pootrakul, P., Einspahr, D., and Finch, C., *Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis*. Blood, 1990. **75**(1): p. 102-107.
161. Huggenvik, J.I., Craven, C.M., Idzerda, R.L., Bernstein, S., Kaplan, J., and McKnight, G.S., *A splicing defect in the mouse transferrin gene leads to congenital atransferrinemia*. Blood, 1989. **74**(1): p. 482-6.
162. Hunter, H.N., Fulton, D.B., Ganz, T., and Vogel, H.J., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37597-603.
163. Idzerda, R.L., Huebers, H., Finch, C.A., and McKnight, G.S., *Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3723-7.
164. Ilyin, G., Courselaud, B., Troadec, M.B., Pigeon, C., Alizadeh, M., Leroyer, P., Brissot, P., and Loreal, O., *Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload*. FEBS Lett, 2003. **542**(1-3): p. 22-6.

165. Inamura, J., Ikuta, K., Jimbo, J., Shindo, M., Sato, K., Torimoto, Y., and Kohgo, Y., *Upregulation of hepcidin by interleukin-1beta in human hepatoma cell lines*. *Hepatology*, 2005.
166. Inman, R.S. and Wessling-Resnick, M., *Characterization of transferrin-independent iron transport in K562 cells. Unique properties provide evidence for multiple pathways of iron uptake*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(12): p. 8521-8.
167. Iolascon, A., d'Apolito, M., Servedio, V., Cimmino, F., Piga, A., and Camaschella, C., *Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SCL11A2)*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 349-54.
168. Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L., and Rouault, T.A., *Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 4924-8.
169. Jacolot, S. Thèse. *Etude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du fer et leur implication dans l'hémochromatose héréditaire*. 2004. C. Ferec. Université de Bretagne Occidentale. Brest
170. Jacolot, S., Le Gac, G., Scotet, V., Quere, I., Mura, C., and Ferec, C., *HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2835-40.
171. Janosi, A., Andrikovics, H., Vas, K., Bors, A., Hubay, M., Sapi, Z., and Tordai, A., *Homozygosity for a novel nonsense mutation (G66X) of the HJV gene causes severe juvenile hemochromatosis with fatal cardiomyopathy*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 432.
172. Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 247-81.
173. Johnson, M.B. and Enns, C.A., *Diferrous transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability*. *Blood*, 2004. **104**(13): p. 4287-93.
174. Jouanolle, A.M., Douabin-Gicquel, V., Halimi, C., Loreal, O., Fergelot, P., Delacour, T., de Lajarte-Thirouard, A.S., Turlin, B., Le Gall, J.Y., Cadet, E., Rochette, J., David, V., and Brissot, P., *Novel mutation in ferroportin 1 gene is associated with autosomal dominant iron overload*. *J Hepatology*, 2003. **39**(2): p. 286-9.
175. Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R., *The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer*. *10.1124/pr.57.4.2. Pharmacol Rev*, 2005. **57**(4): p. 547-583.
176. Kato, J., Fujikawa, K., Kanda, M., Fukuda, N., Sasaki, K., Takayama, T., Kobune, M., Takada, K., Takimoto, R., Hamada, H., Ikeda, T., and Niitsu, Y., *A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload*. *Am J Hum Genet*, 2001. **69**(1): p. 191-7.
177. Kaup, M., Dassler, K., Weise, C., and Fuchs, H., *Shedding of the transferrin receptor is mediated constitutively by an integral membrane metalloprotease sensitive to tumor necrosis factor alpha protease inhibitor-2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38494-502.
178. Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F., and Koeffler, H.P., *Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(30): p. 20826-32.
179. Kawabata, H., Nakamaki, T., Ikonomi, P., Smith, R.D., Germain, R.S., and Koeffler, H.P., *Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2714-9.
180. Kawabata, H., Fleming, R.E., Gui, D., Moon, S.Y., Saitoh, T., O'Kelly, J., Umehara, Y., Wano, Y., Said, J.W., and Koeffler, H.P., *Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 376-81.

181. Keeling, S.L., Gad, J.M., and Cooper, H.M., *Mouse Neogenin, a DCC-like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis.* Oncogene, 1997. **15**(6): p. 691-700.
182. Kelleher, T., Ryan, E., Barrett, S., Sweeney, M., Byrnes, V., O'Keane, C., and Crowe, J., *Increased DMT1 but not IREG1 or HFE mRNA following iron depletion therapy in hereditary haemochromatosis.* Gut, 2004. **53**(8): p. 1174-9.
183. Kelley-Loughnane, N., Sabla, G.E., Ley-Ebert, C., Aronow, B.J., and Bezerra, J.A., *Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice.* Hepatology, 2002. **35**(3): p. 525-34.
184. Kemna, E., Pickkers, P., Nemeth, E., van der Hoeven, H., and Swinkels, D., *Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS.* Blood, 2005. **106**(5): p. 1864-6.
185. Kemna, E., Tjalsma, H., Laarakkers, C., Nemeth, E., Willems, H., and Swinkels, D., *Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry.* Blood, 2005. **106**(9): p. 3268-70.
186. Kemna, E.H., Tjalsma, H., Wetzels, J.F., and Swinkels, D.W., *Measuring serum hepcidin concentrations.* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(4): p. E1.
187. Kiss, J., Herrmann, T., Spasic Maja, V., Hess, R., Stremmel, W., Hentze, M.W., and Muckenthaler, M. *A conditional mouse model to study murine hemochromatosis.* in *BioIron*. 2005. Prague.
188. Knutson, M. and Wessling-Resnick, M., *Iron metabolism in the reticuloendothelial system.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2003. **38**(1): p. 61-88.
189. Knutson, M.D., Vafa, M.R., Haile, D.J., and Wessling-Resnick, M., *Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages.* Blood, 2003. **102**(12): p. 4191-7.
190. Knutson, M.D., Oukka, M., Koss, L.M., Aydemir, F., and Wessling-Resnick, M., *Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1324-8.
191. Koyama, C., Hayashi, H., Wakusawa, S., Ueno, T., Yano, M., Katano, Y., Goto, H., and Kidokoro, R., *Three patients with middle-age-onset hemochromatosis caused by novel mutations in the hemojuvelin gene.* J Hepatol, 2005. **43**(4): p. 740-2.
192. Koyama, C., Wakusawa, S., Hayashi, H., Suzuki, R., Yano, M., Yoshioka, K., Kozuru, M., Takayama, Y., Okada, T., and Mabuchi, H., *Two novel mutations, L490R and V561X, of the transferrin receptor 2 gene in Japanese patients with hemochromatosis.* Haematologica, 2005. **90**(3): p. 302-7.
193. Koyama, C., Wakusawa, S., Hayashi, H., Ueno, T., Suzuki, R., Yano, M., Saito, H., and Okazaki, T., *A Japanese family with ferroportin disease caused by a novel mutation of SLC40A1 gene: hyperferritinemia associated with a relatively low transferrin saturation of iron.* Intern Med, 2005. **44**(9): p. 990-3.
194. Kozyraki, R., *Cubilin, a multifunctional epithelial receptor: an overview.* J Mol Med, 2001. **79**(4): p. 161-7.
195. Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity.* FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
196. Krijt, J., Vokurka, M., Chang, K.T., and Necas, E., *Expression of Rgmc, the murine ortholog of hemojuvelin gene, is modulated by development and inflammation, but not by iron status or erythropoietin.* Blood, 2004. **104**(13): p. 4308-10.
197. Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor.* Nature, 2001. **409**(6817): p. 198-201.

198. Kuhn, D.E., Baker, B.D., Lafuse, W.P., and Zwilling, B.S., *Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 113-9.
199. Kulaksiz, H., Gehrke, S.G., Janetzko, A., Rost, D., Bruckner, T., Kallinowski, B., and Stremmel, W., *Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia*. Gut, 2004. **53**(5): p. 735-43.
200. Kulaksiz, H., Theilig, F., Bachmann, S., Gehrke, S.G., Rost, D., Janetzko, A., Cetin, Y., and Stremmel, W., *The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney*. J Endocrinol, 2005. **184**(2): p. 361-70.
201. Kuo, Y.M., Su, T., Chen, H., Attieh, Z., Syed, B.A., McKie, A.T., Anderson, G.J., Gitschier, J., and Vulpe, C.D., *Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse*. Gut, 2004. **53**(2): p. 201-6.
202. Laftah, A.H., Simpson, R.J., Beaumont, N., Bahram, S., Schumann, K., and Srail, S.K., *Hypoxic response of iron absorption is not affected by the Hfe gene knock-out in mice*. Br J Haematol, 2003. **123**(1): p. 170-2.
203. Laftah, A.H., Ramesh, B., Simpson, R.J., Solanky, N., Bahram, S., Schumann, K., Debnam, E.S., and Srail, S.K., *Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3940-4.
204. Laine, F., Ropert, M., Lan, C.L., Loreal, O., Bellissant, E., Jard, C., Pouchard, M., Le Treut, A., and Brissot, P., *Serum ceruloplasmin and ferroxidase activity are decreased in HFE C282Y homozygote male iron-overloaded patients*. J Hepatol, 2002. **36**(1): p. 60-5.
205. Lambert, L.A., Perri, H., and Meehan, T.J., *Evolution of duplications in the transferrin family of proteins*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2005. **140**(1): p. 11-25.
206. Lanzara, C., Roetto, A., Daraio, F., Rivard, S., Ficarella, R., Simard, H., Cox, T.M., Cazzola, M., Piperno, A., Gimenez-Roqueplo, A.P., Grammatico, P., Volinia, S., Gasparini, P., and Camaschella, C., *Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4317-21.
207. Latunde-Dada, G.O., Van der Westhuizen, J., Vulpe, C.D., Anderson, G.J., Simpson, R.J., and McKie, A.T., *Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 356-60.
208. Latunde-Dada, G.O., Vulpe, C.D., Anderson, G.J., Simpson, R.J., and McKie, A.T., *Tissue-specific changes in iron metabolism genes in mice following phenylhydrazine-induced haemolysis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1690**(2): p. 169-76.
209. LaVaute, T., Smith, S., Cooperman, S., Iwai, K., Land, W., Meyron-Holtz, E., Drake, S.K., Miller, G., Abu-Asab, M., Tsokos, M., Switzer, R., 3rd, Grinberg, A., Love, P., Tresser, N., and Rouault, T.A., *Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 209-14.
210. Le Gac, G., Mons, F., Jacolot, S., Scotet, V., Ferec, C., and Frebourg, T., *Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north French descent*. Br J Haematol, 2004. **125**(5): p. 674-8.
211. Le Gac, G., Scotet, V., Ka, C., Gourlaouen, I., Bryckaert, L., Jacolot, S., Mura, C., and Ferec, C., *The recently identified type 2A juvenile hemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(17): p. 1913-8.
212. Le Lan, C., Loreal, O., Cohen, T., Ropert, M., Glickstein, H., Laine, F., Pouchard, M., Deugnier, Y., Le Treut, A., Breuer, W., Cabantchik, Z.I., and Brissot, P., *Redox active plasma iron in C282Y/C282Y hemochromatosis*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4527-31.

213. Lebron, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N., and Bjorkman, P.J., *Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor*. Cell, 1998. **93**(1): p. 111-23.
214. Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., and Beutler, E., *The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9263-5.
215. Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., Wang, L., and Beutler, E., *Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1906-10.
216. Lee, P.L., Barton, J.C., Brandhagen, D., and Beutler, E., *Hemojuvelin (HJV) mutations in persons of European, African-American and Asian ancestry with adult onset haemochromatosis*. Br J Haematol, 2004. **127**(2): p. 224-9.
217. Lee, P.L., Beutler, E., Rao, S.V., and Barton, J.C., *Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4669-71.
218. Lesbordes-Brion, J.C., Viatte, L., Lou, D.Q., Bennoun, M., Houbron, C., Hamard, G., Kahn, A., and Vaulont, S. *Hepc1 gene knockout produces mouse model of iron overload*. in *BioIron*. 2005. Prague.
219. Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P., and Drysdale, J., *A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24437-40.
220. Levi, S. and Arosio, P., *Mitochondrial ferritin*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1887-9.
221. Levi, S., Cozzi, A., and Arosio, P., *Neuroferritinopathy: a neurodegenerative disorder associated with L-ferritin mutation*. Best Pract Res Clin Haematol, 2005. **18**(2): p. 265-76.
222. Levin, M.J., Tuil, D., Uzan, G., Dreyfus, J.C., and Kahn, A., *Expression of the transferrin gene during development of non-hepatic tissues: high level of transferrin mRNA in fetal muscle and adult brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **122**(1): p. 212-7.
223. Levy, J.E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., and Andrews, N.C., *Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system*. Nat Genet, 1999. **21**(4): p. 396-9.
224. Levy, J.E., Montross, L.K., Cohen, D.E., Fleming, M.D., and Andrews, N.C., *The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele*. Blood, 1999. **94**(1): p. 9-11.
225. Levy, J.E., Montross, L.K., and Andrews, N.C., *Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1209-16.
226. Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(10): p. 743-55.
227. Li, H. and Qian, Z.M., *Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery*. Medicinal Research Reviews, 2002. **22**(3): p. 225-250.
228. Lim, J.E., Jin, O., Bennett, C., Morgan, K., Wang, F., Trenor, C.C., 3rd, Fleming, M.D., and Andrews, N.C., *A mutation in Sec15l1 causes anemia in hemoglobin deficit (hbd) mice*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1270-3.
229. Lim, S.K., Kim, H., bin Ali, A., Lim, Y.K., Wang, Y., Chong, S.M., Costantini, F., and Baumman, H., *Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis*. Blood, 1998. **92**(6): p. 1870-7.
230. Lin, L., Goldberg, Y.P., and Ganz, T., *Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2884-9.

231. Liu, X.B., Nguyen, N.B., Marquess, K.D., Yang, F., and Haile, D.J., *Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(1): p. 47-56.
232. Liu, X.B., Yang, F., and Haile, D.J., *Functional consequences of ferroportin 1 mutations*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(1): p. 33-46.
233. Liu, Y.Q., Duan, X.L., Chang, Y.Z., Wang, H.T., and Qian, Z.M., *Molecular analysis of increased iron status in moderately exercised rats*. Mol Cell Biochem, 2006. **282**(1-2): p. 117-23.
234. Lou, D.Q., Nicolas, G., Lesbordes, J.C., Viatte, L., Grimber, G., Szajnert, M.F., Kahn, A., and Vaulont, S., *Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2816-21.
235. Lou, D.Q., Lesbordes, J.C., Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Van Rooijen, N., Kahn, A., Renia, L., and Vaulont, S., *Iron- and inflammation-induced hepcidin gene expression in mice is not mediated by Kupffer cells in vivo*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1056-64.
236. Lucotte, G. and Dieterlen, F., *A European allele map of the C282Y mutation of hemochromatosis: Celtic versus Viking origin of the mutation?* Blood Cells Mol Dis, 2003. **31**(2): p. 262-7.
237. Ludwiczek, S., Theurl, I., Artner-Dworzak, E., Chorney, M., and Weiss, G., *Duodenal HFE expression and hepcidin levels determine body iron homeostasis: modulation by genetic diversity and dietary iron availability*. J Mol Med, 2004. **82**(6): p. 373-82.
238. Ludwiczek, S., Theurl, I., Bahram, S., Schumann, K., and Weiss, G., *Regulatory networks for the control of body iron homeostasis and their dysregulation in HFE mediated hemochromatosis*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 489-99.
239. Lymboussaki, A., Pignatti, E., Montosi, G., Garuti, C., Haile, D.J., and Pietrangelo, A., *The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression*. J Hepatol, 2003. **39**(5): p. 710-5.
240. Mackenzie, B. and Hediger, M.A., *SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 571-9.
241. Mackenzie, B. and Garrick, M.D., *Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(6): p. G981-6.
242. Makui, H., Soares, R.J., Jiang, W., Constante, M., and Santos, M.M., *Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2189-95.
243. Marx, J.J., *Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element*. Best Pract Res Clin Haematol, 2002. **15**(2): p. 411-26.
244. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
245. Matsunaga, E. and Chedotal, A., *Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development*. Development, Growth and Differentiation, 2004. **46**(6): p. 481-486.
246. Matthes, T., Aguilar-Martinez, P., Pizzi-Bosman, L., Darbellay, R., Rubbia-Brandt, L., Giostra, E., Michel, M., Ganz, T., and Beris, P., *Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2181-3.
247. Mattman, A., Huntsman, D., Lockitch, G., Langlois, S., Buskard, N., Ralston, D., Butterfield, Y., Rodrigues, P., Jones, S., Porto, G., Marra, M., De Sousa, M., and Vatcher, G., *Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation*. Blood, 2002. **100**(3): p. 1075-7.

248. Mazur, A., Feillet-Coudray, C., Romier, B., Bayle, D., Gueux, E., Ruivard, M., Coudray, C., and Rayssiguier, Y., *Dietary iron regulates hepatic hepcidin 1 and 2 mRNAs in mice*. *Metabolism*, 2003. **52**(10): p. 1229-31.
249. McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., and Simpson, R.J., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. *Mol Cell*, 2000. **5**(2): p. 299-309.
250. McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., and Simpson, R.J., *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. *Science*, 2001. **291**(5509): p. 1755-9.
251. McKie, A.T., Latunde-Dada, G.O., Miret, S., McGregor, J.A., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Wigglesworth, J.M., and Simpson, R.J., *Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(4): p. 722-4.
252. McKie, A.T. and Barlow, D.J., *The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTPI)*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 801-6.
253. Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Shearman, J.D., and Robson, K.J., *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. *J Med Genet*, 1997. **34**(4): p. 275-8.
254. Merryweather-Clarke, A.T., Cadet, E., Bomford, A., Capron, D., Viprakasit, V., Miller, A., McHugh, P.J., Chapman, R.W., Pointon, J.J., Wimhurst, V.L., Livesey, K.J., Tanphaichitr, V., Rochette, J., and Robson, K.J., *Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(17): p. 2241-7.
255. Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U.V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P., and Rouault, T.A., *Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis*. *Embo J*, 2004. **23**(2): p. 386-95.
256. Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., and Rouault, T.A., *Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo*. *Science*, 2004. **306**(5704): p. 2087-90.
257. Millard, K.N., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., and Anderson, G.J., *Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 655-60.
258. Mims, M.P., Guan, Y., Pospisilova, D., Priwitzerova, M., Indrak, K., Ponka, P., Divoky, V., and Prchal, J.T., *Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload*. *Blood*, 2005. **105**(3): p. 1337-42.
259. Minamino, T., Christou, H., Hsieh, C.M., Liu, Y., Dhawan, V., Abraham, N.G., Perrella, M.A., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S., *Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8798-803.
260. Miret, S., Simpson, R.J., and McKie, A.T., *Physiology and molecular biology of dietary iron absorption*. *Annu Rev Nutr*, 2003. **23**: p. 283-301.
261. Miyajima, H., Nishimura, Y., Mizoguchi, K., Sakamoto, M., Shimizu, T., and Honda, N., *Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration*. *Neurology*, 1987. **37**(5): p. 761-7.
262. Miyajima, H., Takahashi, Y., and Kono, S., *Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism*. *Biometals*, 2003. **16**(1): p. 205-13.
263. Mok, H., Jelinek, J., Pai, S., Cattanaach, B.M., Prchal, J.T., Youssoufian, H., and Schumacher, A., *Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice*. *Development*, 2004. **131**(8): p. 1859-68.



264. Monnier, P.P., Sierra, A., Macchi, P., Deitinghoff, L., Andersen, J.S., Mann, M., Flad, M., Hornberger, M.R., Stahl, B., Bonhoeffer, F., and Mueller, B.K., *RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons*. *Nature*, 2002. **419**(6905): p. 392-5.
265. Montosi, G., Paglia, P., Garuti, C., Guzman, C.A., Bastin, J.M., Colombo, M.P., and Pietrangelo, A., *Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis*. *Blood*, 2000. **96**(3): p. 1125-9.
266. Montosi, G., Donovan, A., Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor, C.C., Gasparini, P., Andrews, N.C., and Pietrangelo, A., *Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(4): p. 619-23.
267. Montosi, G., Corradini, E., Garuti, C., Barelli, S., Recalcati, S., Cairo, G., Valli, L., Pignatti, E., Vecchi, C., Ferrara, F., and Pietrangelo, A., *Kupffer cells and macrophages are not required for hepatic hepcidin activation during iron overload*. *Hepatology*, 2005. **41**(3): p. 545-52.
268. Morris, T.J., Litvinova, M.M., Ralston, D., Mattman, A., Holmes, D., and Lockitch, G., *A novel ferroportin mutation in a Canadian family with autosomal dominant hemochromatosis*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(3): p. 309-14.
269. Muckenthaler, M., Roy, C.N., Custodio, A.O., Minana, B., deGraaf, J., Montross, L.K., Andrews, N.C., and Hentze, M.W., *Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis*. *Nat Genet*, 2003. **34**(1): p. 102-7.
270. Muckenthaler, M.U., Rodrigues, P., Macedo, M.G., Minana, B., Brennan, K., Cardoso, E.M., Hentze, M.W., and De Sousa, M., *Molecular analysis of iron overload in beta2-microglobulin-deficient mice*. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. **33**(2): p. 125-31.
271. Mukhopadhyay, C.K., Mazumder, B., and Fox, P.L., *Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(28): p. 21048-54.
272. Mura, C., Le Gac, G., Scotet, V., Ragueneas, O., Mercier, A.Y., and Ferec, C., *Variation of iron loading expression in C282Y homozygous haemochromatosis probands and sib pairs*. *J Med Genet*, 2001. **38**(9): p. 632-6.
273. Nagy, L.E., *Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury*. *Annu Rev Nutr*, 2004. **24**: p. 55-78.
274. Ned, R.M., Swat, W., and Andrews, N.C., *Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3711-8.
275. Nemeth, E., Valore, E.V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., and Ganz, T., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2461-3.
276. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., and Ganz, T., *IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
277. Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. *Science*, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
278. Nemeth, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T., and Camaschella, C., *Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1803-6.
279. Nemeth, E., Preza, G.C., Jung, C.L., Kaplan, J., Waring, A.J., and Ganz, T., *The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 328-33.
280. Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vaulont, S., *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*, 2001. **98**(15): p. 8780-5.

281. Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A., and Vaulont, S., *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4596-601.
282. Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., and Vaulont, S., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
283. Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., and Vaulont, S., *Hepcidin, a new iron regulatory peptide*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 327-35.
284. Nicolas, G., Viatte, L., Lou, D.Q., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., Andrews, N.C., and Vaulont, S., *Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 97-101.
285. Nicolas, G., Andrews, N.C., Kahn, A., and Vaulont, S., *Hepcidin, a candidate modifier of the hemochromatosis phenotype in mice*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2841-3.
286. Niederkofler, V., Salie, R., Sigrist, M., and Arber, S., *Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system*. J Neurosci, 2004. **24**(4): p. 808-18.
287. Niederkofler, V., Salie, R., and Arber, S., *Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2180-6.
288. Njajou, O.T., Vaessen, N., Joosse, M., Berghuis, B., van Dongen, J.W., Breuning, M.H., Snijders, P.J., Rutten, W.P., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., and Heutink, P., *A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis*. Nat Genet, 2001. **28**(3): p. 213-4.
289. Njajou, O.T., de Jong, G., Berghuis, B., Vaessen, N., Snijders, P.J., Goossens, J.P., Wilson, J.H., Breuning, M.H., Oostra, B.A., Heutink, P., Sandkuijl, L.A., and van Duijn, C.M., *Dominant hemochromatosis due to N144H mutation of SLC11A3: clinical and biological characteristics*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 439-43.
290. Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Antiochos, B., Wood, E.B., Sharp, J.J., Barker, J.E., and Fleming, M.D., *nm1054: a spontaneous, recessive, hypochromic, microcytic anemia mutation in the mouse*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3625-31.
291. Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Greer, E.L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J.J., Fujiwara, Y., Barker, J.E., and Fleming, M.D., *Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1264-1269.
292. Ohtake, T., Inoue, M., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., and Kohgo, Y. *Hepcidin is decreased in alcohol abuse*. in *BioIron*. 2005. Prague.
293. Osaki, S., Johnson, D.A., and Frieden, E., *The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum*. J Biol Chem, 1966. **241**(12): p. 2746-51.
294. Ouyang, Q., Bommakanti, M., and Miskimins, W.K., *A mitogen-responsive promoter region that is synergistically activated through multiple signalling pathways*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1796-804.
295. Pan, Y., Katula, K., and Failla, M.L., *Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1307**(2): p. 233-8.
296. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1012**: p. 1-13.
297. Papanikolaou, G., Samuels, M.E., Ludwig, E.H., MacDonald, M.L., Franchini, P.L., Dube, M.P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., Nemeth, E., Thompson, J., Risler, J.K., Zaborowska, C., Babakaiff, R., Radomski, C.C., Pape, T.D., Davidas, O., Christakis, J., Brissot, P., Lockitch, G., Ganz, T., Hayden, M.R., and Goldberg, Y.P., *Mutations*

- in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. Nat Genet, 2004. 36(1): p. 77-82.*
298. Papanikolaou, G., Tzilianos, M., Christakis, J.I., Bogdanos, D., Tsimirika, K., MacFarlane, J., Goldberg, Y.P., Sakellaropoulos, N., Ganz, T., and Nemeth, E., *Hepcidin in iron overload disorders. Blood, 2005. 105(10): p. 4103-5.*
299. Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., and Ganz, T., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem, 2001. 276(11): p. 7806-10.*
300. Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R.S., Bacon, B.R., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., and Sly, W.S., *Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(24): p. 13198-202.*
301. Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R.S., Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Schatzman, R.C., Bacon, B.R., and Sly, W.S., *Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(6): p. 2534-9.*
302. Parkkila, S., Parkkila, A.K., Waheed, A., Britton, R.S., Zhou, X.Y., Fleming, R.E., Tomatsu, S., Bacon, B.R., and Sly, W.S., *Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes. Haematologica, 2000. 85(4): p. 340-5.*
303. Patel, B.N. and David, S., *A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. J Biol Chem, 1997. 272(32): p. 20185-90.*
304. Patel, B.N., Dunn, R.J., Jeong, S.Y., Zhu, Q., Julien, J.P., and David, S., *Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. J Neurosci, 2002. 22(15): p. 6578-86.*
305. Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A.S., Datta, V., Lauth, X., Johnson, R.S., and Nizet, V., *TLR-4 dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. Blood, 2006.*
306. Philpott, C.C., Klausner, R.D., and Rouault, T.A., *The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(15): p. 7321-5.*
307. Pietrangelo, A., *Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. N Engl J Med, 2004. 350(23): p. 2383-97.*
308. Pietrangelo, A., *The ferroportin disease. Blood Cells Mol Dis, 2004. 32(1): p. 131-8.*
309. Pietrangelo, A., Caleffi, A., Henrion, J., Ferrara, F., Corradini, E., Kulaksiz, H., Stremmel, W., Andreone, P., and Garuti, C., *Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. Gastroenterology, 2005. 128(2): p. 470-9.*
310. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loreal, O., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. J Biol Chem, 2001. 276(11): p. 7811-9.*
311. Pignatti, E., Mascheroni, L., Sabelli, M., Barelli, S., Biffo, S., and Pietrangelo, A., *Ferroportin is a monomer in vivo in mice. Blood Cells Mol Dis, 2006. 36(1): p. 26-32.*
312. Piperno, A., Roetto, A., Mariani, R., Pelucchi, S., Corengia, C., Daraio, F., Piga, A., Garozzo, G., and Camaschella, C., *Homozygosity for transferrin receptor-2 Y250X mutation induces early iron overload. Haematologica, 2004. 89(3): p. 359-60.*
313. Pointon, J.J., Wallace, D., Merryweather-Clarke, A.T., and Robson, K.J., *Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. Genet Test, 2000. 4(2): p. 151-61.*
314. Porto, G., Roetto, A., Daraio, F., Pinto, J.P., Almeida, S., Bacelar, C., Nemeth, E., Ganz, T., and Camaschella, C., *A Portuguese patient homozygous for the -25G>A mutation of the HAMP*

- promoter shows evidence of steady-state transcription but fails to up-regulate hepcidin levels by iron.* Blood, 2005. **106**(8): p. 2922-3.
315. Poss, K.D. and Tonegawa, S., *Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10919-24.
316. Quigley, J.G., Yang, Z., Worthington, M.T., Phillips, J.D., Sabo, K.M., Sabath, D.E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B.L., and Abkowitz, J.L., *Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis.* Cell, 2004. **118**(6): p. 757-66.
317. Raja, K.B., Simpson, R.J., and Peters, T.J., *Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload.* Br J Haematol, 1994. **86**(1): p. 156-62.
318. Riedel, H.D., Muckenthaler, M.U., Gehrke, S.G., Mohr, I., Brennan, K., Herrmann, T., Fitscher, B.A., Hentze, M.W., and Stremmel, W., *HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells.* Blood, 1999. **94**(11): p. 3915-21.
319. Rivard, S.R., Lanzara, C., Grimard, D., Carella, M., Simard, H., Ficarella, R., Simard, R., D'Adamo, A.P., De Braekeleer, M., and Gasparini, P., *Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload (HFE type 4) due to a new missense mutation in the FERROPORTIN 1 gene (SLC11A3) in a large French-Canadian family.* Haematologica, 2003. **88**(7): p. 824-6.
320. Rivera, S., Liu, L., Nemeth, E., Gabayan, V., Sorensen, O.E., and Ganz, T., *Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia.* Blood, 2005. **105**(4): p. 1797-1802.
321. Rivera, S., Nemeth, E., Gabayan, V., Lopez, M.A., Farshidi, D., and Ganz, T., *Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs.* Blood, 2005. **106**(6): p. 2196-9.
322. Robb, A. and Wessling-Resnick, M., *Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin.* Blood, 2004. **104**(13): p. 4294-9.
323. Rodriguez Martinez, A., Niemela, O., and Parkkila, S., *Hepatic and extrahepatic expression of the new iron regulatory protein hemojuvelin.* Haematologica, 2004. **89**(12): p. 1441-5.
324. Roecker, L., Meier-Buttermilch, R., Brechtel, L., Nemeth, E., and Ganz, T., *Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon.* Eur J Appl Physiol, 2005. **95**(5-6): p. 569-71.
325. Roesler, W.J., *The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression.* Annu Rev Nutr, 2001. **21**: p. 141-65.
326. Roetto, A., Totaro, A., Cazzola, M., Cicilano, M., Bosio, S., D'Ascola, G., Carella, M., Zelante, L., Kelly, A.L., Cox, T.M., Gasparini, P., and Camaschella, C., *Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q.* Am J Hum Genet, 1999. **64**(5): p. 1388-93.
327. Roetto, A., Totaro, A., Piperno, A., Piga, A., Longo, F., Garozzo, G., Cali, A., De Gobbi, M., Gasparini, P., and Camaschella, C., *New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3.* Blood, 2001. **97**(9): p. 2555-60.
328. Roetto, A., Merryweather-Clarke, A.T., Daraio, F., Livesey, K., Pointon, J.J., Barbabietola, G., Piga, A., Mackie, P.H., Robson, K.J., and Camaschella, C., *A valine deletion of ferroportin 1: a common mutation in hemochromatosis type 4.* Blood, 2002. **100**(2): p. 733-4.
329. Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D., and Camaschella, C., *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis.* Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 21-2.
330. Roetto, A., Daraio, F., Porporato, P., Caruso, R., Cox, T.M., Cazzola, M., Gasparini, P., Piperno, A., and Camaschella, C., *Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R).* Blood, 2004. **103**(6): p. 2407-9.

331. Rogers, J., Lacroix, L., Durmowitz, G., Kasschau, K., Andriotakis, J., and Bridges, K.R., *The role of cytokines in the regulation of ferritin expression*. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **356**: p. 127-32.
332. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., and Wenger, R.H., *Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(32): p. 20055-62.
333. Roy, C.N., Penny, D.M., Feder, J.N., and Enns, C.A., *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 9022-8.
334. Roy, C.N. and Enns, C.A., *Iron homeostasis: new tales from the crypt*. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4020-7.
335. Rund, D. and Rachmilewitz, E., *Beta-thalassemia*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(11): p. 1135-46.
336. Santos, M., Schilham, M.W., Rademakers, L.H., Marx, J.J., de Sousa, M., and Clevers, H., *Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man*. *J Exp Med*, 1996. **184**(5): p. 1975-85.
337. Scheinberg, I.H. and Gitlin, D., *Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease)*. *Science*, 1952. **116**(3018): p. 484-5.
338. Schimanski, L.M., Drakesmith, H., Merryweather-Clarke, A.T., Viprakasit, V., Edwards, J.P., Sweetland, E., Bastin, J.M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K.J., and Townsend, A.R., *In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4096-102.
339. Schonig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K., and Bujard, H., *Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(23): p. e134.
340. Sham, R.L., Phatak, P.D., West, C., Lee, P., Andrews, C., and Beutler, E., *Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **34**(2): p. 157-61.
341. Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J., and McKie, A.T., *Identification of an intestinal heme transporter*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 789-801.
342. Shi, J. and Camus, A.C., *Hepcidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?* *Dev Comp Immunol*, 2005.
343. Shike, H., Lauth, X., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Van Olst, J.C., Shimizu, C., Bulet, P., and Burns, J.C., *Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(8): p. 2232-7.
344. Simon, M., Bourel, M., Fauchet, R., and Genetet, B., *Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis*. *Gut*, 1976. **17**(5): p. 332-4.
345. Smith, S.R., Cooperman, S., Lavaute, T., Tresser, N., Ghosh, M., Meyron-Holtz, E., Land, W., Ollivierre, H., Jortner, B., Switzer, R., 3rd, Messing, A., and Rouault, T.A., *Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1012**: p. 65-83.
346. Stamatoyannopoulos, G., *Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(3): p. 259-71.
347. Steiner, M., Ocran, K., Genschel, J., Meier, P., Gerl, H., Ventz, M., Schneider, M.L., Buttner, C., Wadowska, K., Kerner, W., Schuff-Werner, P., Lochs, H., and Schmidt, H., *A homozygous HFE gene splice site mutation (IVS5+1 G/A) in a hereditary hemochromatosis patient of Vietnamese origin*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(3): p. 789-95.

348. Stuart, K.A., Anderson, G.J., Frazer, D.M., Powell, L.W., McCullen, M., Fletcher, L.M., and Crawford, D.H., *Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects*. Gut, 2003. **52**(7): p. 953-9.
349. Subramaniam, V.N., Wallace, D.F., Dixon, J.L., Fletcher, L.M., and Crawford, D.H., *Ferroportin disease due to the A77D mutation in Australia*. Gut, 2005. **54**(7): p. 1048-9.
350. Tavassoli, M., Kishimoto, T., Soda, R., Kataoka, M., and Harjes, K., *Liver endothelium mediates the uptake of iron-transferrin complex by hepatocytes*. Exp Cell Res, 1986. **165**(2): p. 369-79.
351. ten Dijke, P. and Hill, C.S., *New insights into TGF-beta-Smad signalling*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 265-73.
352. Testa, U., *Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis*. Leukemia, 2004. **18**(7): p. 1176-99.
353. Theurl, M., Theurl, I., Obrist, P., Hochegger, K., Schümann, K., and Weiss, G. *Role of Kupffer cells for the regulation of body iron homeostasis*. in *BioIron*. 2005. Prague.
354. Thorstensen, K., Trinder, D., Zak, O., and Aisen, P., *Uptake of iron from N-terminal half-transferrin by isolated rat hepatocytes. Evidence of transferrin-receptor-independent iron uptake*. Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 129-33.
355. Tolosano, E., Hirsch, E., Patrucco, E., Camaschella, C., Navone, R., Silengo, L., and Altruda, F., *Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3906-14.
356. Tolosano, E. and Altruda, F., *Hemopexin: structure, function, and regulation*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 297-306.
357. Tolosano, E., Fagoonee, S., Garuti, C., Valli, L., Andrews, N.C., Altruda, F., and Pietrangelo, A., *Haptoglobin modifies the hemochromatosis phenotype in mice*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3353-5.
358. Torti, S.V., Kwak, E.L., Miller, S.C., Miller, L.L., Ringold, G.M., Myambo, K.B., Young, A.P., and Torti, F.M., *The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene*. J Biol Chem, 1988. **263**(25): p. 12638-44.
359. Trenor, C.C., 3rd, Campagna, D.R., Sellers, V.M., Andrews, N.C., and Fleming, M.D., *The molecular defect in hypotransferrinemic mice*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1113-8.
360. Trinder, D., Oates, P.S., Thomas, C., Sadleir, J., and Morgan, E.H., *Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload*. Gut, 2000. **46**(2): p. 270-6.
361. Trinder, D., Olynyk, J.K., Sly, W.S., and Morgan, E.H., *Iron uptake from plasma transferrin by the duodenum is impaired in the Hfe knockout mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5622-6.
362. Trinder, D. and Baker, E., *Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(3): p. 292-6.
363. Trowbridge, I.S. and Omary, M.B., *Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(5): p. 3039-43.
364. Van Vlierberghe, H., Langlois, M., Delanghe, J., Horsmans, Y., Michielsen, P., Henrion, J., Cartuyvels, R., Billiet, J., De Vos, M., and Leroux-Roels, G., *Haptoglobin phenotype 2-2 overrepresentation in Cys282Tyr hemochromatotic patients*. J Hepatol, 2001. **35**(6): p. 707-11.
365. Van Vlierberghe, H., Langlois, M., and Delanghe, J., *Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease*. Clin Chim Acta, 2004. **345**(1-2): p. 35-42.
366. Verga Falzacappa, M.V., Vujic Spasic, M., Hess, R., Jens, S., Hentze, M.W., and Muckenthaler, M. *Hepcidin response in cultured cells*. in *BioIron*. 2005. Prague.

367. Verroust, P.J. and Christensen, E.I., *Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds*. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. **17**(11): p. 1867-71.
368. Verroust, P.J. and Kozyraki, R., [*Cubilin: physiopathologic role and relationship with megalin*]. *Med Sci (Paris)*, 2003. **19**(3): p. 337-43.
369. Viatte, L., Lesbordes-Brion, J.C., Lou, D.Q., Bennoun, M., Nicolas, G., Kahn, A., Canonne-Hergaux, F., and Vaulont, S., *Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4861-4.
370. Viatte, L., Nicolas, G., Lou, D.Q., Bennoun, M., Lesbordes-Brion, J.C., Canonne-Hergaux, F., Schonig, K., Bujard, H., Kahn, A., Andrews, N.C., and Vaulont, S., *Chronic hepcidin induction causes hypsideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice*. *Blood*, 2005.
371. Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P., *Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 469-85.
372. Viprakasit, V., Merryweather-Clarke, A.T., Chinthammitr, Y., Schimanski, L., Drakesmith, H., Srichairatanakool, S., Limwongse, C., Townsend, A., and Robson, K.J.H., *Molecular Diagnosis of the First Ferroportin Mutation (C326Y) in the Far East Causing a Dominant Form of Inherited Iron Overload*. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2004. **104**(11): p. 3204.
373. Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., and Anderson, G.J., *Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse*. *Nat Genet*, 1999. **21**(2): p. 195-9.
374. Waalen, J., Nordestgaard, B.G., and Beutler, E., *The penetrance of hereditary hemochromatosis*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005. **18**(2): p. 203-20.
375. Waheed, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Fleming, R.E., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Britton, R.S., Bacon, B.R., and Sly, W.S., *Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1579-84.
376. Waheed, A., Grubb, J.H., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., Costaldi, M.E., Britton, R.S., Bacon, B.R., and Sly, W.S., *Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(5): p. 3117-22.
377. Wallace, D.F., Pedersen, P., Dixon, J.L., Stephenson, P., Searle, J.W., Powell, L.W., and Subramaniam, V.N., *Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis*. *Blood*, 2002. **100**(2): p. 692-4.
378. Wallace, D.F., Clark, R.M., Harley, H.A., and Subramaniam, V.N., *Autosomal dominant iron overload due to a novel mutation of ferroportin1 associated with parenchymal iron loading and cirrhosis*. *J Hepatol*, 2004. **40**(4): p. 710-3.
379. Wallace, D.F., Browett, P., Wong, P., Kua, H., Ameratunga, R., and Subramaniam, V.N., *Identification of ferroportin disease in the Indian subcontinent*. *Gut*, 2005. **54**(4): p. 567-8.
380. Wallace, D.F., Dixon, J.L., Ramm, G.A., Anderson, G.J., Powell, L.W., and Subramaniam, N., *Hemojuvelin (HJV)-associated hemochromatosis: analysis of HJV and HFE mutations and iron overload in three families*. *Haematologica*, 2005. **90**(2): p. 254-5.
381. Wallace, D.F., Summerville, L., Lusby, P.E., and Subramaniam, V.N., *First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin*. *Gut*, 2005. **54**(7): p. 980-6.
382. Wallace, D.F., Summerville, L., Lusby, P.E., and Subramaniam, V.N., *Prohepcidin localises to the Golgi compartment and secretory pathway in hepatocytes*. *J Hepatol*, 2005. **43**(4): p. 720-8.
383. Wallace, D.F., Jones, M.D., Pedersen, P., Rivas, L., Sly, L.I., and Subramaniam, V.N., *Purification and partial characterisation of recombinant human hepcidin*. *Biochimie*, 2006. **88**(1): p. 31-7.

384. Wang, J., Chen, G., and Pantopoulos, K., *The haemochromatosis protein HFE induces an apparent iron-deficient phenotype in H1299 cells that is not corrected by co-expression of beta 2-microglobulin*. *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 3): p. 891-9.
385. Wang, J., Chen, G., and Pantopoulos, K., *Nitric oxide inhibits the degradation of IRP2*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(4): p. 1347-53.
386. Wang, R.H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L., and Deng, C.X., *A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression*. *Cell Metab*, 2005. **2**(6): p. 399-409.
387. Ward, P.P., Mendoza-Meneses, M., Cunningham, G.A., and Conneely, O.M., *Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(1): p. 178-85.
388. Weinstein, D.A., Roy, C.N., Fleming, M.D., Loda, M.F., Wolfsdorf, J.I., and Andrews, N.C., *Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3776-81.
389. Weiss, G. and Goodnough, L.T., *Anemia of chronic disease*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 1011-23.
390. West, A.P., Jr., Bennett, M.J., Sellers, V.M., Andrews, N.C., Enns, C.A., and Bjorkman, P.J., *Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(49): p. 38135-8.
391. White, K. and Munro, H.N., *Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(18): p. 8938-42.
392. White, R.A., Boydston, L.A., Brookshier, T.R., McNulty, S.G., Nsumu, N.N., Brewer, B.P., and Blackmore, K., *Iron metabolism mutant hbd mice have a deletion in Sec15l1, which has homology to a yeast gene for vesicle docking*. *Genomics*, 2005. **86**(6): p. 668-73.
393. Wilkins, S.J., Frazer, D.M., Millard, K.N., McLaren, G.D., and Anderson, G.J., *Iron metabolism in the hemoglobin deficit mouse: correlation of diferric transferrin with hepcidin expression*. *Blood*, 2005.
394. Willnow, T.E., Hilpert, J., Armstrong, S.A., Rohlmann, A., Hammer, R.E., Burns, D.K., and Herz, J., *Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8460-4.
395. Wu, K.J., Polack, A., and Dalla-Favera, R., *Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC*. *Science*, 1999. **283**(5402): p. 676-9.
396. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., and Koizumi, S., *Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(1): p. 129-35.
397. Yamaji, S., Sharp, P., Ramesh, B., and Srail, S.K., *Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin*. *Blood*, 2004. **104**(7): p. 2178-80.
398. Yamamoto, K., Yoshida, K., Miyagoe, Y., Ishikawa, A., Hanaoka, K., Nomoto, S., Kaneko, K., Ikeda, S., and Takeda, S., *Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1588**(3): p. 195-202.
399. Yang, F., Naylor, S.L., Lum, J.B., Cutshaw, S., McCombs, J.L., Naberhaus, K.H., McGill, J.R., Adrian, G.S., Moore, C.M., Barnett, D.R., and et al., *Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(10): p. 3257-61.
400. Yang, F., Liu, X.B., Quinones, M., Melby, P.C., Ghio, A., and Haile, D.J., *Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39786-91.



401. Yang, F., Wang, X., Haile, D.J., Piantadosi, C.A., and Ghio, A.J., *Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L932-9.
402. Yang, J., Goetz, D., Li, J.Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., and Barasch, J., *An iron delivery pathway mediated by a lipocalin*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1045-56.
403. Yang, J., Mori, K., Li, J.Y., and Barasch, J., *Iron, lipocalin, and kidney epithelia*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(1): p. F9-18.
404. Yeh, K.Y., Yeh, M., and Glass, J., *Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G385-94.
405. Yet, S.F., Perrella, M.A., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., Christou, H., Kourembanas, S., and Lee, M.E., *Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice*. J Clin Invest, 1999. **103**(8): p. R23-9.
406. Zakhary, R., Poss, K.D., Jaffrey, S.R., Ferris, C.D., Tonegawa, S., and Snyder, S.H., *Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide*. PNAS, 1997. **94**(26): p. 14848-14853.
407. Zhang, A.S., Xiong, S., Tsukamoto, H., and Enns, C.A., *Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1509-14.
408. Zhang, A.S., West, A.P., Jr., Wyman, A.E., Bjorkman, P.J., and Enns, C.A., *Interaction of hepcidin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33885-94.
409. Zhang, H., Yuan, Q., Zhu, Y., and Ma, R., *Expression and preparation of recombinant hepcidin in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2005. **41**(2): p. 409-16.
410. Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., Parkkila, S., Waheed, A., Jiang, J., Fei, Y., Brunt, E.M., Ruddy, D.A., Prass, C.E., Schatzman, R.C., O'Neill, R., Britton, R.S., Bacon, B.R., and Sly, W.S., *HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2492-7.
411. Zoller, H. and Vogel, W., *Iron supplementation in athletes--first do no harm*. Nutrition, 2004. **20**(7-8): p. 615-9.
412. Zoller, H., McFarlane, I., Theurl, I., Stadlmann, S., Nemeth, E., Oxley, D., Ganz, T., Halsall, D.J., Cox, T.M., and Vogel, W., *Primary iron overload with inappropriate hepcidin expression in V162del ferroportin disease*. Hepatology, 2005. **42**(2): p. 466-72.
413. Zoller, H., Owen, D., Peak-Chew, S.-Y., and Cox, T.M. *Human hepcidin is a copper-binding peptide*. in *BioIron*. 2005. Prague.
414. Zwilling, B.S., Kuhn, D.E., Wikoff, L., Brown, D., and Lafuse, W., *Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1386-92.

## ***Annexe: Liste des publications***

[Viatte L](#), Nicolas G, Lou DQ, Bennoun M, Lesbordes-Brion JC, Canonne-Hergaux F, Schonig K, Bujard H, Kahn A, Andrews NC, [Vaulont S](#). Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice. *Blood*. 2005 Dec 8; [Epub ahead of print]

[Vaulont S](#), Lou DQ, [Viatte L](#) and Kahn A. Of mice and men: the iron age. *J Clin Invest*. 2005 August;115(8):2079-2082.

[Viatte L](#) and [Vaulont S](#). L'hepcidine, un nouveau regard sur le métabolisme du fer. *Hépatogastro*, vol. 12, n°3, mai-juin 2005.

[Viatte L](#), Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, Bennoun M, Nicolas G, Kahn A, Canonne-Hergaux F, [Vaulont S](#). Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood*, 2005 Jun 15;105(12):4861-4.

Lou DQ, Lesbordes JC, Nicolas G, [Viatte L](#), Renia L, Bennoun M, Kahn A, [Vaulont S](#). Iron- and inflammation-induced hepcidin gene expression in vivo are not mediated by Kupffer cells. *Hepatology*, 2005 May;41(5):1056-64.

Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, [Viatte L](#), Grimber G, Szajnert MF, Kahn A, [Vaulont S](#). Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2816-21. Epub 2003 Nov 06.

Nicolas G\*, [Viatte L](#)\*, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC, [Vaulont S](#). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003 May;34(1):97-101. \* Les deux auteurs ont contribué à part égale au travail.

Nicolas G, [Viatte L](#), Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, [Vaulont S](#). Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis*. 2002 Nov-Dec;29(3):327-35.

Nicolas G, Chauvet C, [Viatte L](#), Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, [Vaulont S](#). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(7):1037-44.

## ***Résumé***

Le fer est un élément crucial dans le bon fonctionnement de l'organisme mais le fer en excès est toxique. Les maladies de surcharge en fer sont fréquentes, on parle d'hémochromatose. L'hémochromatose héréditaire est une maladie génétique autosomique récessive, due dans la majorité des cas à une mutation du gène *HFE*. L'hepcidine est un peptide sécrété par le foie en réponse au fer. Elle inhibe l'absorption intestinale et le recyclage par les macrophages du fer.

Pour mieux comprendre le mode d'action de l'hepcidine, nous avons utilisé un modèle de souris déficientes en hepcidine. Ces souris ont une surcharge en fer massive. Nous avons mis en évidence une augmentation de la quantité des protéines impliquées dans le transport intestinal du fer et de ferroportine dans le duodénum, le foie et la rate chez ces souris.

Nous avons voulu tester l'effet thérapeutique de l'hepcidine dans l'hémochromatose. Nous avons montré que l'apport d'hepcidine transgénique à des souris KO *Hfe* empêchait l'apparition de la surcharge en fer chez ces souris. Nous avons ensuite développé un modèle murin de surexpression inductible de l'hepcidine. L'induction de l'hepcidine transgénique dans des souris KO *Hfe* déjà surchargées en fer entraîne une altération de la distribution du fer dans ces souris, le fer étant retenu dans les entérocytes et les macrophages, associée à une diminution de la ferroportine dans ces cellules. Nous avons donc pu montrer que l'hepcidine pouvait non seulement prévenir mais guérir la surcharge en fer dans l'hémochromatose HFE-dépendante.

L'hepcidine semble donc jouer un rôle clé dans l'étiologie de l'hémochromatose et semble être un agent thérapeutique de choix pour cette maladie.

## ***Summary***

Iron is essential for the organism but iron excess can be deleterious. Iron overload diseases are frequent and called hemochromatosis. Hereditary hemochromatosis is an autosomal recessive disease and generally due to mutations in *HFE* gene. Heparidin is a small peptide produced by the liver in response to iron load that inhibits intestinal iron absorption and recycling of iron by macrophages.

In order to get insights about hepcidin mode of action we used hepcidin deficient mice. These mice present massive iron overload resembling iron overload observed in hereditary hemochromatosis. We observed that there was an increase in levels of proteins involved in intestinal iron absorption and of ferroportin in the duodenum, spleen and liver in these mice.

We then wanted to test the therapeutic role of hepcidin in hemochromatosis. We demonstrated that transgenic hepcidin was able to prevent iron overload in *Hfe* KO mice. We next developed a murine model inducibly expressing hepcidin and observed that induction of transgenic hepcidin in iron loaded *Hfe* KO mice altered iron distribution. Iron accumulated in enterocytes and macrophages rather than in hepatocytes and this retention of iron was associated with a decrease in ferroportin protein levels. We thus demonstrated that hepcidin could not only prevent but also cure iron overload in HFE-hemochromatosis.

Heparidin seems to play a major role in hemochromatosis aetiology and could be a key therapeutic agent for this disease.