



**HAL**  
open science

**Caractérisation du phénotype hépatosplénique d'un nouveau modèle de rats acéruplasminémiques pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'acéruplasminémie héréditaire**

Moussa Kenawi

► **To cite this version:**

Moussa Kenawi. Caractérisation du phénotype hépatosplénique d'un nouveau modèle de rats acéruplasminémiques pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'acéruplasminémie héréditaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B045 . tel-03428092

**HAL Id: tel-03428092**

**<https://theses.hal.science/tel-03428092>**

Submitted on 15 Nov 2021

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : *Physiologie, physiopathologie, et biologie systémique médicale*

Par

**Moussa KENAWI**

**Caractérisation du phénotype hépatosplénique d'un nouveau modèle de rats acéruplasminémiques pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'acéruplasminémie héréditaire**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 14 Novembre 2019

Unité de recherche : UMR 1241 NuMeCan Nutrition, Métabolisme et Cancer

## Rapporteurs avant soutenance :

Catherine Mura  
Muriel Bost

Professeure des Universités – Université d'Orléans  
Praticienne Hospitalière Habilitée à Diriger des Recherches – INRS, CHU de Lyon

## Composition du Jury :

### Rapporteurs :

Catherine Mura  
Muriel Bost

Professeure des Universités – Université d'Orléans  
Praticienne Hospitalière Habilitée à Diriger des Recherches – INRS, CHU de Lyon

### Président :

Marie-Paule Roth

Directrice de Recherche INSERM – IRSD (UMR1220)

### Examineurs :

Edouard Bardou-Jacquet

Professeur des Universités Praticien Hospitalier – Université de Rennes 1

### Dir. de thèse :

Olivier Loréal

Directeur de Recherche INSERM – Institut NuMeCan (UMR 1241)

### Co-dir. de thèse :

Anne Jolivet-Gougeon

Professeure des Universités Praticienne Hospitalière – Université de Rennes 1

## REMERCIEMENTS

*Merci à la région Bretagne ainsi qu'à l'INSERM pour m'avoir supporté financièrement dans la réalisation de ce travail de thèse.*

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Olivier LOREAL, pour la confiance qu'il m'a accordée, la qualité de son encadrement, et sa grande bienveillance. Je remercie également ma co-directrice Anne JOLIVET-GOUGEON.

Je souhaite par ailleurs exprimer ma reconnaissance à l'ensemble des personnes ayant participé à ce travail ainsi qu'à ma formation, tant sur le plan technique que scientifique.

Je remercie l'ensemble des membres du Jury, pour avoir accepté d'évaluer mon travail au terme de ces trois années.

Merci également à mes proches pour leur soutien quotidien.

## SOMMAIRE

|  |                |
|--|----------------|
| <i>TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX</i> .....                                   | <i>Page 8</i>  |
| <i>LISTE DES ABREVIATIONS</i> .....  | <i>Page 9</i>  |
| <i>INTRODUCTION GENERALE</i> .....   | <i>Page 12</i> |
| <i>1. Le métabolisme du fer</i> .....  | <i>Page 12</i> |
| <i>1.1. Absorption intestinale du fer</i> .....                              | <i>Page 14</i> |
| <i>1.1.1. Absorption du fer non-héminique luminal</i> .....                  | <i>Page 14</i> |
| - <i>Etape de réduction du fer</i> .....                                     | <i>Page 14</i> |
| - <i>Etape d'absorption du fer</i> .....                                     | <i>Page 14</i> |
| <i>1.1.2. Absorption du fer héminique luminal</i> .....                      | <i>Page 15</i> |
| - <i>Absorption du fer héminique par transport transmembranaire</i> .....    | <i>Page 15</i> |
| - <i>Absorption du fer héminique par endocytose</i> .....                    | <i>Page 15</i> |
| <i>1.1.3. Export du fer entérocytaire</i> .....                              | <i>Page 15</i> |
| - <i>Export du fer par la ferroportine</i> .....                             | <i>Page 15</i> |
| - <i>Le bloc muqueux</i> .....   | <i>Page 16</i> |
| - <i>Oxydation du fer ferreux par l'héphaestine</i> .....                    | <i>Page 16</i> |
| <i>1.2. Transport plasmatique et captation cellulaire du fer</i> .....       | <i>Page 18</i> |
| <i>1.2.1. Transport plasmatique du fer lié à la transferrine</i> .....       | <i>Page 18</i> |
| - <i>La transferrine</i> .....   | <i>Page 18</i> |
| - <i>Formation du complexe fer-transferrine</i> .....                        | <i>Page 18</i> |
| <i>1.2.2. Captation cellulaire du fer plasmatique</i> .....                  | <i>Page 19</i> |
| - <i>Le récepteur à la transferrine</i> .....                                | <i>Page 19</i> |
| - <i>Mécanisme de captation cellulaire du fer par le biais de TfR1</i> ..... | <i>Page 20</i> |
| - <i>Rôle secondaire du récepteur TfR2</i> .....                             | <i>Page 21</i> |
| <i>1.3. Devenir du fer cellulaire</i> .....                                  | <i>Page 22</i> |
| <i>1.3.1. Les états du fer cytosolique</i> .....                             | <i>Page 23</i> |
| - <i>Le pool labile de fer</i> .....   | <i>Page 23</i> |
| - <i>Chaperonnage du fer cytosolique</i> .....                               | <i>Page 23</i> |
| <i>1.3.2. Stockage du fer cellulaire</i> .....                               | <i>Page 24</i> |
| - <i>La ferritine</i> .....  | <i>Page 24</i> |



|   |         |
|---|---------|
| - Processus de stockage du fer dans la ferritine.....                                     | Page 25 |
| - La ferritine mitochondriale.....  | Page 26 |
| 1.3.3. Utilisation du fer cellulaire dans la mitochondrie.....                            | Page 27 |
| - Import du fer dans la mitochondrie.....   | Page 27 |
| - Formation des clusters fer-souffre.....   | Page 28 |
| - Synthèse de l'hème.....   | Page 30 |
| 1.4. Recyclage de l'hème et réapprovisionnement de l'organisme en fer bio-disponible..... | Page 33 |
| 1.4.1. L'érythrophagocytose.....  | Page 33 |
| - Phagocytose des érythrocytes sénescents.....  | Page 33 |
| - Dégradation des érythrocytes et réintroduction du fer dans la voie sanguine.....        | Page 34 |
| 1.4.2. Les voies alternatives du recyclage de l'hème.....                                 | Page 35 |
| - La voie haptoglobine-CD163.....   | Page 35 |
| - La voie hémopexine-CD91.....  | Page 35 |
| 1.5. Régulation du métabolisme du fer.....  | Page 37 |
| 1.5.1. Régulation systémique du fer et rôle de l'hepcidine.....                           | Page 37 |
| - L'hepcidine.....  | Page 37 |
| - Régulation du métabolisme fer par l'hepcidine.....                                      | Page 37 |
| 1.5.2. Régulation de l'expression de l'hepcidine.....                                     | Page 38 |
| - Induction de l'hepcidine par la saturation de la transferrine.....                      | Page 38 |
| - Induction de l'hepcidine par les stocks hépatiques de fer.....                          | Page 39 |
| - Induction de l'hepcidine par l'inflammation.....  | Page 40 |
| - Inhibition de l'hepcidine.....  | Page 41 |
| 1.5.3. Régulation cellulaire métabolisme du fer.....                                      | Page 44 |
| - Régulation transcriptionnelle et rôle des protéines HIF.....                            | Page 44 |
| - Régulation post-transcriptionnelle et rôle du système IRP/IRE.....                      | Page 45 |
| 2. Les pathologies de surcharge en fer.....   | Page 48 |
| 2.1. Les maladies génétiques de surcharge en fer systémique.....                          | Page 48 |
| 2.1.1. Les maladies de surcharge hepcidino-dépendantes.....                               | Page 48 |
| - L'hémochromatose de type 1.....   | Page 48 |
| - Les hémochromatoses de type 2 et 3.....   | Page 49 |
| - L'hémochromatose de type 4B.....  | Page 49 |
| 2.1.2. Les maladies de surcharge non hepcidino-dépendantes.....                           | Page 50 |

|   |         |
|---|---------|
| - La maladie de la ferroportine.....  | Page 50 |
| - Les mutations de SLC11A2.....   | Page 50 |
| - L'atransferrinémie héréditaire.....   | Page 51 |
| 2.2. L'acéruplasminémie héréditaire.....  | Page 51 |
| 2.2.1. Caractéristiques moléculaires de l'acéruplasminémie héréditaire.....         | Page 52 |
| - Les mutations du gène de la céruloplasmine.....                                   | Page 52 |
| - Exemples de mutations menant à une acéruplasminémie stricte.....                  | Page 52 |
| - Exemples de mutations menant à la sécrétion d'une protéine non-fonctionnelle..... | Page 53 |
| 2.2.2. Acéruplasminémie héréditaire et métabolisme du fer.....                      | Page 53 |
| - Le phénotype martial acéruplasminémique.....                                      | Page 53 |
| - La compréhension incomplète du phénotype acéruplasminémique.....                  | Page 54 |
| 2.2.3. Les principaux modèles expérimentaux d'acéruplasminémie héréditaire.....     | Page 54 |
| - Le modèle de Harris et collaborateurs (1999).....                                 | Page 54 |
| - Le modèle de Patel et collaborateurs (2002).....                                  | Page 56 |
| - Le modèle de Yamamoto et collaborateurs (2002).....                               | Page 56 |
| - Le modèle de Gouya et collaborateurs (2007).....                                  | Page 57 |
| 3. La céruloplasmine.....   | Page 59 |
| 3.1. Le gène codant de la céruloplasmine.....                                       | Page 59 |
| 3.1.1. Structure du gène de la céruloplasmine.....                                  | Page 59 |
| 3.1.2. Régulation de l'expression du gène de la céruloplasmine.....                 | Page 60 |
| - Régulation par l'inflammation.....  | Page 60 |
| - Régulation hormonale.....   | Page 61 |
| - Régulation par les métaux.....  | Page 62 |
| - Régulation par l'oxygène.....   | Page 62 |
| 3.2. La protéine céruloplasmine.....  | Page 63 |
| 3.2.1. Structure de la glycoprotéine céruloplasmine.....                            | Page 64 |
| - Structure primaire de la céruloplasmine.....                                      | Page 64 |
| - Structure secondaire de la céruloplasmine.....                                    | Page 65 |
| - Structure tertiaire de la céruloplasmine.....                                     | Page 68 |
| 3.2.2. Métaux et structure de la céruloplasmine.....                                | Page 68 |
| - Intégration des atomes de cuivre dans la céruloplasmine.....                      | Page 68 |
| - Les centres cuivre de la céruloplasmine.....                                      | Page 69 |

|  |         |
|--|---------|
| - Les autres cations intégrés à la céruloplasmine .....                          | Page 70 |
| - Les sites labiles de fixation des cations métalliques .....                    | Page 71 |
| 3.2.3. Expression tissulaire des différentes formes de la protéine .....         | Page 71 |
| - Expression de la forme circulante de la protéine .....                         | Page 71 |
| - Expression de la forme membranaire de la céruloplasmine .....                  | Page 71 |
| - Hypothèse d'une troisième forme de céruloplasmine .....                        | Page 72 |
| 3.2.4 Activité ferroxidase de la céruloplasmine .....                            | Page 72 |
| - Processus d'oxydation du fer par la céruloplasmine .....                       | Page 72 |
| - Les cinétiques enzymatiques de la céruloplasmine .....                         | Page 73 |
| 3.3. Rôles biologiques de la céruloplasmine .....                                | Page 73 |
| 3.3.1. Implications de la céruloplasmine dans le métabolisme du fer .....        | Page 74 |
| - Implication générale .....   | Page 74 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans la stabilisation de la ferroportine .....       | Page 74 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans la formation du complexe fer-transferrine ..... | Page 75 |
| - Rôle potentiel de la ceruloplasmine dans la captation cellulaire du NTBI ..... | Page 75 |
| 3.3.2. Céruloplasmine et métabolisme des métaux non-ferreux .....                | Page 75 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans le transport du cuivre .....                    | Page 75 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation du cobalt .....                     | Page 76 |
| 3.3.3. Autres rôles biologiques de la céruloplasmine .....                       | Page 77 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation de l'oxyde nitrique .....           | Page 77 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation des amines biogènes .....           | Page 77 |
| - Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation des lipides sanguins .....          | Page 78 |
| - Fonctions antioxydantes de la céruloplasmine .....                             | Page 78 |

|  |         |
|--|---------|
| CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE ..... | Page 79 |
|--|---------|

|  |         |
|--|---------|
| <u>SECTION 1</u> : SYNTHÈSE DES CAS CLINIQUES D'ACERULOPLASMINEMIE<br>HEREDITAIRE PRESENTS DANS LA LITTÉRATURE ..... | Page 80 |
|--|---------|

|   |         |
|---|---------|
| <u>SECTION 2</u> : CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MODÈLE DE RATS<br>ACERULOPLASMINÉMIQUES, ET EXPLORATIONS DES MÉCANISMES À L'ORIGINE<br>DU PHÉNOTYPE HÉPATOSPLÉNIQUE EXISTANT DANS<br>L'ACERULOPLASMINEMIE ..... | Page 95 |
|---|---------|

|  |                 |
|--|-----------------|
| <i>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</i> .....   | <i>Page 114</i> |
| <i>A. Capacité du modèle de rats à reproduire le phénotype acéruoplasminémique humain</i> .....                    | <i>Page 114</i> |
| <i>B. Intérêt du modèle de rats en comparaison aux modèles de souris existants</i> .....                           | <i>Page 115</i> |
| <i>C. Rôle d'une hepcidino-déficience dans l'acéruoplasminémie</i> .....   | <i>Page 118</i> |
| <i>D. Rôle des principaux transporteurs du fer et de l'hephaestine dans le phénotype acéruoplasminémique</i> ..... | <i>Page 121</i> |
| <i>E. Impact de l'acéruoplasminémie sur les métaux non-ferreux</i> .....   | <i>Page 123</i> |
| <i>F. Conclusion et perspectives</i> .....   | <i>Page 127</i> |
| <br>   |                 |
| <i>BIBLIOGRAPHIE</i> .....   | <i>Page 130</i> |

## TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

|   |         |
|---|---------|
| <u>Figure 1</u> : Schéma simplifié de la circulation du fer dans le système porte.....  | Page 13 |
| <u>Figure 2</u> : Représentation de l'absorption entérocytaire du fer héminique et non-héminique.....   | Page 17 |
| <u>Figure 3</u> : Représentation du cycle de captation et de recyclage du complexe fer-transferrine.....  | Page 21 |
| <u>Figure 4</u> : Représentation des processus de chaperonnage, de stockage, et de captation mitochondriale du fer intracellulaire.....   | Page 27 |
| <u>Figure 5</u> : Représentation des processus de formation des clusters fer-soufre dans la matrice mitochondriale.....   | Page 30 |
| <u>Figure 6</u> : Représentation du processus de synthèse de l'hème dans la matrice mitochondriale et le cytosol.....   | Page 32 |
| <u>Figure 7</u> : Représentation du processus d'érythrophagocytose, et de recyclage de l'hémoglobine et de l'hème au sein des macrophages, en vue de la réintroduction du fer recyclé dans la circulation sanguine..... | Page 36 |
| <u>Figure 8</u> : Représentation des voies de transduction à l'origine de la régulation transcriptionnelle de l'hépcidine.....  | Page 43 |
| <u>Figure 9</u> : Représentation des voies de régulation intracellulaires des protéines du métabolisme du fer.....  | Page 47 |
| <u>Tableau 1</u> : Synthèse des caractéristiques phénotypiques des principaux modèles de souris acéruoplasminémiques.....   | Page 58 |
| <u>Figure 10</u> : Représentation des enchaînements intron/exon du gène codant de la céruloplasmine humaine.....  | Page 60 |
| <u>Figure 11</u> : Représentation des voies de régulation du gène de la céruloplasmine.....   | Page 63 |
| <u>Figure 12</u> : Représentation de la structuration en fragments protéolytiques et en domaines de la protéine céruloplasmine.....   | Page 65 |
| <u>Figure 13</u> : Représentation de la structure primaire de la protéine céruloplasmine, accompagnée de certains éléments de sa structure secondaire et des cations de cuivre.....                                     | Page 67 |
| <u>Figure 14</u> : Représentation schématique de la structure tertiaire de la céruloplasmine et de la position des cations métalliques intégrés à la protéine.....  | Page 70 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

Å : Angström

ABCB : ATP Binding Cassette subfamily B

ALA : 5'-aminolevulinate

ALAD : Aminolevulinate Dehydratase

ALAS : 5'-aminolevulinate synthase

AP-1 : Activator Protein 1

ATOX1 : Antioxidant 1 copper chaperone

ATP7A : Copper transporting ATPase 1

ATP7B : Copper transporting ATPase 2

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BMPR : Bone Morphogenetic Protein Receptor

BMP-RE : Bone Morphogenetic Protein Responsive Element

Ca : Calcium

CD : Cluster of Differentiation

C/EBP : CCAAT-Enhancer-Binding Proteins

Co : Cobalt

CPOX : Coproporphyrinogen Oxidase

CTR1 : Copper Transporter 1

Cu : Cuivre

Dcytb : Duodenal cytochrome b

DMT1 : Divalent Metal Transporter 1

EGFR : Epidemial Growth Factor Receptor

EPO : Erythropoïétine

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

Fe : Fer

FIH1 : Factor Inhibiting Hypoxia-inducible factor 1

FLVCR : Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor-related

FOXO1 : Forkhead box protein O1

GAS6 : Growth Arrest Specific 6

GDF15 : Growth Differentiation Factor 15

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

H : Hydrogène  
*HAMP* : Hepcidin Antimicrobial Peptide  
HCP1 : Haem Carrier Protein 1  
HIF : Hypoxia Inductible Factor  
HJV : Hemojuvelin BMP co-receptor  
HMBS : Hydroxymethylbilane Synthase  
HNO<sub>2</sub> : Acide nitreux  
HOIL-1 : Heme-Oxidized IRP-2 ubiquitin Ligase 1  
HO : Hème Oxygénase  
HRG1 : Heme Responsive Gene 1  
HSC20 : HscB Iron-Sulfur Cluster Cochaperone  
HSPA9 : Heat Shock Protein family A member 9  
IFN- $\gamma$  : Interferon gamma  
I $\kappa$ B $\alpha$  : NF- $\kappa$ B inhibitor alpha  
IL : Interleukine  
IRE : Iron Responsive Element  
IRP : Iron Regulatory Protein  
ISCA : Iron-Sulfur Cluster Assembly  
ISCU : Iron-Sulfur Cluster assembly enzyme  
ISD11 : Iron-Sulfur protein biogenesis Desulfurase-interacting protein  
JAK2 : Janus Kinase 2  
JNK1 : c-Jun N-terminal Kinase 1  
kb : Kilobase  
kDa : Kilodalton  
K<sub>m</sub> : Constante de Michaelis  
LDL : Low Density Lipoprotéin  
LPR : LDL related Protein Receptor  
M : Molaire  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
Mfrn : Mitoferrine  
Na<sup>+</sup> : Sodium  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-kappa B  
NFS1 : Cysteine desulfurase

Nramp1 : Natural resistance-associated macrophage protein 1  
NTBI : Non-Transferrin Bound Iron  
NO : Oxyde nitrique  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrite  
pb : Paire de base  
PCBP : Poly(rC)-Binding Protein  
pH : Potentiel hydrogène  
PPOX : Protoporphyrinogen Oxidase  
SIRP $\alpha$  : Signal Regulatory Protein alpha  
SLC : Solute Carrier  
SMAD : Mothers Against Decapentaplegic homolog  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription  
STEAP : Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate  
TfR : Transferrin Receptor  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor bêta  
TMEM14C : Transmembrane protein 14C  
TSP-1 : Thrombospondine 1  
TWSG1 : Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1  
 $\mu$ M : Micromolaire  
UROD : Uroporphyrinogen Decarboxylase  
UROS : Uroporphyrinogen III Synthase  
VHL : Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor  
V<sub>max</sub> : Vitesse initiale maximale  
ZIP14 : Zrt- and Irt-like Protein 14



## INTRODUCTION GENERALE

Le fer, comme de nombreux autres éléments, est indispensable à la vie. Initialement absorbé par l'alimentation, il joue un rôle, une fois présent dans l'organisme, dans un nombre important de métabolismes et de fonctions cellulaires. Ainsi, un déficit en fer entrave le bon fonctionnement de l'organisme et peut mener à des situations pathologiques sévères. A l'inverse, un excès de fer peut également conduire à des conséquences délétères pour les organes, jusqu'à mener, au terme de certaines conditions pathologiques, au décès du sujet. De ce fait, une régulation constante et affinée du métabolisme du fer est nécessaire au fonctionnement normal de l'organisme, et par conséquent, à la santé du sujet.

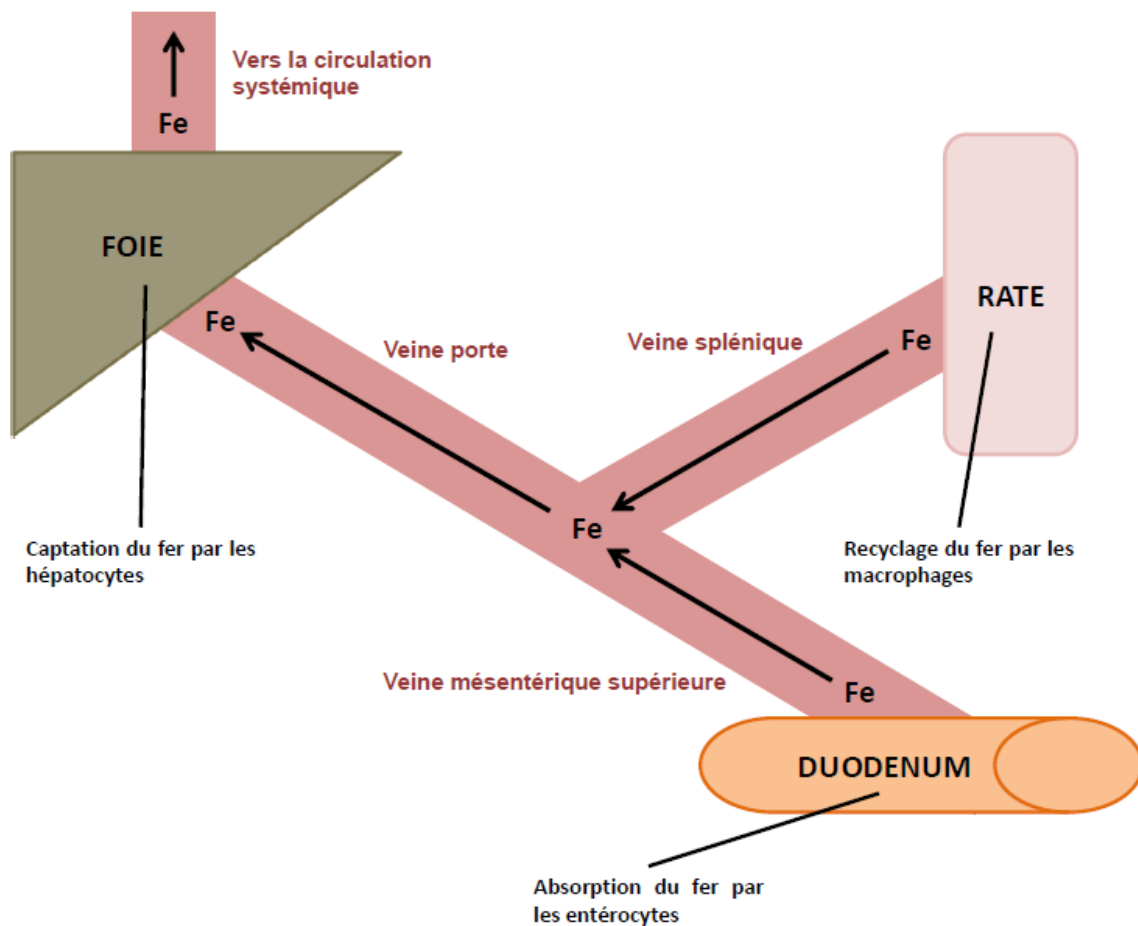
Parmi les nombreuses protéines entrant en jeu dans cette homéostasie du fer, la céruloplasmine joue un rôle important. Ainsi, l'absence de cette protéine est la cause d'une pathologie rare d'origine génétique, l'acéruloplasminémie héréditaire. Cette pathologie donne lieu à d'importantes dysfonctions du métabolisme du fer, conduisant à de graves complications pour le sujet. Ces constatations soutiennent le rôle majeur de la céruloplasmine dans le contrôle du métabolisme du fer. Malgré de nombreuses études visant à élucider le rôle de la céruloplasmine, les caractéristiques biologiques liées à son absence laissent à penser que sa fonction au sein du métabolisme du fer pourrait être incomplètement comprise à ce jour.

Ainsi, la revue de littérature qui va suivre aura pour objectif de décrire le fonctionnement du métabolisme du fer, puis de décrire l'acéruloplasminémie héréditaire en la replaçant dans le contexte plus large des pathologies génétiques de surcharge en fer, avant d'aborder finalement la présentation de la céruloplasmine, au travers d'une description de son gène codant, de la protéine, de son activité enzymatique, et enfin de ses rôles biologiques connus.

### 1. Le métabolisme du fer

L'homéostasie globale du métabolisme du fer repose en partie sur l'équilibre entre les apports et les pertes en fer de l'organisme <sup>1,2</sup>. Le fonctionnement de ce dernier nécessite que 20 milligrammes de fer soient apportés chaque jours aux cellules <sup>2</sup>. Les apports alimentaires quotidiens représentent environ 10 à 20 milligrammes de fer, dont seulement 1 à 2 milligrammes sont absorbés par la muqueuse intestinale <sup>2</sup>. Par ailleurs, le recyclage des érythrocytes sénescents par les macrophages, notamment de la rate, fourni chaque jour

environ 20 milligrammes de fer bio-disponible pour l'organisme <sup>2</sup>. En contrepartie, les pertes quotidiennes incompressibles en fer de l'organisme représentent environ 1 à 2 milligrammes, que vont compenser les apports extérieurs <sup>2</sup>. Les pertes ont principalement lieu *via* la desquamation cellulaire, en particulier issue de la muqueuse intestinale et de la peau, les pertes sanguines, les pertes biliaires, et dans une moindre mesure, les pertes urinaires <sup>2,3</sup>. Par ailleurs, le métabolisme du fer est maintenu à l'équilibre par divers mécanismes de régulation, systémiques et cellulaires, agissant au niveau du stockage du fer, de son recyclage macrophagique, et de son absorption intestinale qui par ailleurs constitue la seule source extérieure de fer pour l'organisme <sup>2</sup>. La circulation du fer dans le système porte suite à son absorption et son recyclage est représentée de manière simplifiée (*Figure 1*) <sup>4</sup>.



*Figure 1 : Schéma simplifié de la circulation du fer dans le système porte*

Le fer est absorbé au niveau des entérocytes du duodénum, puis passe dans la circulation veineuse mésentérique supérieure, avant de rejoindre la veine porte pour y être capté par les hépatocytes <sup>2,4</sup>. Le fer libéré dans la circulation veineuse splénique après son recyclage par les macrophages de la rate, rejoint également la veine porte <sup>2,4</sup>.

### 1.1. Absorption intestinale du fer

Le fer est absorbé au niveau intestinal dans le duodénum <sup>2</sup>. Les principales sources de fer présentes dans l'alimentation humaine proviennent d'une part des viandes, fournissant du fer héminique, tandis que le fer non-héminique est majoritairement présent dans les céréales et les légumineuses ; certains micronutriments tels que la vitamine C, semblent pouvoir accroître l'absorption du fer alimentaire <sup>2,5</sup>. Afin de ne pas précipiter dans la lumière intestinale et de pouvoir être absorbé, le fer non-héminique sous forme ferrique subira au préalable, une phase de solubilisation dans l'estomac, grâce au potentiel hydrogène (pH) acide de ce dernier <sup>6,7</sup>. Les deux principales formes de fer, héminique et non-héminique, empruntent des voies différentes au cours de leur absorption (*Figure 2*) <sup>7</sup>.

#### 1.1.1. Absorption du fer non-héminique luminal

##### *- Etape de réduction du fer*

Une étape de réduction du fer (Fe)<sup>3+</sup> présent dans la lumière duodénale, est nécessaire préalablement à son absorption par la muqueuse du duodénum, au niveau du pôle apical des entérocytes <sup>8,9</sup>. Il est admis que ce rôle est assuré par Duodenal cytochrome b (Dcytb), une enzyme réductase ayant été identifiée au niveau des microvillosités duodénales, sur la membrane apicale des entérocytes <sup>2,10,11</sup>. L'ascorbate a de plus été décrit comme étant un substrat donneur d'électrons majeur utilisé par Dcytb pour la réduction de Fe<sup>3+</sup> <sup>8,12,13</sup>. Ce transfert d'électron semble par ailleurs provenir de l'ascorbate intracellulaire, à destination du fer extracellulaire <sup>12,13</sup>. Il a cependant été rapporté que l'absence de Dcytb n'induisait aucun signe de carence en fer, laissant ainsi supposer que la présence de cette enzyme n'est pas indispensable à la réduction du fer ferrique alimentaire présent au niveau duodéal <sup>13,14</sup>.

##### *- Etape d'absorption du fer*

L'absorption entérocytaire du fer réduit sous sa forme Fe<sup>2+</sup> est réalisée par la protéine Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), un transporteur décrit comme pouvant prendre en charge une variété de cations divalents, dont le fer ferreux, qui a la plus forte affinité <sup>15,16</sup>. A

ce titre, DMT1 semble exercer un transport médié par gradient électrochimique de protons hydrogènes (H)<sup>+</sup> <sup>15,17</sup>. La nécessité de DMT1 dans l'absorption entérocytaire du fer non héminique a par ailleurs été rapportée, l'absence de ce transporteur donnant lieu à des signes de carence sévère en fer, se traduisant notamment par une anémie, cette dernière étant par ailleurs également liée au fait que DMT1 joue un rôle dans les cellules érythroïdes <sup>18-20</sup>.

### 1.1.2. Absorption du fer héminique luminal

#### *- Absorption du fer héminique par transport transmembranaire*

L'import du fer héminique luminal vers le cytosol entérocytaire peut être réalisé par transport transmembranaire, et semble à ce titre pouvoir être assuré par la protéine Haem Carrier Protein 1 (HCP1), exprimée au niveau de la membrane apicale des entérocytes ; le rôle de cette protéine est cependant contesté <sup>21-24</sup>. Faisant suite à l'absorption de la molécule d'hème, cette dernière est dégradée par l'enzyme Hème Oxygénase (HO)-1 ; cette dernière serait potentiellement enchâssée à la membrane du réticulum endoplasmique, avec son site actif présent du côté cytosolique de la membrane, et libérerait ainsi le cation Fe<sup>2+</sup> contenu par l'hème, dans le cytosol de l'entérocyte <sup>24-27</sup>. L'enzyme HO-1 verrait son expression modulée par la présence d'hème, notamment au pôle apical de l'entérocyte <sup>25,26</sup>.

#### *- Absorption du fer héminique par endocytose*

Certaines données suggèrent que le fer héminique puisse également être absorbé par endocytose au sein des entérocytes, probablement suite à la fixation de l'hème à un récepteur situé sur la membrane plasmique <sup>28-30</sup>. A la différence du fer héminique passant directement dans le cytosol par transport transmembranaire, la molécule d'hème internalisée par endocytose semble être dégradée au sein de l'endosome par l'enzyme HO-2 <sup>29</sup>. La libération du fer inorganique de l'endosome vers le cytosol ne semble pas assurée par la protéine DMT1, suggérant ainsi l'intervention d'un autre transporteur <sup>29</sup>.

### 1.1.3. Export du fer entérocytaire

#### *- Export du fer par la ferroportine*

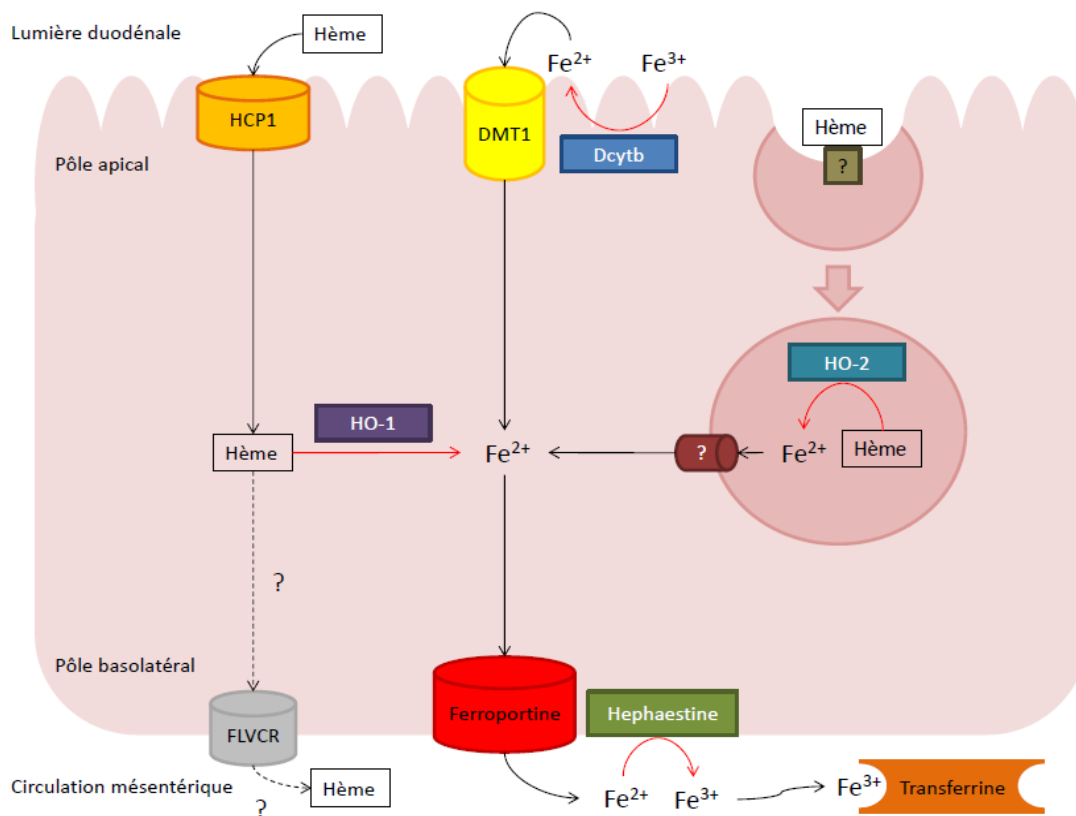
L'export du fer  $Fe^{2+}$  contenu dans le cytosol entérocytaire a lieu grâce à la ferroportine, une protéine membranaire réalisant un rôle de transporteur au niveau du pôle basolatéral de l'entérocyte, en opérant le passage de  $Fe^{2+}$  vers le sang veineux mésentérique<sup>31,32</sup>. La ferroportine est considérée comme essentielle à la libération du fer entérocytaire en direction du sang, au regard des données récoltées chez l'animal<sup>33</sup>. Cependant chez l'Homme, des mutations hétérozygotes du gène de la ferroportine, dans le cas de la maladie de la ferroportine à transmission dominante, ne semblent pas donner lieu à une accumulation de fer non-hémique dans l'entérocyte<sup>34</sup>. En outre selon certaines données, le fer contenu dans l'entérocyte pourrait être exporté directement à l'état de fer-hémique par la protéine Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor-related (FLVCR), un transporteur exportant l'hème intracellulaire, et dont l'expression a été détectée de manière importante dans des cellules intestinales humaines<sup>35</sup>.

#### *- Le bloc muqueux*

La seconde phase de l'absorption du fer est donc sa sortie de l'entérocyte au niveau du pôle basolatéral, en direction du plasma<sup>7</sup>. Cependant, lorsqu'une certaine quantité de fer a déjà été absorbée, les atomes de fer restant dans les entérocytes ne sont pas exportés et restent bloqués dans ces cellules<sup>36,37</sup>. Ce phénomène a lieu sous l'effet de l'hepcidine, un peptide hyposidérémiant bloquant notamment la sortie du fer entérocytaire vers le plasma, et dont la fonction sera détaillée dans les chapitres suivants (*partie 1.5.1., pages 37 et 38*)<sup>38</sup>. Le fer resté dans l'entérocyte est alors séquestré par la ferritine, la molécule de stockage du fer<sup>36,37</sup>. Ce phénomène d'immobilisation du fer dans l'entérocyte en réaction à l'absorption préalable d'une certaine quantité de fer, répond couramment à l'appellation de « bloc muqueux »<sup>36,37,39</sup>. La desquamation régulière des entérocytes permet de suggérer que, potentiellement, le fer séquestré au sein de ces cellules ne sera finalement pas absorbé par l'organisme<sup>2,3</sup>. Les détails relatifs au stockage du fer dans la ferritine seront présentés dans les chapitres suivants (*partie 1.3.2., pages 25 et 26*).

#### *- Oxydation du fer ferreux par l'héphaestine*

Conjointement à la sortie du fer *via* la ferroportine, l'oxydation de ce dernier a lieu par le biais de l'héphaestine, une enzyme possédant une activité ferroxidase, et appartenant à la famille des « multicopper oxidases »<sup>40-42</sup>. L'héphaestine est présente au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes, et semble localisée à proximité de la ferroportine, suggérant une activité étroitement liée entre ces deux protéines lors de la sortie du fer entérocytaire<sup>43</sup>. Par ailleurs, le rôle de la céruloplasmine, une ferroxidase circulante, également de type « multicopper oxidase », a aussi été évoqué dans la sortie du fer entérocytaire<sup>44-46</sup>. Il apparaît en effet qu'en conditions de carences en fer, la céruloplasmine puisse jouer un rôle complémentaire vis-à-vis de l'héphaestine lors du processus d'oxydation du fer, au sortir des entérocytes<sup>46,47</sup>. Les caractéristiques et fonctions connues de la céruloplasmine seront détaillées dans les chapitres à venir (*partie 3., pages 59 à 78*).



**Figure 2 :** Représentation de l'absorption entérocytaire du fer hémique et non-hémique.

Le fer ferrique luminal est réduit par Dcytb, puis absorbé au pôle apical par le transporteur DMT1<sup>2,10,11,15,16</sup>. Le fer hémique est absorbé au pôle apical par le transporteur HCP1, puis dégradé dans le cytosol par HO-1, libérant ainsi du fer ferreux<sup>21-27</sup>. Par ailleurs, le fer hémique est également absorbé par endocytose, puis dégradé par HO-2, libérant ainsi du fer ferreux dans l'endosome ; le fer ferreux endosomal est ensuite exporté dans le cytosol<sup>28-30</sup>. Le fer ferreux présent dans le cytosol est par la suite exporté dans la circulation veineuse mésentérique, au pôle basolatéral de l'entérocyte, grâce à la ferroportine<sup>31,32</sup>. L'héphaestine oxyde le fer venant d'être exporté, lui permettant de se fixer à la transferrine, la protéine de transport plasmatique du fer<sup>40-43,48</sup>. Par ailleurs, l'hème cytosolique non-dégradée pourrait être directement exportée dans le plasma grâce au transporteur FLVCR<sup>35</sup>.

## 1.2. Transport plasmatique et captation cellulaire du fer

Le fer plasmatique est principalement présent sous forme de fer lié à la transferrine, la forme de fer permettant la délivrance de ce métal aux cellules de l'organisme <sup>48</sup>. La captation de ce fer a lieu dans divers types cellulaires ; cependant, les cellules erythroïdes restent les plus grandes consommatrices de fer au sein de l'organisme <sup>48</sup>.

### 1.2.1. Transport plasmatique du fer lié à la transferrine

#### *- La transferrine*

La transferrine est une glycoprotéine plasmatique  $\beta_1$ -globuline, d'un poids moléculaire d'environ 76 kilodaltons (kDa) <sup>49-51</sup>. La protéine semble majoritairement exprimée et sécrétée par les hépatocytes, bien que d'autres types cellulaires tels que les cellules de Sertoli, les épendymocytes et les oligodendrocytes semblent l'exprimer également <sup>51-56</sup>. La transferrine peut être retrouvée majoritairement dans le sérum, mais aussi dans la bile, la lymphe, le lait maternel, le liquide amniotique, céphalo-rachidien, et synovial <sup>56-60</sup>. Dans le sérum, la transferrine est présente à une concentration située entre 2 et 4 grammes par litre <sup>51,61</sup>. Formée de 679 acides aminés, cette glycoprotéine comprend notamment deux sites de N-glycosylation en N413 et N611, ainsi que 19 ponts disulfures stabilisant sa structure secondaire <sup>49,56,62</sup>. La transferrine est par ailleurs composée de deux lobes, un lobe N et un lobe C, d'environ 330 acides aminés chacun <sup>56,62</sup>. Sur chacun des deux lobes, deux domaines sont présents et forment deux à deux un site à même de fixer les ions métalliques ; de sorte que la protéine comporte au total deux sites de fixation des atomes de fer ferrique <sup>51,62</sup>.

#### *- Formation du complexe fer-transferrine*

Sur chacun des lobes de la protéine, quatre résidus présents sur le site de fixation des ions métalliques se lient directement à l'atome de fer ; il s'agit des résidus D63, Y95, Y188, H249 pour le lobe N, et des résidus D392, Y426, Y517, et H585 pour le lobe C <sup>56,62,63</sup>. La stabilité de la liaison de ces sites aux atomes de fer semble assurée par les résidus environnants ; à ce titre notamment, K206 et K296, situés sur des domaines opposés sur le

lobe N, sont reliés par une liaison hydrogène lorsqu'un cation de fer ferrique est présent sur le site de fixation, ceci permettant le maintien du cation sur le site <sup>64,65</sup>. Ainsi, parvenu dans le sang à l'état  $Fe^{3+}$ , le fer se fixe à la transferrine pour former un complexe stable à raison d'un maximum de deux atomes de fer par molécule de transferrine <sup>50,51,66</sup>. La transferrine disposant ainsi de deux sites de fixation du fer, quatre états différents sont possibles pour cette molécule : un état insaturé, deux types d'états de semi-saturation dû à la fixation d'un cation  $Fe^{3+}$  au premier ou au deuxième site de fixation sur la protéine, et enfin, un état de saturation complète caractérisé par la fixation d'un cation ferrique à chacun des deux sites de fixation présents sur la transferrine <sup>67,68</sup>. Le pourcentage de sites de fixation de la transferrine occupés par un atome de fer constitue un paramètre majeur correspondant au fer biodisponible, et appelé saturation de la transferrine ; cette dernière correspond en effet au ratio entre les sites de fixation de la transferrine occupés par un atome de fer et le nombre total de sites qu'elle comporte, exprimé en pourcentage <sup>69,70</sup>. La saturation de la transferrine est donc fonction de la concentration plasmatique en fer et en transferrine <sup>69,70</sup>. Il est rapporté que la transferrine a, en conditions physiologiques, une saturation comprise entre 20 et 45%, une saturation inférieure à 20 % correspondant à une déficience en fer, et une saturation supérieure à 45 % signifiant une présence excessive de fer dans le plasma, sous réserve que la concentration plasmatique en transferrine soit normale <sup>69,71</sup>. Une hausse de la saturation de la transferrine au-delà de 45 % est par ailleurs susceptible de mener à la formation massive de Non-Transferrin Bound Iron (NTBI) dans le plasma, une forme pathologique de fer correspondant à la liaison de ce dernier à des molécules de bas poids moléculaire, et responsable de la survenue de surcharges tissulaires en fer dans certaines pathologies <sup>72,73</sup>.

### 1.2.2. Captation cellulaire du fer plasmatique

#### *- Le récepteur à la transferrine*

La captation du fer par les cellules est initiée, en conditions normales, par la fixation de l'holotransferrine au récepteur Transferrin Receptor (TfR)1, une protéine membranaire homodimère <sup>51,74-76</sup>. Chacune des sous unités de cette protéine est composée de 760 acides aminés, pour un poids moléculaire d'environ 90 kDa par sous-unité <sup>76-78</sup>. Ces dernières sont reliées l'une à l'autre par deux ponts disulfures, dont les résidus d'attache sont les acides aminés C89 et C98 <sup>79,80</sup>. Par ailleurs, chaque sous-unité comprend trois domaines ; un

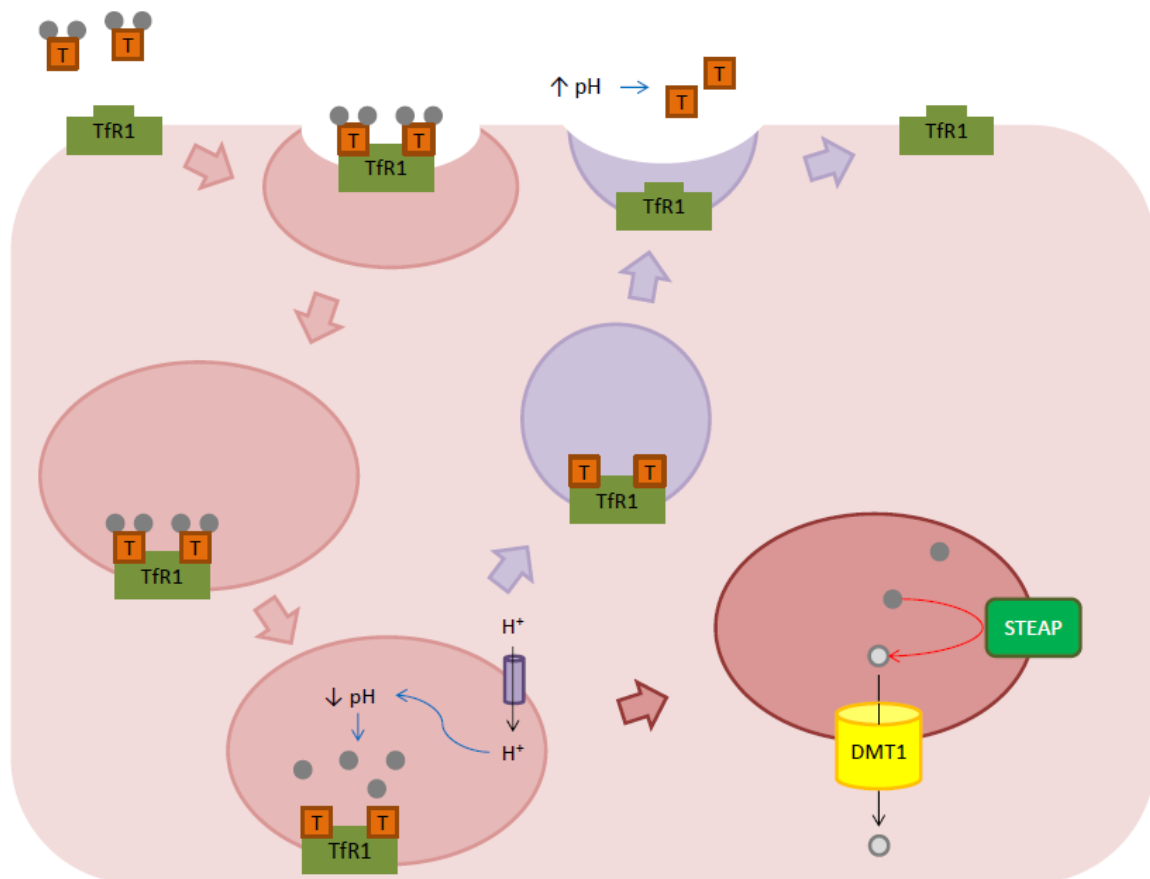


domaine intracellulaire comprenant 61 acides aminés, situé du côté de l'extrémité N-terminale de la protéine, un domaine transmembranaire de 28 acides aminés, et un domaine extracellulaire de 671 acides aminés situé du côté de l'extrémité C-terminale de la protéine<sup>75,76,78</sup>. Ce dernier domaine est glycosylé en N sur les résidus N251, N317, et N727, ainsi qu'en O sur T104<sup>77,81,82</sup>. Ces glycosylations semblent nécessaires à l'affinité de TfR1 pour la transferrine, et sont de ce fait indispensables à la fonction du récepteur<sup>83</sup>. Certaines données tendent cependant à montrer que parmi les N-glycosylations, seule celle de N317 aurait un rôle déterminant dans l'interaction entre la transferrine et TfR1<sup>82</sup>. De plus, T104 joue un rôle dans la stabilité du récepteur, en le prémunissant contre le clivage protéolytique<sup>84,85</sup>. Chaque sous unité semble pouvoir fixer une molécule de transferrine au niveau de son domaine extracellulaire ; l'intégrité des 192 dernier acides aminés de l'extrémité C-terminale semble par ailleurs indispensable à l'affinité du site de fixation du récepteur pour la molécule de transferrine<sup>80,86,87</sup>.

#### - Mécanisme de captation cellulaire du fer par le biais de TfR1

Une fois parvenue à la membrane des cellules, la transferrine liée au fer, dite holotransferrine, se fixe au récepteur TfR1 ; le complexe formé est alors internalisé par endocytose (*Figure 3*)<sup>51,74</sup>. Par la suite, sous l'effet de la baisse du pH au sein de l'endosome précoce grâce à l'action de pompes à protons H<sup>+</sup> ATPase, présentes sur la membrane de l'endosome et faisant pénétrer les protons dans ce dernier, la transferrine libère le fer qui lui était lié<sup>51,74,78,88,89</sup>. Le devenir de la transferrine et de son récepteur semble médié par la dissociation, à partir de l'endosome précoce, d'un endosome de recyclage sur la membrane duquel seraient localisées les deux protéines toujours liées<sup>51,90,91</sup>. Le recyclage de TfR1 ainsi que la libération par exocytose de la transferrine insaturée, dite apotransferrine, auraient alors lieu lorsque l'endosome de recyclage regagne la membrane plasmique, le retour à un pH neutre permettant en effet la baisse d'affinité de TfR1 pour la transferrine et la libération de cette dernière hors de la cellule<sup>51,74,78,90</sup>. La maturation de l'endosome précoce en endosome tardif permettrait ensuite la libération du fer dans le cytosol par le biais du transporteur DMT1, localisé sur la membrane de l'endosome tardif<sup>92</sup>. La réduction de Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> nécessairement préalable à l'export du fer par DMT1, semble avoir lieu par l'intermédiaire d'une enzyme réductase au sein même de l'endosome<sup>51,93,94</sup>. Une implication des protéines Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate (STEAP) en tant que ferriréductases

est évoquée, avec des prédominances selon les types cellulaires ; ce rôle est notamment avancé concernant STEAP2, dont l'expression est majoritairement détectée dans les tissus prostatiques, cérébraux et pancréatiques <sup>95</sup>. De même, au sein des cellules erythroïdes, cette réduction du fer endosomal préalable à sa sortie de la vésicule par DMT1, semble être assuré par la protéine STEAP3 <sup>96</sup>.



*Figure 3 : Représentation du cycle de captation et de recyclage du complexe fer-transferrine.*

La transferrine liée au fer se fixe au récepteur Tfr1 ; le complexe formé par la transferrine et son récepteur est internalisé par endocytose <sup>51,74</sup>. Au sein de l'endosome précoce, la baisse du pH provoquée par l'entrée de protons  $H^+$  donne lieu à une dissociation du fer et de la transferrine <sup>51,74,78,88,89</sup>. Un endosome de recyclage se forme à partir de l'endosome précoce ; cet endosome de recyclage contenant le complexe formé par la transferrine et Tfr1, regagne la membrane plasmique et libère le complexe par exocytose ; Tfr1 reste positionné sur la membrane plasmique, tandis que sous l'effet du pH extracellulaire, la transferrine se dissocie de Tfr1 <sup>51,74,78,90,91</sup>. Par ailleurs, suite à la maturation de l'endosome précoce en endosome tardif, les atomes de fer ferriques contenus dans ce dernier sont réduits en fer ferreux par une réductase de la famille des STEAP, puis exportés dans le cytosol par le transporteur DMT1 présent sur la membrane de l'endosome <sup>51,92-96</sup>.

**T : Transferrine**

- Rôle secondaire du récepteur Tfr2

Le récepteur TfR2 est surtout décrit pour son rôle dans la régulation hepcidino-dépendante du métabolisme du fer, comme détaillé dans les chapitres suivants (*partie 1.5.2., pages 38 et 39*)<sup>97</sup>. Cependant, ce récepteur semble également avoir un rôle dans l'absorption du fer par les cellules<sup>51,98</sup>. L'affinité de TfR2 pour l'holotransferrine est en revanche décrite comme étant environ vingt-cinq fois moindre que celle de TfR1, indiquant que ce dernier reste le principal récepteur à la transferrine impliqué dans la captation cellulaire du fer<sup>51,99</sup>. Le récepteur TfR2 comprend deux isoformes, l'isoforme TfR2- $\alpha$  ainsi que l'isoforme TfR2- $\beta$  résultant d'un épissage alternatif et dont la longueur est réduite du fait que son transcrit ne possède pas les trois premiers exons de TfR2- $\alpha$  ; le premier exon du transcrit de TfR2- $\beta$ , correspondant à l'exon 4 de TfR2- $\alpha$ , possède par ailleurs 142 paires de bases additionnelles<sup>98,100</sup>. TfR2- $\alpha$  présente une structure primaire proche de celle de TfR1 ; notamment, le domaine extracellulaire de TfR2- $\alpha$  est décrit comme étant homologue à celui de TfR1 à hauteur de 45 à 60 pourcent<sup>51,98</sup>. La protéine TfR2- $\alpha$  possède comme TfR1 une structuration en trois domaines, un domaine cytosolique comprenant les acides aminés 1 à 80, un domaine transmembranaire formé par les acides aminés 81 à 104, ainsi que les résidus 105 à 801 composant le domaine extracellulaire<sup>98,100</sup>. La présence probable de ponts dissulfures ancrés aux acides aminés C108 et C111 de TfR2- $\alpha$ , suggère une protéine formée d'homodimères dans sa structure quaternaire, au même titre que TfR1<sup>98,101</sup>. Néanmoins, ne possédant pas de domaine transmembranaire du fait de ses exons manquants, TfR2- $\beta$  semble être de localisation strictement intracellulaire, laissant ainsi des doutes quant à sa fonction dans l'absorption du fer<sup>98,100</sup>. En outre, l'expression des isoformes de TfR2 ne semble pas ubiquitaire ; leurs transcrits apparaissent en effet comme exprimés uniquement dans certains types cellulaires, ces derniers correspondant majoritairement aux hépatocytes et aux précurseurs érythropoïétiques pour l'isoforme TfR2- $\alpha$ , tandis que TfR2- $\beta$  semble néanmoins exprimé dans une plus grande variété de types cellulaires<sup>51,98,102</sup>.

### 1.3. Devenir du fer cellulaire

Le devenir du fer dans la cellule (*Figure 4*) comprends en grande partie le stockage du fer, son utilisation mitochondriale pour la formation des clusters fer-soufre, ainsi que l'utilisation du fer pour la synthèse de l'hème, ayant notamment lieu dans les cellules érythroïdes de la moëlle osseuse, pour la formation des molécules d'hémoglobine lors de

l'érythropoïèse <sup>103,104</sup>. Le fer s'associe par ailleurs à d'autres protéines exerçant des fonctions dans différents métabolismes <sup>105</sup>.

### 1.3.1. Les états du fer cytosolique

#### *- Le pool labile de fer*

Le fer nouvellement libéré dans le cytosol est à l'état libre, et répond à l'appellation courante de « pool cellulaire labile de fer » <sup>106-108</sup>. Ce dernier se caractérise par deux principales propriétés, que sont d'une part son accessibilité à la chélation, et d'autre part sa potentielle activité oxydante au sein de la cellule <sup>107-109</sup>. Cette activité oxydante a notamment lieu à travers la réaction de Fenton, qui consiste en la formation de fer ferrique, d'hydroxyde, et de radical hydroxyle, à partir de fer ferreux et de peroxyde d'hydrogène, comme illustré par l'équation :  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO\cdot$  <sup>108,110</sup>. Le radical hydroxyle produit par cette réaction comporte par ailleurs un fort potentiel oxydatif, à même d'occasionner des dommages cellulaires, notamment au cours de processus pathologiques impliquant un excès de fer cellulaire <sup>111,112</sup>. Par ailleurs, même si sa nature biochimique exacte reste incertaine, le pool labile de fer semble pouvoir être constitué de fer ferrique ou de fer ferreux <sup>113</sup>. Enfin, il semblerait que le pool labile de fer ne soit pas localisé uniquement dans le cytosol, la présence de fer dans un état semblable ayant en effet été suggérée dans la mitochondrie et le noyau cellulaire <sup>114,115</sup>.

#### *- Chaperonnage du fer cytosolique*

Tout ou partie du fer labile cytosolique est pris en charge par des protéines chaperonnes, ayant pour rôle de se lier aux atomes de fer afin d'assurer leur transport dans le cytosol en vue de leur utilisation dans certains procédés métaboliques ou de leur stockage <sup>116-118</sup>. Les protéines Poly(rC)-Binding Protein (PCBP) jouent un rôle dans le chaperonnage du fer ; plus spécifiquement, il a été démontré que les protéines PCBP1 et PCBP2 étaient impliquées dans la délivrance du fer à la ferritine pour son stockage, et avaient la capacité de se fixer sur la ferritine pour procéder au transfert des atomes de fer <sup>116,117</sup>. PCBP3 possède également ces propriétés, cependant son rôle a lieu dans une moindre mesure, notamment du fait de son niveau d'expression très inférieur à celui de PCBP1 et PCBP2 <sup>117</sup>. La protéine

PCBP4, en revanche, ne semble pas pouvoir interagir avec la ferritine ; le rôle suggéré de cette protéine serait de protéger la cellule des effets de la toxicité du fer en se liant à ce dernier et en le séquestrant <sup>117</sup>. Par ailleurs, le rôle de PCBP1 et PCBP2 ne se limite pas à l'approvisionnement en fer de la ferritine ; les deux protéines semblent en effet responsable de la délivrance du fer à certaines enzymes cytosoliques de nature non-hémiques, telles que la prolyle hydroxylase et la deoxyhypusine, utilisant le fer comme cofacteur pour leurs réactions <sup>118,119</sup>.

### *1.3.2. Stockage du fer cellulaire*

#### *- La ferritine*

La molécule de ferritine assure le stockage des atomes de fer ; cette macromolécule de 24 sous-unités, composée de ferritine H et L, peut en effet intégrer plus de 4000 atomes de fer <sup>120,121</sup>. Considérant les poids moléculaires des ferritines H et L, le poids de la macromolécule de ferritine, variable selon les proportions de ferritine H et L, avoisine les 500 kDa <sup>122,123</sup>. Chaque sous-unité forme une chaîne composée d'une suite de quatre hélices ; l'assemblage de ces sous-unités forme une macroprotéine de forme sphérique et comportant une large cavité propre à stocker les atomes de fer <sup>124</sup>. L'agencement des sous-unités entre elles forme des axes, autour desquels deux, trois, ou quatre sous-unités se regroupent selon une conformation en symétrie centrale, et forment un canal propre à être emprunté par les atomes de fer <sup>124</sup>. Les deux types de sous-unités, H et L, sont présents au sein de la ferritine <sup>120,125</sup>. Ainsi en théorie, la ferritine, en fonction de ses proportions en ferritine H et ferritine L, semble pouvoir exister sous vingt-cinq formes possibles, allant de la forme contenant 24 sous-unité H et aucune sous-unité L, à celle ne contenant aucune sous-unité H et 24 sous-unité L <sup>122,125</sup>. Cependant, il semblerait que la ferritine soit en réalité surtout présente sous forme d'hétéropolymère comportant à la fois des sous-unités H et L, dans des proportions variables <sup>121,122</sup>. Les organes à même de stocker le fer, tels que le foie et la rate, expriment des formes de ferritine plus riches en sous-unité L, tandis qu'à l'inverse, d'autres organes tels que le cœur contiennent des formes de ferritine riches en sous-unité H <sup>122,124,125</sup>.

Les ferritines H et L, sont deux protéines codées par des gènes distincts <sup>124,126</sup>. La ferritine H est une protéine de 21 kDa encodée par un gène localisé sur le chromosome 11, dont la structure secondaire est formée de 4 hélices, nommées hélices « A », « B », « C », et

« D »<sup>121,122,126-128</sup>. La ferritine H oxyde le fer ferreux ; elle contient en effet des sites d'oxydation capable d'oxyder  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  avant son intégration à l'intérieur du complexe macromoléculaire<sup>125,129</sup>. Les sites de fixation du fer présents dans la structure de la ferritine H seraient au nombre de trois, et assureraient une continuité entre l'oxydation du fer et son stockage<sup>127,130</sup>. Les hélices A B et C contiennent en effet chacune un site de liaison au fer, dont certains résidus sont partagés entre ces différents sites<sup>127,131</sup>. Le premier site dit « A » et considéré comme le site d'oxydation du fer, assurerait la fixation de ce dernier au moyen des acides aminés E27, E62, H65, et E107, tandis que cette liaison serait assurée par les résidus E61, E62, et E107 dans le site « B » adjacent au site A ; le site « C » quant à lui, fixerait le fer par liaison aux résidus E61 et E64<sup>127</sup>. D'autres données évoquent davantage la présence de quatre sites de liaison du fer ; un site dit « Fe1 » liant le fer par les résidus E27, E62, et E65, un site « Fe2 » liant le fer par les résidus E62 et E107, un site « Fe3 » liant le fer par Y34, E58, et E61, ainsi qu'un site « Fe4 » liant le fer par H57 et E61<sup>131</sup>. La ferritine L est encodée par un gène distinct de celui de la ferritine H, et localisé sur le chromosome 19<sup>126,128</sup>. La protéine, un peu plus légère que la ferritine H, posséderait un poids moléculaire de 19 kDa<sup>122</sup>. Sa structure primaire est homologue d'environ 53 % à celle de la ferritine H, et possède par ailleurs la même structure secondaire que cette dernière, comportant également quatre hélices A, B, C, et D<sup>132</sup>.

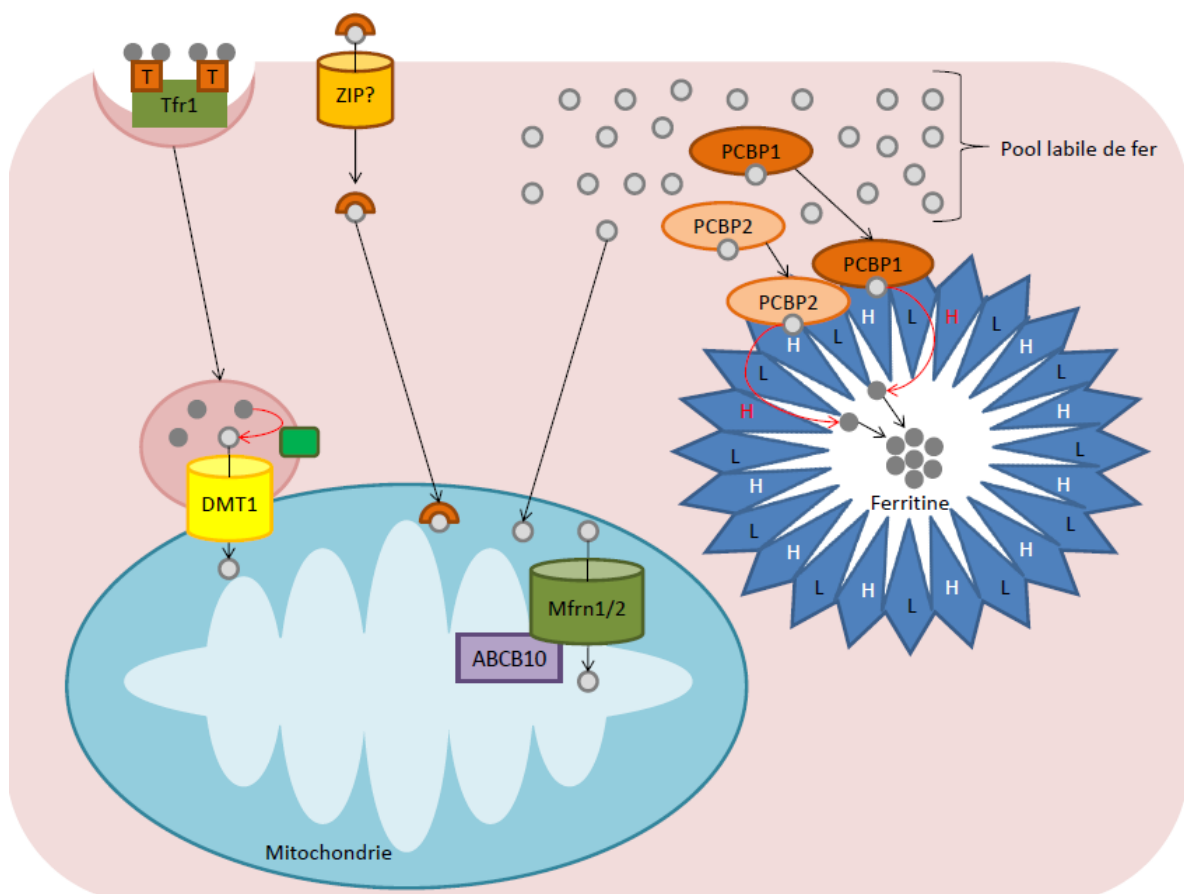
#### *- Processus de stockage du fer dans la ferritine*

Comme décrit un peu plus haut, préalablement à son stockage, le fer labile cytosolique se lie à des protéines chaperonnes, PCBP-1 et PCBP-2, décrites comme nécessaires à l'intégration du fer à la ferritine<sup>116,117</sup>. PCBP-1 et PCBP-2 se lient à la ferritine avec des ratios stoechiométriques respectifs de neuf protéines PCBP-1 chargées en fer et quatre protéines PCBP-2 chargées en fer par macromolécule de ferritine<sup>117</sup>. Par ailleurs, la présence concomitante de ces deux protéines chaperonnes est nécessaire à la formation d'un complexe stable entre chacune d'elles, et la ferritine<sup>117</sup>. La formation de ces liaisons entre les protéines PCBP et la ferritine, initie la délivrance du fer à la ferritine par les protéines PCBP<sup>117</sup>. Suite au passage du fer des protéines chaperonnes à la ferritine, le cation est oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$ , puis migre vers le cœur de la molécule pour y être stocké<sup>120,130</sup>. Plus précisément, il semble que les canaux hydrophiles formés par trois sous-unités de ferritine soient ceux par lesquels le fer pénètre dans la macromolécule, à l'inverse des canaux hydrophobes formés par quatre sous-

unités, servant à la sortie du fer de la ferritine <sup>132</sup>. Par la suite, le site A de la ferritine H oxyde le fer entrant ; ce dernier transite ensuite par le site B de la ferritine H pour finalement atteindre son site C, situé à la surface de la cavité située au cœur de la macromolécule de ferritine <sup>127</sup>. A ce titre, le résidu E61 présent à la fois sur le site B et le site C (soit les sites Fe3 et Fe4 selon une nomenclature alternative) pourrait adopter deux positions différentes ; le passage d'une position à l'autre étant évoqué comme pouvant faciliter le transit du cation de fer oxydé du site B vers le site C <sup>127,131</sup>. Des données plus récentes suggèrent que les sites A, B, et C puissent dans certains cas être occupés simultanément par des cations Fe<sup>2+</sup> <sup>130</sup>. Ce dernier pourrait par ailleurs être oxydé aux sites A et B, mais également au site C *via* le peroxyde d'hydrogène généré par l'oxydation de Fe<sup>2+</sup> aux sites A et B <sup>130</sup>. La migration du Fe<sup>3+</sup> nouvellement formé, en direction du cœur de la macromolécule, aurait alors lieu par le biais de l'arrivée d'un nouveau cation Fe<sup>2+</sup> dans les sites ferroxidases, lequel déplacerait alors Fe<sup>3+</sup> <sup>130</sup>. Une fois dans la cavité centrale de la macromolécule, le fer est fixé, probablement aux groupements carboxylates des résidus glutamates de la ferritine L, et reste stocké dans le cœur de cette dernière sous forme de ferrihydrite <sup>133,134</sup>.

#### - *La ferritine mitochondriale*

Outre la ferritine cytosolique, l'existence d'une forme mitochondriale de ferritine a été rapportée <sup>135</sup>. Cette protéine est encodée par un gène spécifique localisé sur le chromosome 5, et ayant la particularité d'être dépourvu d'introns <sup>135</sup>. Cette forme particulière de ferritine est un homopolymère, ayant une probable activité ferroxidase lui permettant de stocker le fer sous forme Fe<sup>3+</sup>, au même titre que la ferritine H, dont la séquence est fortement homologue à la sienne <sup>135</sup>. La ferritine mitochondriale est transcrite dans le noyau cellulaire, et comporte une extension d'environ 60 acides aminés en comparaison à la ferritine H, au niveau de son extrémité N-terminale, pour une longueur totale de 242 acides aminés <sup>135</sup>. A l'inverse de la ferritine cytosolique, la ferritine mitochondriale ne semble pas exprimée dans les tissus ayant une forte propension à stocker le fer, tels que le foie ou la rate ; elle s'exprime en revanche davantage dans d'autres tissus tels que le cœur, le cerveau, les reins, les îlots de Langerhans, ou encore les spermatozoïdes et les cellules de Leydig <sup>136</sup>. En outre, la ferritine mitochondriale s'exprime également en conditions pathologiques dans certains tissus, comme les cellules érythroïdes des patients atteints d'anémies sidéroblastiques <sup>137</sup>.



*Figure 4 : Représentation des processus de chaperonnage, de stockage, et de captation mitochondriale du fer intracellulaire.*

Les protéines PCBP1 et PCBP2 se lient au fer labile intracellulaire et le délivrent à la ferritine H<sup>116,117</sup>. Cette dernière oxyde le fer, permettant ainsi son passage vers le cœur de la macromolécule de ferritine pour y être stocké<sup>120,130</sup>. Le fer labile intracellulaire peut également être utilisé par la mitochondrie, suite au passage de la membrane externe de cette dernière par potentiel de membrane, puis passage de la membrane interne par import grâce au complexe Mfrn/ABCB10<sup>138,141,143-145</sup>. Le fer passant la membrane externe de la mitochondrie proviendrait également du NTBI plasmatique transitant par le cytosol sans passer à l'état labile, ainsi que du fer internalisé par endocytose via le complexe transferrine/TfR1<sup>139,140</sup>. Le fer internalisé par endocytose passerait la membrane externe de la mitochondrie par un contact entre celle-ci et l'endosome, *via* le transporteur DMT1<sup>142</sup>.  
**T : Transferrine**

Outre le stockage du fer, ce dernier peut être utilisé par la mitochondrie pour différents processus de synthèse.

### 1.3.3. Utilisation du fer cellulaire dans la mitochondrie

- *Import du fer dans la mitochondrie*



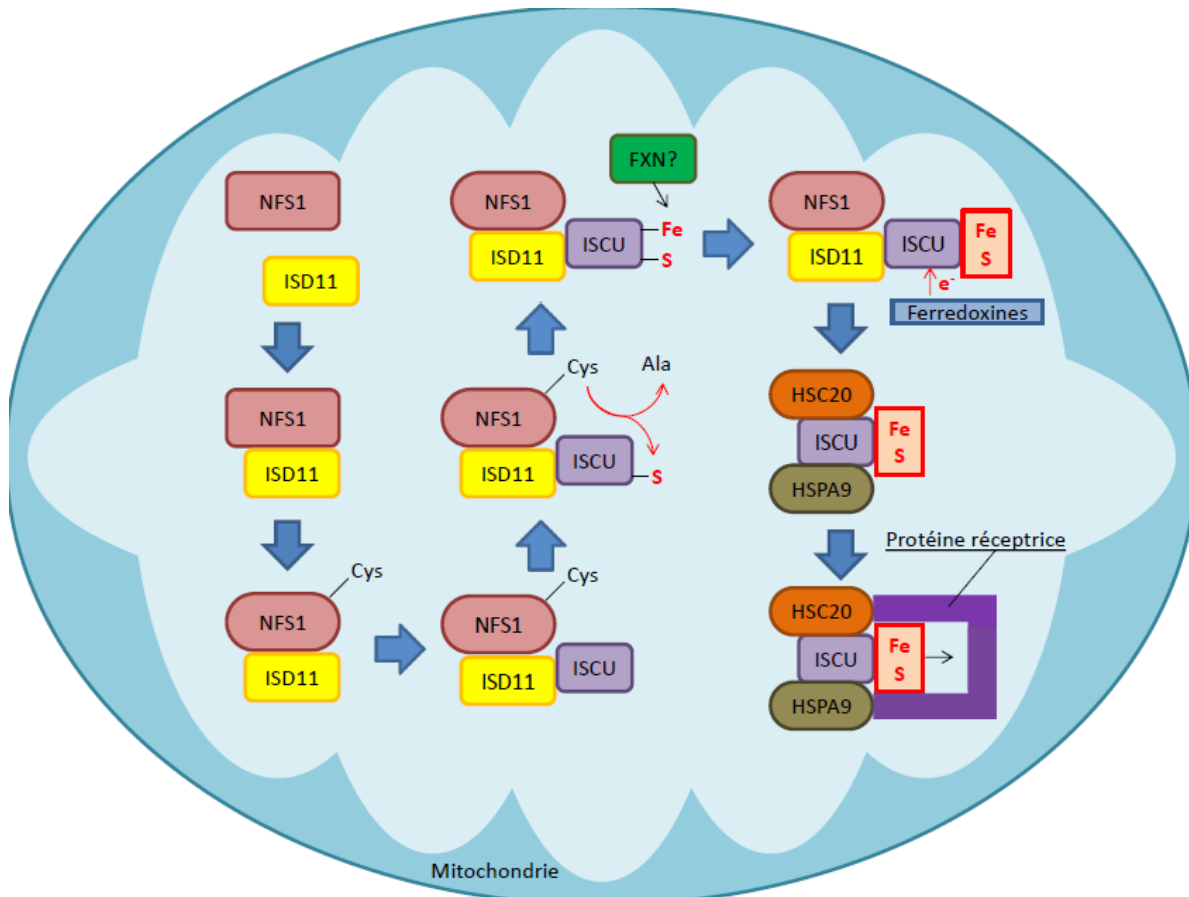
Trois voies potentielles de transport du fer à travers la membrane externe de la mitochondrie ont été identifiées <sup>138-140</sup>. Premièrement, le fer cytosolique pourrait être capté, probablement à l'état ferreux labile, par le biais d'un potentiel de membrane ; cette captation ne nécessiterait pas d'utilisation d'ATP <sup>138,141</sup>. Egalement, le fer cytosolique pourrait être capté à un état considéré comme non-labile, car non chélatable du fait de sa liaison à un ligand dans le cytosol ; ce fer proviendrait initialement du NTBI plasmatique, une forme de fer lié à des protéines de bas poids moléculaire, pénétrant dans le cytosol sans endocytose <sup>139</sup>. Enfin, un troisième mécanisme identifié dans les cellules érythroïdes, consisterait en une captation du fer vésiculaire issu de l'internalisation du complexe transferrine/récepteur ; le fer transiterait dans la mitochondrie par contact entre la vésicule issue de l'endocytose, et la membrane mitochondriale externe <sup>140</sup>. Il est par ailleurs envisagé que le passage du fer à travers la membrane externe de la mitochondrie, soit assuré par le transporteur DMT1 ; ce dernier est en effet localisé sur la membrane externe de la mitochondrie <sup>142</sup>. Concernant le transport du fer à travers la membrane interne de la mitochondrie, celui-ci est assuré par les protéines de transport mitoferrine (Mfn)1 et Mfn2 <sup>143,144</sup>. Les niveaux d'expression de ces deux transporteurs sont limitants pour l'entrée du fer dans la matrice mitochondriale ; ceci attestant de leur rôle central dans l'import du fer à l'intérieur de la mitochondrie <sup>144</sup>. Malgré le manque de connaissances précises de ces mécanismes d'import du fer, il a été rapporté que Mfn1 interagissait avec le transporteur ATP Binding Cassette subfamily B (ABCB)10 pour former un complexe nécessaire à l'import du fer <sup>145</sup>. L'interaction entre ABCB10 et Mfn1 stabiliserait cette dernière sur la membrane interne de la mitochondrie, et favoriserait ainsi l'entrée du fer dans la matrice mitochondriale <sup>145</sup>. D'autres données, plus anciennes, suggèrent en revanche que Mfn1 Mfn2 ne sont pas indispensables au passage du fer à travers la membrane interne de la mitochondrie ; ce passage étant, selon ces auteurs, uniquement dû au potentiel de membrane <sup>138</sup>.

Une fois dans la matrice mitochondriale, le fer est notamment utilisé pour la synthèse des clusters fer-soufre (*Figure 5*).

#### - *Formation des clusters fer-souffre*

Les clusters fer-soufre sont composés d'atomes de fer et de soufre, et intégrés à des protéines, le plus souvent par liaison à des résidus cystéines présents dans leurs structures ; la présence d'un cluster fer-soufre dans une protéine peut avoir différentes fonctions, telles que

le transfert d'électron, le rôle de senseur métabolique, ou encore la réparation de l'ADN <sup>146</sup>. La biogénèse des clusters fer-soufre fait intervenir l'enzyme cystéine désulfurase (NFS1), sous forme d'homodimères ; cette dernière se lierait à la protéine Iron-Sulfur protein biogenesis Desulfurase-interacting protein (ISD11), ceci donnant lieu à la stabilisation d'un complexe désulfurase NFS1/ISD11 <sup>147</sup>. La fixation de ISD11 à NFS1 semble, de plus, occasionner un changement de conformation d'NFS1, ceci permettant la fixation par cette dernière d'un acide aminé cystéine, sur son site actif contenant une coenzyme phosphate de pyridoxal <sup>148</sup>. La protéine Iron-Sulfur Cluster assembly enzyme (ISCU) se fixerait par la suite au complexe NFS1-ISD11 ; l'atome de soufre de la cystéine fixée par NFS1 serait alors extrait par cette dernière, libérant la cystéine sous forme d'alanine, tandis que l'atome de soufre serait transféré sur un résidu cystéine de la protéine ISCU <sup>149</sup>. Les atomes de fer sont ajoutés à la protéine ISCU par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne dont l'identité reste à ce jour incertaine ; la frataxine est cependant considérée comme jouant potentiellement ce rôle <sup>150</sup>. De plus, cette protéine est suspectée d'avoir une fonction de régulation allostérique de l'activité désulfurase des protéines NFS1, ainsi que de l'activité des protéines ISCU <sup>151</sup>. L'assemblage des atomes de fer et de soufre sur la protéine ISCU aurait lieu grâce à un transfert d'électrons à la protéine ISCU, probablement assuré par l'action conjuguée des protéines ferredoxine réductase, ferredoxine 1 et ferredoxine 2 <sup>152,153</sup>. Par la suite, le transfert des clusters fer-soufre formés sur les protéines ISCU aurait lieu par le biais des protéines Heat Shock Protein family A member 9 (HSPA9) et HscB Iron-Sulfur Cluster Cochaperone (HSC20) <sup>154</sup>. En effet, la protéine ISCU portant le cluster fer-soufre se dissocierait de la protéine NFS1 pour se fixer sur la protéine HSC20, grâce à un contact hydrophobe, ainsi qu'à la protéine HSPA9 <sup>149</sup>. Par la suite, le contact du complexe formé par ISCU, HSC20, et HSPA9, avec la protéine réceptrice du cluster fer-soufre, se ferait notamment par l'intermédiaire d'un motif leucine-tyrosine-arginine situé sur certaines protéines réceptrices <sup>154</sup>. D'autres protéines, telles que Iron-Sulfur Cluster Assembly (ISCA)1 et ISCA2, interviendraient de manière plus tardive, et joueraient un rôle dans la maturation du cluster fer-soufre dans la protéine réceptrice <sup>155</sup>.



*Figure 5 : Représentation des processus de formation des clusters fer-soufre dans la matrice mitochondriale.*

Dans la matrice mitochondriale, les protéines NFS1 et ISD11 se lient et forment un complexe ; NFS1 change alors de conformation et fixe un acide aminé cystéine<sup>147,148</sup>. Par la suite, la protéine ISCU se fixe au complexe NFS1/ISD11 ; puis, l'atome de soufre de l'acide aminé cystéine est extrait de ce dernier par NFS1, et transféré sur la protéine ISCU<sup>149</sup>. Un atome de fer est alors fixé à ISCU, potentiellement grâce à l'action de la frataxine, puis un transfert d'électron provenant des protéines ferredoxines donne lieu à la liaison de l'atome de fer et de soufre sur ISCU, formant ainsi un cluster<sup>150,152,153</sup>. ISCU se dissocie ensuite du complexe NFS1/ISD11 pour se lier aux protéines HSC20 et HSPA9<sup>149</sup>. La protéine réceptrice du cluster fer/soufre se lierait ensuite au complexe formé par ISCU, HSC20 et HSPA9, afin de recevoir le cluster fer/soufre dans sa structure<sup>154</sup>. Ala : Alanine, Cys : Cystéine, FXN : Frataxine, S : Soufre

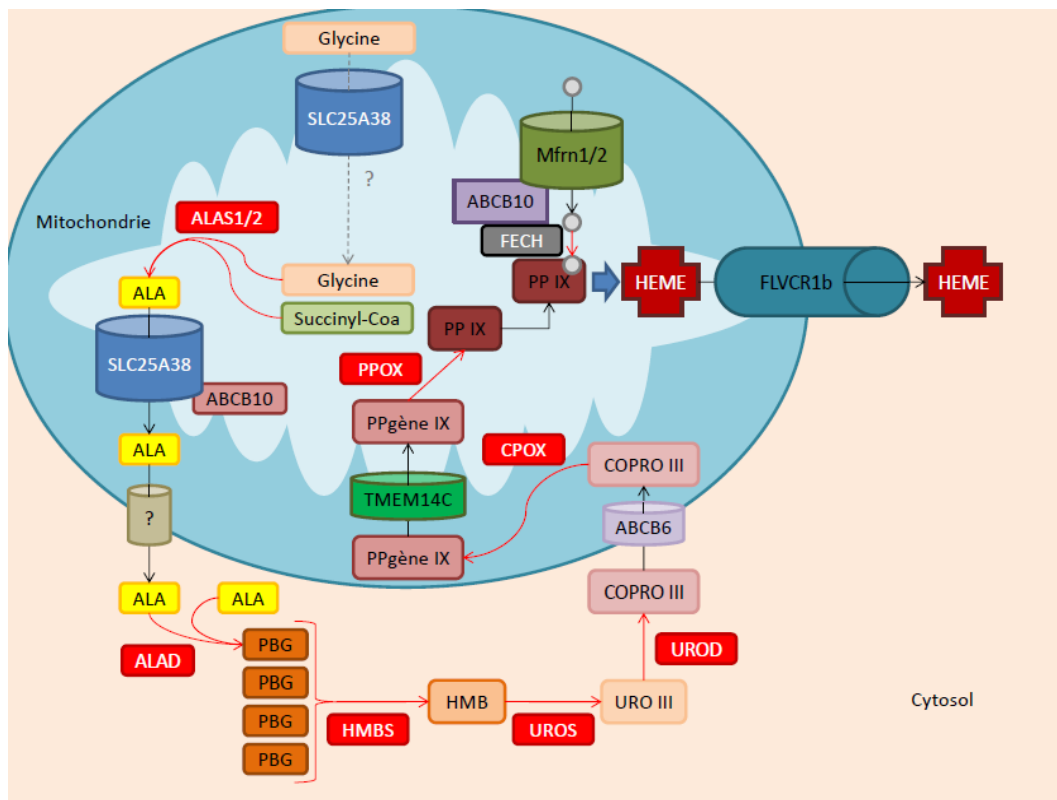
Outre la synthèse des clusters fer-soufre, le fer est utilisé dans la mitochondrie pour la synthèse de l'hème.

#### - Synthèse de l'hème

La synthèse de l'hème (*Figure 6*) est en effet initiée dans la matrice mitochondriale, par les enzymes 5'-aminolevulinate synthase (ALAS)1 et ALAS2, catalysant la formation de

5'-aminolevulinate (ALA) par l'association de succinyl-Coa et de glycine <sup>156</sup>. ALAS1 et ALAS2 sont codées par deux gènes différents se situant sur les chromosomes 3 et X respectivement ; l'expression d'ALAS1 est ubiquitaire, tandis que celle d'ALAS2 est spécifique aux cellules érythroïdes, ceci semblant indiquer que cet isoforme joue principalement un rôle dans la synthèse de l'hème à des fins d'érythropoïèse <sup>156,157</sup>. L'ALA passe ensuite la membrane mitochondriale interne, probablement par un complexe protéique formé du transporteur Solute Carrier (SLC)25A38 et de ABCB10, puis la membrane externe par un moyen encore non-identifié à ce jour, pour être exporté dans le cytosol ; par ailleurs, SLC25A38 pourrait également jouer un rôle dans l'importation de la glycine à l'intérieur de la matrice mitochondriale <sup>158</sup>. Dans le cytosol, plusieurs réactions enzymatiques préparent la poursuite de la synthèse mitochondriale de l'hème : en effet, deux ALA sont initialement associés par l'enzyme Aminolevulinate Dehydratase (ALAD) pour former du porphobilinogène, puis quatre porphobilinogènes sont associés par l'enzyme Hydroxyméthylbilane Synthase (HMBS) pour former de l'hydroxyméthylbilane, converti en uroporphyrinogène III puis en coproporphyrinogène III par les enzymes Uroporphyrinogen III Synthase (UROS) et Uroporphyrinogen Decarboxylase (UROD) respectivement <sup>159</sup>. Par la suite, le coproporphyrinogène III est transporté dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, potentiellement par le transporteur ABCB6 <sup>160</sup>. Le coproporphyrinogène III est ensuite oxydé au sein même de l'espace inter-membranaire mitochondrial en protoporphyrinogène IX par l'enzyme Coproporphyrinogen Oxidase (CPOX) localisée sur la paroi externe de la membrane mitochondriale interne <sup>158</sup>. Le protoporphyrinogène IX serait ensuite importé dans la matrice mitochondriale par le transporteur Transmembrane protein 14C (TMEM14C), puis oxydé en protoporphyrine IX par la Protoporphyrinogen Oxidase (PPOX) <sup>158</sup>. Le fer pénètre ensuite dans la mitochondrie par les mécanismes décrits dans les chapitres précédents (*partie 1.3.3., pages 27 et 28*) en vue de la finalisation de la synthèse de l'hème. L'utilisation du fer par les cellules érythroïdes dans la synthèse des molécules d'hème, fait appel de manière indispensable aux protéines Mfrn, pour l'entrée du fer dans la mitochondrie <sup>161</sup>. A ce titre, dans les mitochondries des cellules érythroïdes en différenciation, l'expression de la Mfrn1 augmente afin de répondre aux besoins accrus en fer pour la synthèse de l'hème <sup>144</sup>. Lors de l'entrée du fer par la membrane interne de la mitochondrie des cellules érythroïdes, le complexe formé par Mfrn1 et ABCB10 s'associe également avec la ferrochelatase, une protéine ayant pour fonction d'insérer le fer dans la protoporphyrine IX, étape finale de la synthèse de l'hème <sup>162,163</sup>. De cette manière, le fer serait alors guidé vers la

ferrochelatase, directement après son entrée dans la matrice de la mitochondrie <sup>162</sup>. L'hème est ensuite exporté hors de la mitochondrie par le transporteur membranaire FLVCR1b, dont la localisation précise sur la membrane interne ou externe reste à définir, afin d'être intégrée aux différentes hémoprotéines <sup>158,159</sup>. Par ailleurs, l'export de l'hème par les cellules érythroïdes au cours de l'érythropoïèse *via* les transporteurs de type FLVCR semble être nécessaire pour la poursuite du processus de maturation de ces dernières, potentiellement pour prévenir une toxicité due à un excès d'hème dans les précurseurs érythropoïétiques <sup>35</sup>.



**Figure 6 :** Représentation du processus de synthèse de l'hème dans la matrice mitochondriale et le cytosol.

Dans la matrice mitochondriale, la glycine et le succinyl-Coa sont associés par les enzymes ALAS1 et ALAS2 pour former de l'ALA, lequel est ensuite exporté dans l'espace intermembranaire via un complexe formé par le transporteur SCL25A38 et la protéine ABCB10 <sup>156-158</sup>. L'ALA est par la suite exporté dans le cytosol, au sein duquel deux ALA sont associés pour former du PBG grâce à l'enzyme ALAD <sup>158,159</sup>. L'enzyme HMBS associe alors quatre PBG pour former de l'HMB, par la suite converti en URO III par l'enzyme UROS, puis en COPRO III par l'enzyme UROD <sup>159</sup>. COPRO III passe ensuite la membrane externe de la mitochondrie par le transporteur ABCB6 avant d'être converti en PPgène IX par l'enzyme CPOX <sup>158,160</sup>. PPgène IX pénètre ensuite dans la matrice mitochondriale par le transporteur TMEM14C, avant d'être converti en PP IX par l'enzyme PPOX <sup>158</sup>. Suite à son entrée dans la matrice mitochondriale par le complexe formé par les protéines Mfrn, ABCB10, et FECH, un atome de fer est inséré dans PP IX, afin de former de l'hème <sup>162,163</sup>. L'hème est ensuite exporté dans le cytosol via le transporteur FLVCR1b <sup>158,159</sup>. COPRO III : coproporphyrinogène III, FECH : Ferrochelatase, HMB : Hydroxyméthylbilane, PBG : Porphobilinogène, PPgène IX : Protoporphyrinogène IX, PP IX : Protoporphyrine IX, URO III : Uroporphyrinogène III

#### 1.4. Recyclage de l'hème et réapprovisionnement de l'organisme en fer bio-disponible

Un recyclage des érythrocytes sénescents a lieu dans les macrophages, notamment spléniques, et hépatiques (cellules de Kupffer) ; en effet après son internalisation au sein de la cellule macrophagique, l'érythrocyte y est dégradé et libère ainsi l'hémoglobine dans le phagolysosome (*Figure 7*)<sup>141</sup>. Il existe par ailleurs d'autres voies de recyclage de l'hème<sup>164,165</sup>.

##### 1.4.1. L'érythrophagocytose

###### *- Phagocytose des érythrocytes sénescents*

Au cours de leur activité dans le sang, les érythrocytes cumulent un certain nombre d'altérations aux caractéristiques proches de celles de l'apoptose des cellules nucléées, et permettant aux macrophages d'identifier la sénescence de ces érythrocytes<sup>166</sup>. Ces altérations peuvent consister en l'apparition de néo-antigènes de sénescence sur la membrane, en une peroxydation de membrane, en l'externalisation des phosphatidylsérines, ou encore en un rétrécissement de la taille de la cellule<sup>166-168</sup>. Certaines de ces altérations sont considérées comme pouvant résulter d'une hausse de la concentration en calcium dans l'érythrocyte<sup>166,169</sup>. Le rôle du calcium dans la survenue de ces altérations et dans la phagocytose subséquente des érythrocytes, semble par ailleurs être médié par l'activité de protéases à cystéine<sup>166</sup>. La hausse de la concentration en calcium dans l'érythrocyte pourrait notamment stimuler les protéines scramblases, donnant ainsi lieu au déplacement des phosphatidylsérines de la paroi interne de la membrane plasmique, vers la paroi externe de cette dernière<sup>166,169-171</sup>. A ce titre, il semblerait que la protéine Growth Arrest Specific 6 (GAS6) exprimée par les macrophages, probablement sur les membranes plasmiques de ces derniers, puisse reconnaître et fixer les phosphatidylsérines sur la paroi externe de la membrane des érythrocytes, donnant ainsi lieu à la phagocytose de ces derniers<sup>172</sup>. Il est cependant suggéré par d'autres données que GAS6 soit un facteur circulant sécrété par les macrophages, et qui, suite à sa liaison aux phosphatidylsérines, se lierait à un récepteur de la famille des Tyro3 Axl and Mer receptor, exprimé sur la membrane des macrophages afin d'initier l'érythrophagocytose<sup>173</sup>. Par ailleurs, la hausse du calcium intracellulaire serait également en lien avec le rétrécissement

des érythrocytes sénescents <sup>166</sup>. De plus, l'antigène de surface Cluster of Differentiation (CD)47 jouerait un rôle dans le ciblage des érythrocytes sénescents par les macrophages <sup>167</sup>. Jouant un rôle protecteur à l'encontre de la phagocytose à la surface des érythrocytes non-sénescents, CD47 changerait de conformation au cours du processus de sénescence de l'érythrocyte, ce qui modifierait la nature de son interaction avec la protéine Signal Regulatory Protein alpha (SIRP $\alpha$ ) <sup>167</sup>. Le complexe CD47-SIRP $\alpha$ , protégeant l'érythrocyte non-sénescents de la phagocytose, jouerait à l'inverse un rôle favorisant la phagocytose de l'érythrocyte lorsque celui-ci est sénescents <sup>167</sup>. De plus, le rôle d'une interaction entre CD47 et la protéine Thrombospondine 1 (TSP-1) est également suggéré dans la reconnaissance et la phagocytose de l'érythrocyte sénescents par les macrophages <sup>167</sup>.

#### *- Dégradation des érythrocytes et réintroduction du fer dans la voie sanguine*

Les érythrocytes sénescents sont par la suite internalisés au sein des macrophages dans des phagosomes <sup>174</sup>. Il semblerait que ces derniers soient formés par fusion du réticulum endoplasmique avec la membrane plasmique, au cours de la phase précoce de la phagocytose <sup>174,175</sup>. Le phagosome suivrait par la suite un processus de maturation, pour former un phagolysosome mature à même d'assurer la dégradation des érythrocytes phagocytés <sup>174,175</sup>. Le réticulum endoplasmique jouerait également un rôle au cours de ce processus, en fusionnant avec le phagosome en maturation <sup>174,175</sup>. Par la suite, la dégradation par l'enzyme HO-1, de l'hème contenu dans les érythrocytes, occasionne la libération du fer dans le phagolysosome <sup>141</sup>. La dégradation de l'hème pourrait également être assurée par l'isoforme HO-2, néanmoins cinq fois moins présent dans la rate que l'isoforme HO-1 <sup>176</sup>. Les rôles des transporteurs Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) et DMT1 sont fortement suggérés dans la libération du fer contenu dans le phagolysosome, vers le cytosol des macrophages <sup>177,178</sup>. En outre, il semble qu'une partie du fer resté à l'état hémique dans le phagolysosome puisse être directement excrété dans le cytosol grâce au transporteur Heme Responsive Gene 1 (HRG1) <sup>179</sup>. A ce titre, certaines données suggèrent que l'hème n'est pas dégradé au sein du phagolysosome ; l'hème serait en effet directement exporté de ce dernier *via* HRG1, puis dégradé dans le cytosol <sup>180</sup>. L'efficacité du transport du fer macrophagique vers le sang, semble conditionné par l'activité de la céruloplasmine <sup>181,182</sup>. L'activité ferroxidase de cette enzyme semble en effet partiellement nécessaire à l'association du fer à la transferrine, cette dernière possédant une affinité pour Fe<sup>3+</sup> <sup>182,183</sup>. Par ailleurs, un rôle de la

glycosylphosphatidylinositol (GPI)-céruloplasmine, une forme membranaire de la céruloplasmine exprimée notamment par les macrophages, dont il sera question dans les chapitres à venir (*partie 3.2.3., page 71 et 72*), a été évoqué dans la stabilisation de la ferroportine sur les membranes plasmiques <sup>184,185</sup>.

#### 1.4.2. Les voies alternatives du recyclage de l'hème

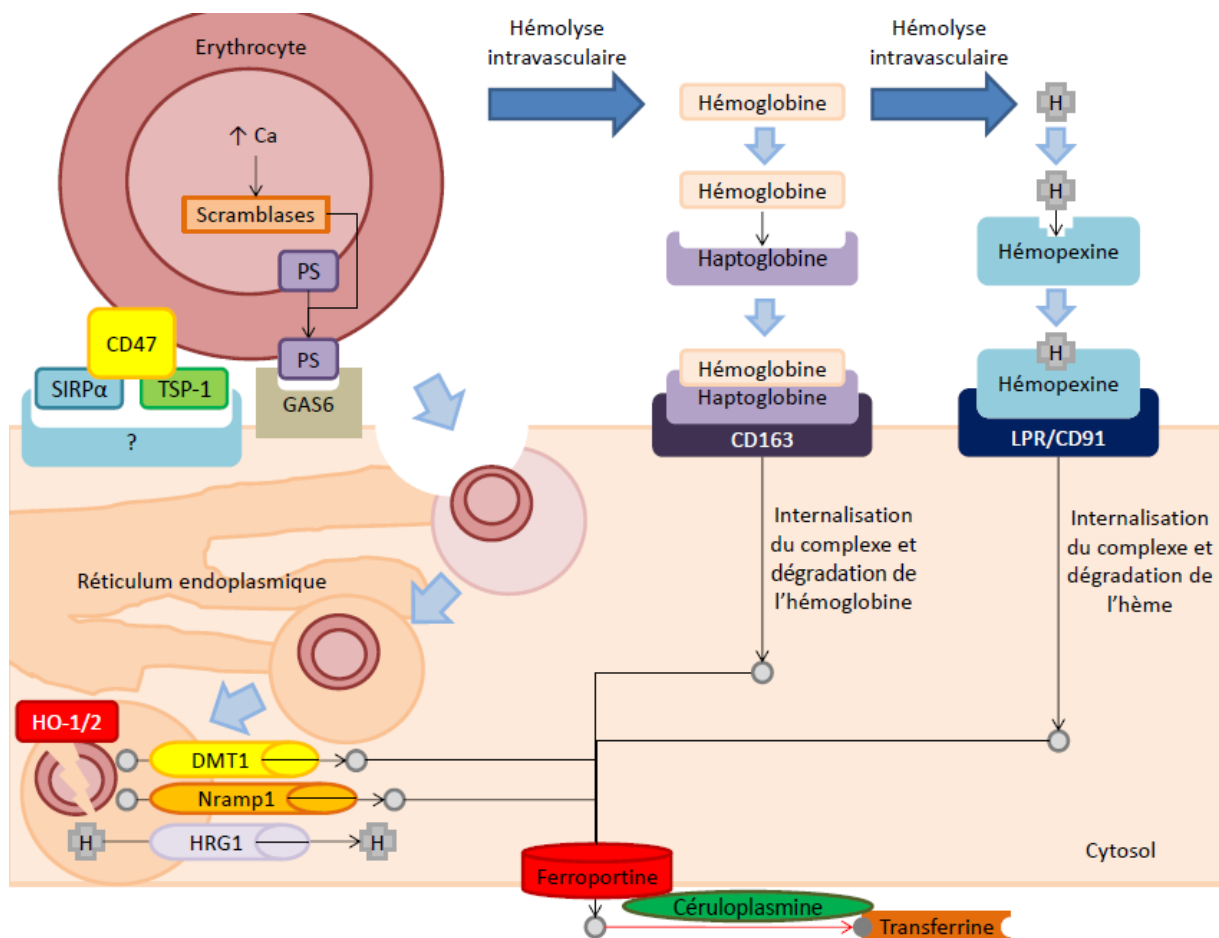
##### *- La voie haptoglobine-CD163*

La récupération d'hème par les macrophages peut également faire suite à un processus d'hémolyse, par lequel l'hémoglobine est libérée directement dans le plasma <sup>186</sup>. En conditions non pathologiques, certains érythrocytes sont sujets à l'hémolyse intravasculaire, et libèrent leur hémoglobine dans le sang <sup>187,188</sup>. La molécule d'hémoglobine peut par la suite être fixée par une molécule d'haptoglobine, une glycoprotéine synthétisée majoritairement par le foie <sup>164,182,188,189</sup>. Le complexe hémoglobine-haptoglobine se lie alors au récepteur CD163 exprimé à la membrane des macrophages, par un processus calcium-dépendant <sup>164,173,182,188</sup>. Cette liaison entraînerait l'internalisation du complexe hémoglobine-haptoglobine-CD163, en vue de la dégradation de l'hémoglobine au sein du macrophage <sup>164,182,188</sup>. De plus, il semblerait que l'hémoglobine libre puisse également être reconnue par CD163, et internalisée au sein du macrophage par le biais de ce récepteur <sup>190</sup>.

##### *- La voie hémopexine-CD91*

L'hémolyse intravasculaire peut également donner lieu à la présence d'hème libre dans le plasma <sup>186</sup>. Dans ce cas, la molécule d'hème se lie à l'hémopexine, une glycoprotéine de 439 acides aminés, majoritairement synthétisée et sécrétée par le foie <sup>191-193</sup>. Le complexe hème-hémopexine est reconnu par le récepteur LDL related Protein Receptor (LPR)/CD91, présent à la surface de la membrane des macrophages <sup>165</sup>. L'internalisation du complexe hème-hémopexine-LPR/CD91 a ensuite lieu en vue de la dégradation de l'hème et de la libération du fer au sein du macrophage <sup>165</sup>.





*Figure 7 : Représentation du processus d'érythrophagocytose, et de recyclage de l'hémoglobine et de l'hème au sein des macrophages, en vue de la réintroduction du fer recyclé dans la circulation sanguine.*

Dans l'érythrocyte, la hausse du calcium intracellulaire stimule les protéines scramblases, ceci provoquant le déplacement des protéines PS de la paroi interne de la membrane plasmique vers sa paroi externe<sup>166,169-171</sup>. Les protéines GAS exprimées à la surface des macrophages reconnaissent les PS présents sur la membrane externe des érythrocytes<sup>172</sup>. De plus, à la surface de la membrane érythrocytaire, l'antigène de surface CD47, en association avec et les protéines SIRPα et TSP-1, est également reconnu par les macrophages<sup>167</sup>. Les signaux de sénescence érythrocytaires constitués par les PS et les antigènes CD47, une fois reconnus par les macrophages, permettent la phagocytose des érythrocytes, grâce à un phagosome formé par fusion du réticulum endoplasmique avec la membrane plasmique du macrophage<sup>174,175</sup>. Après maturation du phagosome en phagolysosome, l'hème contenu par les érythrocytes y est dégradé par les enzymes HO-1 et HO-2<sup>141,176</sup>. L'hème non dégradé est exporté dans le cytosol par le transporteur HRG1, tandis que le fer non-hémique est exporté par les transporteurs DMT1 et Nramp1<sup>177-179</sup>. Par ailleurs, dans le plasma, l'hémolyse intravasculaire des érythrocytes donne lieu à la libération d'hémoglobine et d'hème, à même d'être fixés par les protéines haptoglobine et hémopexine respectivement<sup>164,182,186-189,191-193</sup>. La reconnaissance du complexe hémoglobine/haptoglobine par le récepteur CD163 exprimé sur la membrane des macrophages, donne lieu à son internalisation et sa dégradation dans le macrophage, libérant ainsi du fer libre<sup>164,173,182,188</sup>. L'internalisation et la dégradation de l'hème dans le macrophage a lieu suite à la reconnaissance du complexe hème/hémopexine par le récepteur LCR/CD91<sup>165</sup>. Le fer libéré dans le cytosol du macrophage suite à la dégradation des érythrocytes, de l'hémoglobine, et de l'hème, est exporté dans le plasma par la ferroportine, puis oxydé par la céruloplasmine, permettant ainsi la liaison du fer ferrique à la transferrine<sup>182-185</sup>. **H** : Hème, **PS** : Phosphatidylsérine

### 1.5. Régulation du métabolisme du fer

Le métabolisme du fer est sujet à des régulations, nécessaires au maintien de l'homéostasie de ce métal <sup>2</sup>. Deux grands types de régulations sont présents au sein de l'organisme ; certaines régulations sont systémiques et médiées notamment par l'hepcidine, tandis que d'autres opèrent à l'échelle de la cellule <sup>2</sup>.

#### 1.5.1. Régulation systémique du fer et rôle de l'hepcidine

##### *- L'hepcidine*

L'hepcidine est un peptide circulant synthétisé dans le foie, et ayant une implication majeure dans la régulation de l'homéostasie du fer à l'échelle systémique <sup>194,195</sup>. En premier lieu décrit comme ayant une activité antimicrobienne, ce peptide est codé par un gène situé sur le chromosome 19, et comptant 3 exons <sup>194-196</sup>. De très petite taille, et majoritairement exprimée et sécrétée par les hépatocytes, l'hepcidine est formée de 25 acides aminés, pour un poids moléculaire d'un peu moins de 3 kDa <sup>194-196</sup>. Par ailleurs, il existe deux formes plus courtes de ce peptide, de 22 et 20 acides aminés ; ces deux formes tronquées sont notamment détectables dans les urines, au même titre que le peptide de 25 résidus, la petite taille l'hepcidine la rendant en effet filtrable par les reins <sup>194</sup>. Par ailleurs, la structure secondaire de l'hepcidine est caractérisée par la présence de quatre ponts disulfures, joignant les cystéines C7 à C23, C10 à C13, C11 à C19, ainsi que C14 à C22 <sup>197</sup>. De plus, l'ensemble du peptide consiste en un feuillet  $\beta$ , traversé par les ponts disulfure, à l'exception des 5 premiers acides aminés de son segment N-terminal, demeurant hautement flexibles du fait de leur absence de structure secondaire <sup>197</sup>. Ces 5 premiers acides aminés du segment N-terminal du peptide ont un rôle crucial dans l'interaction de la molécule avec la ferroportine, nécessaire au rôle biologique de l'hepcidine dans la régulation des taux de fer plasmatiques <sup>198</sup>.

##### *- Régulation du métabolisme fer par l'hepcidine*

L'hepcidine présente dans le sang est en effet capable d'interagir avec la ferroportine responsable de l'export du fer cellulaire, notamment entérocytaire et macrophagique, et d'induire l'internalisation ainsi que la dégradation de ce transporteur ; l'hepcidine limite ainsi

la biodisponibilité du fer, en contrôlant les taux de fer plasmatiques et donc la saturation de la transferrine, par une régulation négative de son absorption et de son recyclage<sup>38,199</sup>. L'interaction à la membrane cellulaire entre l'hepcidine et la ferroportine est initiée par la fixation de l'extrémité N-terminale de l'hepcidine à une boucle du domaine extracellulaire de la ferroportine ; cette fixation consiste notamment en des liaisons hydrophobes entre les résidus H3, F4, et I6 de l'hepcidine et le résidu Y333 de la ferroportine<sup>200</sup>. La possibilité d'un échange de liaisons disulfures entre les deux protéines, impliquant un lien du résidu C326 de la ferroportine à une cystéine de l'hepcidine, est également évoqué en raison de la proximité entre C326 et le réseau disulfure de l'hepcidine<sup>200</sup>. Cette hypothèse de la nécessité de C326 dans l'interaction entre l'hepcidine et la ferroportine est largement corroborée par l'hepcidino-résistance de la ferroportine, présente dans les mutations de cette dernière touchant spécifiquement le résidu C326, telles que les mutations C326Y réalisées *in-vitro* et C326S présentes chez l'Homme<sup>201-204</sup>. Certaines données tendent à montrer que cette interaction entre l'hepcidine et la ferroportine engendre une phosphorylation de cette dernière sur ses résidus Y302 et Y303, situés sur une boucle de son domaine cytosolique, avec pour conséquences l'internalisation de la protéine, suivie de sa déphosphorylation, son ubiquitination, et finalement, sa dégradation lysosomale<sup>38</sup>. D'autres auteurs décrivent en revanche une internalisation de la ferroportine ne nécessitant pas la phosphorylation de ces deux résidus tyrosine, et survenant directement suite à l'ubiquitination de la protéine sur ses résidus lysines situés entre K229 et K269, sur la troisième boucle de son domaine cytosolique<sup>205,206</sup>. L'hepcidine semble par ailleurs capable de limiter l'absorption intestinale du fer en agissant indirectement sur le transporteur DMT1, l'exposition à l'hepcidine ayant en effet été décrite comme pouvant induire une ubiquitination de DMT1, suivi de sa dégradation dans les protéasomes des entérocytes<sup>207</sup>. L'expression de l'hepcidine semble par ailleurs pouvoir être régulée positivement par trois principaux types de stimuli (*Figure 8*) : l'augmentation de la concentration plasmatique en fer soit l'augmentation de la saturation de la transferrine, l'augmentation de la concentration cellulaire en fer, et l'inflammation<sup>2,9</sup>. A l'inverse, la baisse des taux plasmatiques de fer ainsi que l'anémie et l'hypoxie sont des signaux répresseurs de l'hepcidine<sup>2,9</sup>.

### 1.5.2. Régulation de l'expression de l'hepcidine

#### *- Induction de l'hepcidine par la saturation de la transferrine*

La protéine HFE joue un rôle important dans la régulation positive de l'hepcidine, sous l'effet des niveaux de saturation de la transferrine <sup>208</sup>. La protéine HFE semble en effet chevaucher le site de fixation de l'holotransferrine de TfR1, de sorte à ce que ce récepteur ne puisse pas être lié simultanément à l'holotransferrine et à la protéine HFE <sup>209</sup>. De plus, cette dernière peut également être associée à TfR2, ce récepteur pouvant, à l'inverse de TfR1, se lier à la fois à l'holotransferrine et à la protéine HFE <sup>209</sup>. Il a été démontré que l'augmentation des taux plasmatiques d'holotransferrine provoque une hausse de la transcription de l'hepcidine <sup>210</sup>. Cette régulation semble être initiée par les deux acteurs majeurs que sont HFE, et TfR2 <sup>209</sup>. En effet, lorsque l'holotransferrine se fixe au récepteur TfR1, ce dernier ne pouvant pas fixer à la fois l'holotransferrine et la protéine HFE, cette dernière se désolidarise de TfR1 et se lie au récepteur TfR2 <sup>211,212</sup>. La fixation de l'holotransferrine au récepteur TfR2 a pour effet de stabiliser ce dernier à la membrane ; tandis que la liaison de la protéine HFE à TfR2 active la transduction d'un signal aboutissant à la transcription du gène Heparin Antimicrobial Peptide (*HAMP*) codant pour l'hepcidine <sup>208,213</sup>. La transduction de ce signal apparaît selon certaines études comme étant médiée par l'activation de la voie Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), impliquant la phosphorylation des protéines Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK)1/2 <sup>214-216</sup>. D'autres données en revanche, tendent à infirmer le rôle de la voie MAPK, notamment de ERK1/2, dans la régulation de l'hepcidine par l'holotransferrine <sup>217</sup>. En outre, dans le cadre de l'induction de l'hepcidine par l'holotransferrine *via* HFE et TfR2, la phosphorylation des protéines Mothers Against Decapentaplegic homolog (SMAD)1/5/8 indique que la voie MAPK pourrait agir en interaction, ou du moins en simultanéité avec la voie Bone Morphogenetic Protein (BMP)/SMAD <sup>214-217</sup>. Cette dernière est par ailleurs décrite comme étant majoritairement impliquée dans la régulation de l'hepcidine par les stocks hépatiques de fer <sup>217</sup>.

#### *- Induction de l'hepcidine par les stocks hépatiques de fer*

Les stocks hépatiques en fer exercent également un contrôle sur l'expression de l'hepcidine. Dans cette régulation, la protéine BMP6 joue un rôle indispensable, par le biais des protéines SMAD1/5/8 <sup>217,218</sup>. En effet, la hausse des concentrations en fer dans le foie induit l'expression de BMP6 <sup>217,219</sup>. Cette protéine semble alors pouvoir interagir avec le récepteur Bone Morphogenetic Protein Receptor (BMPR)-1 et la protéine co-réceptrice

Hemojuvelin BMP co-receptor (HJV)<sup>220</sup>. Le ligand BMP formerait alors un complexe avec BMPR-1, HJV, et le récepteur BMPR-2<sup>220</sup>. Ce dernier serait à même de phosphoryler BMPR-1, donnant lieu à l'activation de la voie SMAD par la phosphorylation des protéines SMAD1/5/8<sup>220</sup>. Ces protéines se fixeraient alors sur le Bone Morphogenetic Protein Responsive Element (BMP-RE) situé sur le promoteur du gène codant pour l'hépcidine, aboutissant à la transcription de ce dernier<sup>220</sup>. Une implication de la protéine HFE est par ailleurs suggérée dans l'activation de la voie BMP/SMAD<sup>221,222</sup>. En effet, HFE serait associée au récepteur BMPR-1, et assurerait la stabilisation de ce dernier en inhibant sa dégradation, notamment par voie ubiquitine/protéasome<sup>222</sup>. A l'inverse cependant, d'autres données tendent à démontrer que la protéine HFE n'est pas impliquée dans cette régulation de l'hépcidine par les stocks hépatiques de fer<sup>210</sup>. En outre, la signalisation BMP/SMAD est décrite comme étant de type paracrine<sup>223</sup>. En effet, il apparait que la hausse des stocks hépatiques en fer induise une hausse des niveaux d'ARNm de BMP6, majoritairement dans les cellules sinusoïdales<sup>219,223</sup>. La sécrétion de BMP6 par les cellules sinusoïdales hépatiques serait suivie d'une liaison de BMP6 à son récepteur exprimé par les hépatocytes, au sein desquels la signalisation BMP/SMAD aurait lieu, aboutissant à la transcription du gène de l'hépcidine<sup>223</sup>. Certaines données indiquent que l'induction de l'hépcidine par le signal BMP/SMAD pourrait également être assurée par BMP2<sup>220</sup>. Cependant, d'autres données tendent à montrer que le rôle de BMP6 est prédominant dans la régulation de l'hépcidine par les stocks de fer, les autres ligands BMP n'ayant qu'une implication secondaire<sup>224</sup>. D'autre part, la protéine SMAD4 pourrait avoir un rôle dans ce contrôle de l'expression de l'hépcidine<sup>225</sup>. En effet, suite à l'activation de la voie BMP/SMAD, SMAD4 pourrait induire une modification d'une histone H3 proche du promoteur de l'hépcidine, probablement par une méthylation du résidu K4 de l'histone, ou par une acétylation de son résidu K9<sup>225</sup>. Cette modification d'histone favoriserait l'activation du promoteur du gène de l'hépcidine, et par conséquent sa transcription<sup>225</sup>.

#### *- Induction de l'hépcidine par l'inflammation*

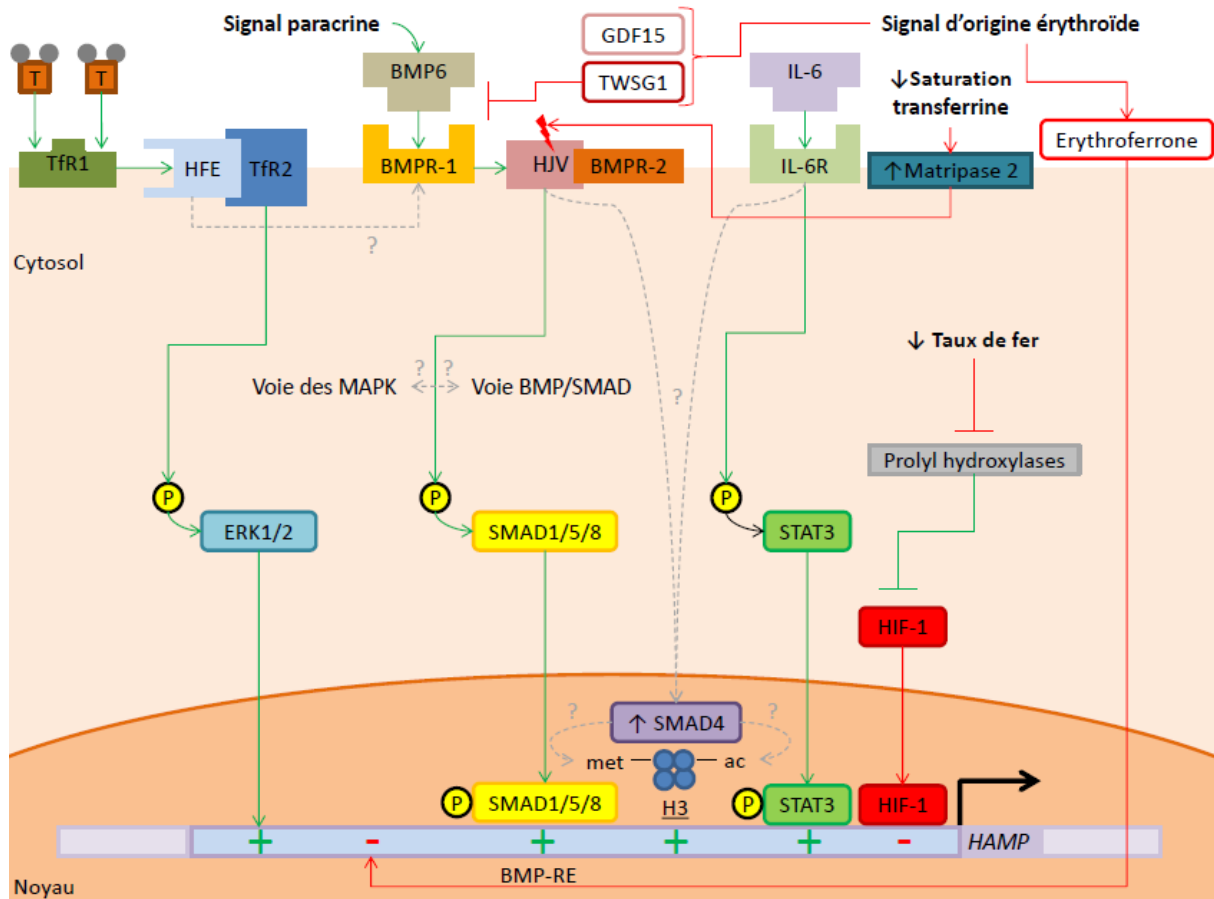
L'impact de l'inflammation sur l'augmentation des niveaux d'hépcidine a principalement lieu au travers de l'Interleukine (IL)-6<sup>226</sup>. Cette cytokine semble en effet induire l'expression de l'hépcidine dans les hépatocytes via la phosphorylation de la protéine Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)3<sup>227</sup>. Cette dernière est alors à

même de jouer le rôle de facteur de transcription au niveau du promoteur du gène de l'hepcidine<sup>228</sup>. Par ailleurs, l'IL-6 semble induire l'expression du gène de l'hepcidine *via* la transduction d'un signal aboutissant à l'activation du BMP-RE de son promoteur, ceci suggérant des interactions étroites entre la voie inflammatoire et la voie BMP/SMAD dans le contrôle de l'hepcidine<sup>229</sup>. L'IL-6 pourrait également induire l'expression de l'hepcidine *via* la protéine SMAD4, selon un mécanisme de modification d'histone décrit plus haut, favorisant la transcription du gène de l'hepcidine<sup>225</sup>. Cette transcription de l'hepcidine médiée par SMAD4 semble aussi pouvoir être induite par le Transforming Growth Factor bêta (TGF- $\beta$ )<sup>225</sup>. En outre, dans un contexte inflammatoire, l'activine B a été décrite comme induisant la transcription de l'hepcidine par le biais d'une phosphorylation des protéines SMAD1/5/8<sup>230</sup>.

#### *- Inhibition de l'hepcidine*

La principale voie de régulation négative de l'hepcidine a lieu par le biais de l'érythroferrone, une protéine d'origine érythroïde<sup>231</sup>. Une situation d'anémie provoque en effet la sécrétion d'érythropoïétine (EPO) activant la voie Janus Kinase 2 (JAK2)/STAT5 au sein des érythroblastes de la moelle osseuse, et aboutissant à la synthèse d'érythroferrone par ces derniers ; la protéine une fois sécrétée, semble alors interagir avec les hépatocytes et induire une réduction de leur transcription d'hepcidine<sup>231</sup>. En situation d'anémie, l'expression de l'hepcidine peut également être abaissée par l'implication d'autres protéines d'origine érythroïde<sup>232</sup>. A ce titre, la protéine Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) exprimée et sécrétée par les précurseurs érythropoïétiques, semble capable, à des concentrations anormalement élevées retrouvées chez les patients  $\beta$ -thalassémiques, de réprimer l'expression de l'hepcidine<sup>233</sup>. De plus, le facteur Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1 (TWSG1), une autre protéine d'origine érythroïde dont les concentrations plasmatiques sont également élevées dans la  $\beta$ -thalassémie, pourrait inhiber l'induction de l'hepcidine par la voie BMP/SMAD en interférant avec la fixation des protéines BMP à leur récepteur<sup>234</sup>. Par ailleurs, l'hypoxie semble pouvoir inhiber la transcription de l'hepcidine ; en effet le facteur Hypoxia Inductible Factor (HIF)-1, induit par l'hypoxie, est à même d'induire une baisse des niveaux d'ARNm d'hepcidine dans les hépatocytes<sup>235</sup>. Les mécanismes exacts restent incomplètement compris, malgré l'évocation d'une possible fixation de HIF-1 sur le promoteur du gène de l'hepcidine, limitant la transcription de ce dernier<sup>235</sup>. Un autre

mécanisme suggéré concerne les prolyl hydroxylases ; en effet l'activité de ces enzymes nécessite le fer comme cofacteur, ce dernier leur étant fourni grâce aux protéines chaperonnes PCBP1 et PCBP2 <sup>118</sup>. De plus, l'hydroxylation de HIF-1 sur son résidu P564 par les prolyl hydroxylases engendre son ubiquitination suivie de sa dégradation protéasomale <sup>236,237</sup>. Ces enzymes joueraient alors un rôle d'intermédiaire dans l'inhibition de l'expression de l'hepcidine induite par une baisse des taux de fer hépatocytaires : en effet, la baisse des niveaux de fer cellulaire engendrerait une diminution de l'activité des prolyl hydroxylases, avec par conséquent une moindre dégradation de HIF-1, laquelle exercerait alors son activité inhibitrice à l'égard de l'hepcidine dans de plus grandes proportions <sup>118,235</sup>. Par ailleurs, HIF-2 semble également capable de réprimer l'expression de l'hepcidine de manière indirecte, par le biais d'une hausse de la sécrétion d'EPO <sup>238</sup>. En outre, la baisse de la saturation de la transferrine semble également induire une baisse d'expression de l'hepcidine, par le biais d'une hausse des niveaux de la protéine membranaire hépatocytaire matripase-2 <sup>239</sup>. Cette protéine semble capable de cliver l'hémojuvéline sur la membrane plasmique des hépatocytes ; la matripase 2 serait alors une inhibitrice de l'expression de l'hepcidine par inactivation de l'hémojuvéline, qui comme décrit précédemment, possède à l'inverse un rôle central dans l'induction de l'hepcidine <sup>240</sup>. L'expression de l'hepcidine pourrait également être réprimée par la testostérone, cette hormone ayant en effet été rapportée comme induisant une forte répression de la transcription de l'hepcidine, *via* l'activation du signal Epidemial Growth Factor Receptor (EGFR) <sup>241</sup>.



*Figure 8 : Représentation des voies de transduction à l'origine de la régulation transcriptionnelle de l'hépcidine.*

L'expression du gène *HAMP* codant pour l'hépcidine est soumise à plusieurs voies de contrôle positif. Aux abords de l'hépatocyte, l'holotransferrine se fixe à TfR1 associé à la protéine HFE ; cette dernière se lie alors à TfR2, ceci ayant pour effet d'activer la voie MAPK, engendrant la phosphorylation des protéines ERK1/2 ; ces dernières induisent alors la transcription du gène *HAMP*<sup>208-216</sup>. Par ailleurs, la protéine BMP6 provenant d'une sécrétion paracrine d'origine sinusoidale se fixe à son récepteur BMPR-1 ; formant alors un complexe avec la protéine HJV et le récepteur BMPR-2, et activant la voie BMP/SMAD aboutissant à la phosphorylation des protéines SMAD1/5/8<sup>217-219,223</sup>. Ces dernières migrent alors dans le noyau cellulaire pour se fixer sur le BMP-RE du promoteur de *HAMP* et activer sa transcription<sup>220</sup>. L'IL-6 joue par ailleurs un rôle dans l'induction de l'hépcidine ; en effet, l'IL-6 se fixe à son récepteur IL-6R, ceci donnant lieu à l'activation d'un signal aboutissant à la phosphorylation de la protéine STAT3<sup>226,227</sup>. Celle-ci migre alors dans le noyau pour y jouer le rôle de facteur de transcription sur le promoteur de *HAMP* et induire la transcription de ce gène<sup>228</sup>. En outre, sous l'influence des voies activées par BMP6 et IL-6, la protéine SMAD4, semble pouvoir activer le promoteur de *HAMP*, via la méthylation et l'acétylation d'un histone H3 à proximité<sup>225</sup>. L'expression de *HAMP* peut par ailleurs subir des régulations négatives. En effet, l'érythroferrone provenant de la moelle osseuse a un effet répressif sur la transcription de l'hépcidine<sup>231</sup>. De même, l'expression de l'hépcidine peut être réprimée par deux autres protéines d'origine érythroïde, GDF15 et TWSG1, cette dernière pouvant perturber la liaison de BMP6 à son récepteur, affectant ainsi la régulation positive de l'hépcidine<sup>233,234</sup>. Par ailleurs, la baisse de la saturation de la transferrine augmente les niveaux de matripase 2 à la membrane de l'hépatocyte ; cette protéine clive HJV, affectant ainsi le régulation positive de l'expression de *HAMP*<sup>239,240</sup>. De même, la baisse des taux de fer cellulaires inhibe l'activité des prolyl hydroxylases, dont l'activité inhibitrice à l'égard de HIF-1 est alors amoindrie, provoquant une hausse de l'activité inhibitrice de HIF-1 envers l'expression de *HAMP*<sup>118,235-237</sup>.

T : Transferrine, IL-6R : Interleukine-6 Receptor



Outre le rôle de l'hepcidine dans la régulation systémique du métabolisme du fer, la régulation de ce dernier peut également s'opérer au niveau cellulaire, sans intervention de l'hepcidine (*Figure 9*).

### 1.5.3. Régulation cellulaire du métabolisme du fer

#### *- Régulation transcriptionnelle et rôle des protéines HIF*

La transcription d'un certain nombre de gènes du métabolisme du fer est régulée par les protéines HIF, principalement HIF1 et HIF2, en réaction à des stimuli liés à la concentration cellulaire en oxygène et en fer<sup>242,243</sup>. Les protéines HIF1 et HIF2 sont toutes deux impliquées dans le contrôle cellulaire du métabolisme du fer, en modulant l'expression de certains gènes en lien avec ce dernier<sup>243</sup>. En dépit du rôle dominant de l'une ou l'autre de ces protéines en fonction du gène régulé, HIF1 et HIF2 se lient toutes deux au même élément de réponse à l'hypoxie sur les promoteurs des gènes dont elles participent au contrôle<sup>243</sup>. La protéine HIF $\alpha$  est inductible, en terme d'expression transcriptionnelle et protéique, par la baisse des concentrations intracellulaires en oxygène, et forme une protéine hétérodimère avec HIF $\beta$ , décrite comme ayant une expression constitutive<sup>243</sup>. Cependant, certaines données tendent à montrer que HIF $\beta$  serait également inductible par la baisse des concentrations intracellulaires en oxygène<sup>244</sup>. La baisse des concentrations cellulaires en fer ou en oxygène, favorise la formation des hétérodimères HIF $\alpha$ /HIF $\beta$ <sup>242,243</sup>. Ces dernières migrent jusqu'au noyau, et jouent alors un rôle de facteur de transcription, en se fixant sur un élément de réponse à l'hypoxie situé en amont de gènes codants pour des protéines du métabolisme du fer<sup>242,243</sup>. Notamment, les protéines HIF activent la transcription du gène codant pour la protéine TfR1 dans les hépatocytes<sup>245,246</sup>. De même, une augmentation de l'expression de la ferroportine est observée dans les cellules de Kupffer hépatiques, les hépatocytes, ainsi que dans les entérocytes du duodénum ; outre le rôle supposé de la baisse des niveaux d'hepcidine dans cette hausse des niveaux de ferroportine, déjà décrit dans les chapitres précédents (*partie 1.5.1., pages 37 et 38*), il semble que les protéines HIF aient également un rôle direct sur la transcription du gène codant de la ferroportine<sup>235</sup>. Une augmentation de l'expression de la céruloplasmine suite à la liaison de l'hétérodimère HIF1 $\alpha$ /HIF1 $\beta$  à l'élément de réponse à l'hypoxie du gène codant pour cette protéine, a également été rapportée<sup>141,247</sup>. Cette

augmentation de l'expression transcriptionnelle de la céruloplasmine par les protéines HIF avait lieu en réaction à l'hypoxie ou à la baisse des niveaux de fer intracellulaires <sup>247</sup>. La transcription d'autres gènes du métabolisme du fer peut également être induite par les protéines HIF, comme ceux codant pour la transferrine, DMT1, Dcytb, ou encore HO-1 <sup>242,243</sup>. A l'inverse, comme évoqué un peu plus haut, la hausse des niveaux d'oxygène intracellulaire, ainsi que celle des niveaux de fer, engendrent une hydroxylation des protéines HIF $\alpha$  par les prolyl hydroxylases <sup>242,243</sup>. Les protéines HIF $\alpha$  hydroxylées sont par la suite ubiquitinées, notamment du fait de leur affinité supérieure pour la protéine Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor (VHL) faisant partie des E3 ubiquitine ligases, ceci engendrant la dégradation des protéines HIF $\alpha$  dans le protéasome <sup>242,243</sup>. Par ailleurs, la protéine Factor Inhibiting Hypoxia-inducible factor 1 (FIH1), également activé par la hausse des taux d'oxygène et de fer intracellulaires, a pour faculté d'inhiber l'activité de facteur de transcription du complexe HIF $\alpha$ /HIF $\beta$  par hydroxylation du résidu N803 des protéines HIF $\alpha$ , bloquant par là même leur interaction avec le coactivateur de transcription p300, nécessaire au rôle de facteur de transcription des protéines HIF <sup>242,243,248,249</sup>.

#### *- Régulation post-transcriptionnelle et rôle du système IRP/IRE*

Les principaux mécanismes de régulation de la concentration en fer au sein même de la cellule, sont assurés par le système Iron Regulatory Protein (IRP) / Iron Responsive Element (IRE) <sup>2</sup>. Ce système de régulation post-transcriptionnelle repose en effet sur les protéines IRP-1 et IRP-2, capables de se lier à des IRE présents sur les ARNm de certains gènes du métabolisme du fer, et de moduler par là même leur expression <sup>2</sup>. La protéine IRP-1 a la capacité d'intégrer un cluster fer-soufre de forme 4Fe-4S ; trois atomes de fer du cluster se fixeraient chacun aux résidus C437, C503, et C506 dans la structure d'IRP-1 <sup>250,251</sup>. Lorsque le cluster est fixé par IRP-1, cette protéine perd sa capacité à se lier aux IRE, et acquiert par ailleurs une activité aconitase dans le cytosol <sup>141,252,253</sup>. Cette fixation du cluster 4Fe-4S peut néanmoins être abolie par la baisse des taux de fer intracellulaires, lesquels occasionnent en effet une séparation du cluster et d'IRP-1 et une récupération de l'affinité d'IRP-1 pour IRE, associée à une perte de l'activité aconitase d'IRP-1 <sup>141,252,253</sup>. A ce titre, il semblerait que les trois résidus arginines R536, R541, et R780, participant à l'activité aconitase d'IRP-1, soient également impliqués dans la fixation d'IRP-1 aux IRE, expliquant ainsi la commutation de ces deux fonctions d'IRP-1 <sup>250,251</sup>. La protéine IRP-2 quant à elle, voit

sa synthèse augmenter lorsque la concentration en fer intracellulaire décroît <sup>254,255</sup>. A l'inverse, lorsque celle-ci augmente, le rythme de dégradation de la protéine IRP-2 est accru ; cette dégradation semble avoir lieu dans le protéasome, probablement suite à une ubiquitination <sup>255,256</sup>. Le fer donnerait lieu à la dégradation de la protéine IRP-2 par le biais d'un domaine jouant le rôle de capteur, composé de 73 acides aminés sur la protéine <sup>257</sup>. Le mécanisme suggéré serait la fixation d'atomes de fer aux résidus C168, C174, et C178 de la protéine IRP-2, donnant lieu à l'oxydation de ces mêmes résidus, avec pour conséquences l'ubiquitination d'IRP-2 et sa dégradation par le protéasome <sup>258,259</sup>. L'ubiquitine ligase E3 responsable du ciblage et de l'ubiquitination de l'IRP-2 oxydée serait la protéine Heme-Oxidized IRP-2 ubiquitin Ligase 1 (HOIL-1) ; il est par ailleurs, suggéré que le fer se liant aux cystéines d'IRP-2 et responsable de leur oxydation, soit de nature hémique <sup>260</sup>. L'implication des résidus cystéine du domaine des 73 acides aminés, dans le mécanisme de réponse au fer, est cependant remis en question par certaines études <sup>255,261,262</sup>. D'autres données suggèrent également un rôle des enzymes 2-oxoglutarate-dépendant oxygénases, comme médiateur de la dégradation d'IRP-2 induite par le fer <sup>261</sup>. Ces modifications des IRP ont pour effet d'augmenter leur interaction avec les IRE situés sur les ARNm de ferritine H, ferritine L, et TfR1 <sup>263</sup>. Cette fixation accrue des IRP sur les IRE des ARNm de ferritine H et L, à leurs extrémités 5', va compromettre la traduction de ces ARNm, engendrant ainsi une baisse des niveaux de ferritine H et L dans la cellule <sup>263</sup>. A l'inverse, l'interaction des IRP avec les IRE situés sur l'extrémité 3' des ARNm de TfR1, permet une stabilisation de ces derniers aboutissant à une hausse des niveaux protéiques de TfR1 <sup>263</sup>. Dans le cas opposé d'une augmentation de fer dans la cellule, la baisse de l'interaction des IRP avec les IRE des ARNm de ferritine et de TfR1 donne lieu à une traduction non-inhibée des ARNm de ferritine H et L, et à une dégradation accrue des ARNm de TfR1 <sup>263</sup>. Les protéines IRP régulent également les ARNm d'autres gènes en lien avec le métabolisme du fer, et peuvent notamment promouvoir la traduction des ARNm de DMT1 en se fixant sur leurs IRE 3', et à l'inverse compromettre celle des ARNm de la ferroportine, d'ALAS2, et de HIF2 $\alpha$ , en se liant à leurs IRE 5' <sup>15,255,264</sup>. Le système IRP/IRE semble donc permettre dans la cellule, un accroissement des capacités de stockage, d'export, et d'utilisation du fer, associée à une réduction des capacités d'absorption en cas d'augmentation des concentrations en fer intracellulaire, et réciproquement en cas de baisse du fer intracellulaire <sup>255,263</sup>.



## 2. Les pathologies de surcharge en fer

Outre les pathologies liées à un déficit en fer, pouvant notamment être causé par une carence martiale ou des séquestrations tissulaires du fer, les dysfonctions du métabolisme du fer comprennent également diverses pathologies de surcharge en fer ; ces pathologies caractérisées par des accumulations anormales de fer peuvent être acquises, mais un nombre important d'entre-elles sont d'origines génétiques<sup>265,266</sup>.

### 2.1. Les maladies génétiques de surcharge en fer systémique

Un nombre important de pathologies de surcharge en fer ont pour origine un déficit relatif en hepcidine ; ces pathologies sont regroupées sous le terme d'hémochromatoses, et se distinguent d'autres pathologies de surcharge, qui, bien que pouvant être accompagnées de baisses de niveaux d'hepcidine, sont provoqués par des mécanismes physiopathologiques indépendants de cette dernière<sup>2,267</sup>.

#### 2.1.1. Les maladies de surcharge hepcidino-dépendantes

##### *- L'hémochromatose de type 1*

La pathologie de surcharge en fer la plus fréquente est l'hémochromatose liée à la mutation du gène *HFE*, dite « Hémochromatose de type 1 », une maladie récessive qui dans près de 90% des cas, est due à la mutation homozygote « C282Y » résultant, sur la protéine HFE, en un remplacement de l'acide aminé cystéine 282 par un tyrosine<sup>266</sup>. La pénétrance de la pathologie causée par cette mutation est cependant incomplète<sup>268</sup>. La perte de la fonction d'HFE, du fait du rôle de cette dernière dans la transduction du signal cellulaire aboutissant à la transcription du gène *HAMP* codant pour l'hepcidine, donne lieu à un défaut d'expression du peptide lié à ce gène<sup>269</sup>. La baisse des niveaux d'hepcidine dans le sérum donne lieu à une augmentation de la libération de fer dans le plasma par la ferroportine, avec pour conséquence une hausse des concentrations de fer sérique, et de la saturation de la transferrine<sup>269</sup>. Cette augmentation excessive de la saturation occasionne la formation de NTBI, une forme biochimique de fer anormale, ayant pour particularité de pouvoir pénétrer très rapidement dans certaines cellules, notamment les hépatocytes, par le biais de Zrt and Irt-like Protein 14

(ZIP14), un transporteur spécifique dont l'expression ne semble pas subir de rétrocontrôle négatif en cas d'accroissement des stocks de fer hépatocytaires<sup>270-272</sup>. L'accumulation de ce fer au sein des cellules cibles crée alors une surcharge, notamment au niveau hépatique, chez les patients hémochromatosiques de type 1<sup>269</sup>. La surcharge hépatique en fer peut causer une fibrose hépatique ; à terme, cette dernière est susceptible d'évoluer vers une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire<sup>266,273,274</sup>. Par ailleurs, les complications de l'hémochromatose peuvent toucher d'autres organes, tels que le pancréas et le cœur, et se caractérisent respectivement par un diabète insulino-dépendant, et une cardiomyopathie donnant parfois lieu à une insuffisance cardiaque<sup>266,274</sup>. Des complications rhumatologiques peuvent également survenir, l'hémochromatose étant notamment associée à des arthrites chroniques et à l'ostéoporose<sup>266,275,276</sup>.

#### *- Les hémochromatoses de type 2 et 3*

D'autres types d'hémochromatoses, plus rares, résultent de mutations des gènes codants pour les protéines HJV, hepcidine, et TfR2, et sont répertoriées sous les appellations d'hémochromatoses de type 2A, 2B, et 3, respectivement<sup>266</sup>. Les surcharges en fer induites par les mutations homozygotes des gènes codants d'HJV et TfR2, découlent de mécanismes physiopathologiques identiques à ceux de l'hémochromatose de type 1, à savoir une perturbation du signal cellulaire sensé induire la transcription du gène de l'hepcidine, avec pour conséquences une baisse des niveaux plasmatiques du peptide<sup>97,277,278</sup>. Les hémochromatoses causées par des mutations du gène *HAMP* codant pour l'hepcidine, résultent quant à elles en l'absence de synthèse du peptide, ou potentiellement, en la synthèse d'un peptide non-fonctionnel<sup>279,280</sup>. Les hémochromatoses de type 2A et 2B sont par ailleurs classées dans la catégorie des hémochromatoses juvéniles, du fait de la précocité de la surcharge qu'elles induisent, et sont caractérisées par un phénotype plus sévère que celui rencontré dans l'hémochromatose de type 1<sup>281-284</sup>. Certaines études montrent par ailleurs que certaines hémochromatoses juvéniles ne sont pas uniquement le fait de mutations des gènes *HJV* et *HAMP*, mais résultent de digénismes, impliquant notamment des mutations du gène *HFE*, ordinairement associées aux hémochromatoses de l'adulte<sup>284-287</sup>.

#### *- L'hémochromatose de type 4B*

Un quatrième type d'hémochromatose, dite de type 4B, tient en réalité d'une résistance à l'hepcidine et non d'un déficit en hepcidine<sup>203</sup>. Cette pathologie découle en effet de mutations du gène *SLC40A1* codant pour la ferroportine, rendant ce transporteur inapte à répondre à l'interaction avec l'hepcidine ; l'absence d'internalisation et de dégradation en réponse à son interaction avec l'hepcidine, même en situation d'excès de fer, empêche de moduler la sortie du fer des entérocytes et des macrophages<sup>201,202</sup>. Ceci entraîne donc une hausse pathologique des concentrations plasmatiques en fer, avec des conséquences semblables à celles retrouvées dans les autres types d'hémochromatoses<sup>203</sup>.

### 2.1.2. Les maladies de surcharge non hepcidino-dépendantes

#### *- La maladie de la ferroportine*

La maladie de ferroportine, également connue sous l'appellation d'hémochromatose de type 4A, est une pathologie engendrant des surcharges en fer principalement macrophagiques<sup>288</sup>. Des mutations hétérozygotes du gène *SLC40A1* codant pour la protéine ferroportine, sont en cause dans cette affection à transmission dominante<sup>266,289,290</sup>. Ces dernières entraînent une incapacité de la protéine à assurer son rôle d'exportateur du fer notamment au niveau macrophagique, avec pour conséquence de cette dysfonction une rétention du fer dans les macrophages, occasionnant des surcharges notamment dans la rate et les cellules hépatiques de Kupffer<sup>288</sup>. Contrairement à l'hémochromatose de type 4B évoquée plus haut, et causée par des mutations du même gène, la maladie de la ferroportine, du moins à son stade précoce, n'est caractérisée ni par une augmentation de la saturation de la transferrine, ni par une hausse du fer sérique, ni par une surcharge hépatocytaire en fer, ceci témoignant de mécanismes physiopathologiques bien distincts entre les deux pathologies, malgré la mise en cause du même gène<sup>288</sup>.

#### *- Les mutations de SLC11A2*

Des surcharges en fer liées à des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de *SLC11A2*, gène codant de DMT1, ont été rapportées ; les caractéristiques cliniques notables dans ce type d'affections, comprennent une surcharge hépatique en fer, associée à une anémie microcytaire<sup>19,291-293</sup>. Le transporteur DMT1 joue en effet un rôle majeur dans le

transport du fer vésiculaire vers le cytosol au cours de la captation cellulaire du fer médiée par TfR1<sup>92</sup>. Ainsi, le rôle important de DMT1 dans la captation du fer par les cellules érythroïdes au cours de l'érythropoïèse, semble expliquer la présence de l'anémie<sup>294</sup>. Les raisons de la surcharge en fer hépatique, quant à elles, restent encore mal comprises<sup>295</sup>. Il apparaît de plus que toutes les mutations du gène de DMT1 ne conduisent pas à une surcharge hépatique en fer, ceci suggérant un mécanisme de surcharge dépendant potentiellement du type de mutation<sup>20</sup>.

#### *- L'atransferrinémie héréditaire*

Une autre pathologie menant à des surcharges en fer est l'atransferrinémie héréditaire ; cette affection rare causée par une mutation du gène codant pour la transferrine et résultant en une absence de transferrine dans le plasma, est en effet à l'origine d'anémies sévères, et de surcharges tissulaires en fer<sup>296-299</sup>. Le mécanisme menant à la survenue de ces surcharges serait en partie lié à la formation de NTBI, non pas du fait d'un excès de fer sérique aboutissant à une saturation trop importante de la transferrine comme dans les hémochromatoses, mais bien du fait d'une diminution de la transferrine plasmatique<sup>266</sup>. Comme dans les hémochromatoses, le NTBI induit une surcharge de par sa capacité à envahir massivement les cellules par son transporteur spécifique, sans subir de rétrocontrôle négatif<sup>272</sup>.

#### 2.2. L'acéruplasminémie héréditaire

La céruloplasmine est une cuproprotéine possédant une activité ferroxidase, et rapportée comme ayant une implication majeure dans le métabolisme du fer<sup>300</sup>. L'acéruplasminémie héréditaire est une maladie causée par des mutations homozygotes du gène codant de la céruloplasmine, aboutissant à une absence de synthèse de la protéine, ou à la synthèse d'une forme non-fonctionnelle de celle-ci<sup>300</sup>. Cette pathologie très rare dont la prévalence a été évaluée à environ une personne sur 2 millions au Japon, région du monde où la pathologie serait la plus fréquente, se transmet sur un mode autosomique récessif<sup>300,301</sup>. La maladie acéruplasminémique, du fait du rôle de la céruloplasmine dans le métabolisme du fer, résulte donc notamment en une dysfonction de ce dernier, caractérisée par des surcharges en fer au niveau hépatique, pancréatique, et cérébral<sup>300,302,303</sup>. Les différentes manifestations



cliniques de cette affection peuvent survenir à des âges variables, et comprennent principalement une anémie, un diabète de type 1, et plus tardivement, des manifestations neurologiques<sup>300,304,305</sup>. Ces dernières semblent directement liées la surcharge en fer cérébrale, probablement du fait des dommages oxydatifs causés par l'excès de fer dans les astrocytes, et peuvent notamment comprendre dysarthrie, syndrome extrapyramidal, ataxie, et démence<sup>305</sup>. Une dégénérescence rétinienne est également retrouvée de manière fréquente chez ces patients, du fait de l'accumulation de fer dans la rétine, laquelle est une extension du système nerveux<sup>304-306</sup>.

### 2.2.1. Caractéristiques moléculaires de l'acéruplasminémie héréditaire

#### *- Les mutations du gène de la céruloplasmine*

Plusieurs dizaines de mutations différentes ont été répertoriées chez l'ensemble des patients acéruplasminémiques<sup>300,301</sup>. Une majorité d'entre-elles consistent en des mutations faux-sens et des mutations par décalage du cadre de lecture ; d'autres plus minoritaires, sont des mutations non-sens et des mutations au site d'épissage<sup>300</sup>. Ces mutations donnent souvent lieu à la survenue prématurée d'un codon STOP aboutissant à la troncature de la protéine ; les génotypes des patients peuvent par ailleurs être hétérozygotes composites ou homozygotes. Concernant les conséquences des mutations sur la synthèse et la sécrétion de la protéine mature, plusieurs phénomènes sont décrits<sup>300</sup>. A ce titre, deux principaux types d'acéruplasminémie peuvent être distingués au niveau protéique : l'acéruplasminémie par absence stricte de sécrétion de la protéine, due à une rétention de celle-ci dans le réticulum endoplasmique ou à sa dégradation immédiate dans le plasma, et celle par sécrétion d'une protéine non-fonctionnelle ou à la fonctionnalité altérée, due principalement à un défaut d'intégration du cuivre à la protéine lors de son passage dans l'appareil de Golgi<sup>300,301</sup>.

#### *- Exemples de mutations menant à une acéruplasminémie stricte*

Parmi les mutations conduisant à une absence de sécrétion de la protéine, les cas cliniques présents dans la littérature fournissent quelques exemples. A ce titre, le cas d'une patiente japonaise porteuse d'une insertion de 5 paires de bases sur l'exon 7, lequel comporte normalement 140 paires de bases<sup>307</sup>. Survenant au niveau du codon correspondant à l'acide

aminé 410, la mutation a pour conséquences un décalage du cadre de lecture dès l'acide aminé 411, donnant lieu à la survenue d'un codon STOP 34 acides aminés en aval de la mutation, pour une protéine longue au totale de 445 acides aminés en théorie, contre 1046 chez le sujet sain <sup>307</sup>. Etant donné la délétion de l'extrémité C-terminale, la protéine demeure incapable d'incorporer l'atome de cuivre en principe lié à cette terminaison ; ainsi, même traduite et sécrétée, la protéine reste en théorie non-fonctionnelle du fait de son incapacité à assurer son activité ferroxidase <sup>307</sup>. Il est par ailleurs fortement suggéré dans le cas de cette mutation, soit une absence de sécrétion de la protéine dans le territoire sanguin, soit en cas d'une sécrétion, sa rapide dégradation plasmatique <sup>307</sup>. De même, les mutations non-sens Y694ter (remplacement du codon Tyrosine-694 par un codon STOP) et W858ter, occasionnent la rétention de la protéine tronquée dans le réticulum endoplasmique, résultant en l'absence totale de céruloplasmine plasmatique <sup>308-310</sup>.

*- Exemples de mutations menant à la sécrétion d'une protéine non-fonctionnelle*

Les cas d'acéruloplasminémies par sécrétion de protéines non-fonctionnelles semblent souvent en lien avec un défaut d'incorporation du cuivre à la protéine ; à titre d'exemple, plusieurs mutations faux-sens sont rapportées dans la littérature. En effet la mutations G631R (remplacement du résidu Glycine-631 par un Arginine) se situe à proximité de H637 appartenant à un des centres cuivre de type 1 présents dans la protéine <sup>311</sup>. Cette mutation résulte en la sécrétion d'apocéruloplasmine, une forme de céruloplasmine dépourvue d'atomes de cuivres, et par conséquent également privée d'activité ferroxidase <sup>311</sup>. Cette sécrétion d'apocéruloplasmine inactive est également retrouvée chez une patiente japonaise portant la mutation G969S, proche de H975 présent sur un des centres cuivre de type 1 de la protéine <sup>302</sup>. Par ailleurs, certaines mutations non-sens peuvent également aboutir à la sécrétion de la protéine, comme en témoigne la mutation R882ter, donnant lieu à la sécrétion d'apocéruloplasmine inactive <sup>310,312</sup>.

2.2.2. Acéruloplasminémie héréditaire et métabolisme du fer

*- Le phénotype martial acéruloplasminémique*

Un des critères de diagnostic de l'acéruoplasminémie homozygote est de manière évidente, l'absence de céruloplasmine détectable dans le plasma<sup>300</sup>. L'hétérozygotie est par ailleurs décrite comme étant associée à des taux de céruloplasmine sérique réduits de moitié en comparaison avec le sujet sain<sup>300,307</sup>. Les paramètres sanguins du fer dans l'acéruoplasminémie, sont caractérisés par une baisse du fer plasmatique et de la saturation de la transferrine, associée à une élévation des taux de ferritine ; des anémies microcytiques résistantes au traitement martial sont également présentes chez les patients<sup>300</sup>. Au niveau des organes, les images par résonance magnétique montrent une surcharge dans certaines régions du cerveau, notamment les ganglions de la base au niveau des noyaux caudé et putamen, ainsi qu'une surcharge hépatique<sup>302,305</sup>. En revanche, la rate ne semble pas présenter de signes de surcharge en fer chez ces patients ; de plus, les investigations histologiques montrent une surcharge hépatique majoritairement hépatocytaire, semblant épargner les cellules hépatiques de Kupffer<sup>302,308,313,314</sup>.

*- La compréhension incomplète du phénotype acéruoplasminémique*

Les caractéristiques phénotypiques tissulaires de l'acéruoplasminémie entrent en contradiction avec le rôle décrit de la céruloplasmine dans le métabolisme du fer. En effet, comme évoqué dans les chapitres précédents (*partie 1.4.1., page 34 et 35*), la céruloplasmine est décrite comme une protéine stabilisatrice de la ferroportine, notamment sur la membrane des macrophages, laissant supposer une surcharge macrophagique en fer chez les patients acéruoplasminémiques, comme dans la maladie de la ferroportine<sup>184</sup>. L'absence de surcharge splénique en fer, et la localisation majoritairement hépatocytaire de la surcharge hépatique constatée chez les patients acéruoplasminémiques, entrent donc en contradiction avec ces attentes. Par ailleurs, les différents modèles animaux acéruoplasminémiques réalisés précédemment présentent des phénotypes hépatospléniques divergents en termes de surcharge en fer (*Tableau 1*).

2.2.3. Les principaux modèles expérimentaux d'acéruoplasminémie héréditaire

*- Le modèle de Harris et collaborateurs (1999)*

Ce modèle développé sur des souris Black Swiss Webster, est le résultat d'une mutation par vecteur ciblant les exons 17 et 18, codant pour les sites de la protéine impliqués dans la formation des centres cuivre trinucéaires ; le vecteur contenait une cassette néo remplaçant les exons 17 et 18 <sup>181</sup>. Le sérum des souris homozygotes sur la mutation était totalement exempt de céruloplasmine <sup>181</sup>. Cependant, les taux d'hémoglobine, de fer sérique, et de saturation de la transferrine ne variaient pas significativement entre les animaux sauvages et les animaux homozygotes pour la mutation <sup>181</sup>. Par ailleurs, les concentrations en fer étaient significativement augmentées à la fois au niveau hépatique, dans les cellules hépatocytaires et de Kupffer, et au niveau splénique <sup>181</sup>. Le même modèle utilisée en 2001 par Meyer et collaborateurs, ne démontrait pas de hausse significative de la concentration en fer splénique chez les animaux acéruloplasminémiques ; les concentrations en fer dans le cerveau, le cœur et les reins ont par ailleurs été mesurées et ne présentaient pas de variations chez ces animaux <sup>315</sup>. Dans une étude publiée en 2004 par Cherukuri et collaborateurs, l'utilisation de la même mutation, mais sur fond génétique C57BL/6J par croisement sur plusieurs générations, comporte des souris acéruloplasminémiques, qui, à l'inverse de celles du modèle de l'étude de 1999, présentaient une baisse significative des concentrations en hémoglobine, des taux de fer sérique, et de la saturation de la transferrine <sup>316</sup>. Les concentrations tissulaires en fer n'étaient par ailleurs pas présentées dans cette étude <sup>316</sup>. En 2009, une nouvelle étude utilisant à nouveau cette même mutation sur fond génétique C57BL/6J, a été publiée par Chen et collaborateurs <sup>317</sup>. Comme dans l'étude de 1999, les animaux acéruloplasminémiques ne présentaient pas de baisse de leurs taux d'hémoglobine ; en revanche, leurs concentrations sériques en fer étaient significativement abaissées en comparaison avec les animaux contrôles, tandis que la saturation de la transferrine n'était pas communiquée par les auteurs <sup>317</sup>. Les animaux homozygotes présentaient également une hausse du fer hépatique et splénique en comparaison avec les animaux contrôles <sup>317</sup>. Les souris acéruloplasminémiques ont par ailleurs montré des concentrations en fer cérébrales, cardiaques, et rénales restant identiques entre les génotypes sauvages et mutés, tandis que la mutation engendrait une hausse de ces concentrations dans l'intestin et une baisse dans les tissus osseux <sup>317</sup>. Une étude publiée en 2015 par Jiang et collaborateurs utilise une nouvelle fois la mutation de Harris et collaborateurs, maintenue sur une lignée C57BL/6J ; les résultats montrent une baisse des taux de fer sériques ainsi qu'une hausse de la concentration hépatique en fer chez les animaux acéruloplasminémiques, tandis que les concentrations spléniques et entérocytaires en fer semblaient rester identiques malgré la mutation <sup>318</sup>. Les concentrations

en fer dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet, et le tronc cérébral ne variaient pas sous l'effet de la mutation <sup>318</sup>. Enfin, une dernière étude publiée en 2018 par Fuqua et collaborateurs utilise la mutation maintenue sur lignée C57BL/6J, et présente des souris acéruoplasminémiques anémiées ayant de plus une baisse des taux de fer sérique et de la saturation de la transferrine ; ces mêmes animaux présentent une hausse des concentrations hépatiques en fer, principalement localisée dans les hépatocytes <sup>319</sup>.

*- Le modèle de Patel et collaborateurs (2002)*

Le modèle développé par ces auteurs chez la souris C57BL/6J, résulte d'une mutation opérée grâce à un vecteur, généré par un remplacement d'un fragment de 3 kilobases (kb) contenant l'exon 1 du gène par une cassette néo <sup>306</sup>. La mutation donne lieu à une délétion d'environ 4,5 kb dans la région du gène contenant l'exon 1, et entraîne l'absence de céruloplasmine dans le sérum des souris homozygotes pour la mutation <sup>306</sup>. Ces dernières révèlent une baisse importante des taux de fer sérique, ainsi qu'une baisse de la saturation de la transferrine, malgré des taux d'hémoglobine et d'hématocrite semblant rester stables <sup>306</sup>. Il est par ailleurs observé une accumulation de fer dans les tissus du tronc cérébral (notamment le mésencéphale), du cervelet (cellules de la couche granuleuses, noyaux cellulaires profonds), de la moelle épinière cervicale, de la moelle épinière dorsale, et de la rétine <sup>306</sup>. Cependant cette accumulation de fer n'est pas retrouvée dans le cortex, les noyaux caudé et putamen, le bulbe olfactif, ou encore la moelle épinière lombaire <sup>306</sup>. Une accumulation de fer est par ailleurs observée au niveau hépatique, notamment hépatocytaire, tandis que les taux de fer spléniques ne semblent pas être impactés par la mutation <sup>306</sup>.

*- Le modèle de Yamamoto et collaborateurs (2002)*

Les travaux portant sur ce modèle ont été réalisés sur des souris de lignée BALB/c <sup>320</sup>. La mutation opérée consistait en une délétion de la majeure partie de la séquence de l'exon 1 du gène de la céruloplasmine, et résultait en une absence totale de la protéine dans le sérum des animaux comportant les deux allèles mutés <sup>320</sup>. Une baisse significative de la concentration sérique en fer, accompagnée d'une anémie microcytaire moyenne étaient présentes chez les souris homozygotes sur la mutation ; la saturation de la transferrine ne semble cependant pas avoir été mesurée dans ce modèle <sup>320</sup>. Les concentrations en fer

restaient inchangées dans le cerveau et le duodénum, et augmentaient dans le foie des animaux homozygotes sur la mutation, tant dans les hépatocytes que dans les cellules de Kupffer ; les concentrations spléniques en fer ne semblent pas avoir été mesurées par les auteurs <sup>320</sup>.

*- Le modèle de Gouya et collaborateurs (2007)*

Ces travaux ont consisté en une étude par rétrocroisements, dans laquelle figure entre-autre la comparaison entre la lignée donneuse C57BL/10ScSnA et la lignée receveuse C3H/DiSnA <sup>321</sup>. La lignée C3H/DiSnA était porteuse de la mutation non-sens constitutive R435X, au niveau de l'exon 7 du gène codant pour la céruloplasmine, au contraire de la lignée C57BL/10ScSnA ne portant pas la mutation <sup>321</sup>. La céruloplasmine et l'activité ferroxidase étaient absentes dans le plasma des souris C3H/DiSnA <sup>321</sup>. De plus, en comparaison avec la lignée C57BL/10ScSnA, les animaux C3H/DiSnA présentaient un abaissement des taux de fer plasmatiques et de la saturation de la transferrine, associé à une hausse des concentrations hépatiques en fer <sup>321</sup>. Les concentrations spléniques en fer étaient inchangées entre les deux lignées <sup>321</sup>. L'évaluation de l'effet de la mutation acéruloplasminémique à travers ce protocole expérimental présentait néanmoins une limite, liée à l'utilisation de fonds génétiques différents entre les groupes comparés <sup>321</sup>.

| Modèle                                    | Fond génétique             | Hb | Fer sérique | Sat. | CHF | Localisation Fer Foie  | CSF | [ ] Fer SNC | [ ] Fer Intestin | [ ] Fer Cœur | [ ] Fer Reins | [ ] Fer Os |
|---|----------------------------|----|-------------|------|-----|------------------------|-----|-------------|------------------|--------------|---------------|------------|
| *Modèle original (Harris, 1999)           | black Swiss-Webster        | =  | =           | =    | +   | Hépatocytes et Kupffer | +   |             |                  |              |               |            |
| Réutilisation modèle* (Meyer, 2001)       | black Swiss-Webster        |    |             |      | +   |                        | =   | =           |                  | =            | =             |            |
| Réutilisation mutation* (Cherukuri, 2004) | C57BL/6J                   | -  | -           | -    |     |                        |     |             |                  |              |               |            |
| Réutilisation mutation* (Chen, 2009)      | C57BL/6J                   | =  | -           |      | +   |                        | +   | =           | +                | =            | =             | -          |
| Réutilisation mutation* (Jiang, 2015)     | C57BL/6J                   |    | -           |      | +   |                        | =   | =           | =                |              |               |            |
| Réutilisation mutation* (Fuqua, 2018)     | C57BL/6J                   | -  | -           | -    | +   | Hépatocytes            |     |             |                  |              |               |            |
| Modèle original (Patel, 2002)             | C57BL/6J                   | =  | -           | -    | +   | Hépatocytes            | =   | +           |                  |              | =             |            |
| Modèle original (Yamamoto, 2002)          | BALB/c                     | -  | -           |      | +   | Hépatocytes et Kupffer |     | =           | =                |              |               |            |
| Modèle original (Gouya, 2007)             | C3H/DiSnA et C57BL/10ScSnA |    | -           | -    | +   |                        | =   |             |                  |              |               |            |

**Tableau 1 : Synthèse des caractéristiques phénotypiques des principaux modèles de souris acéruoplasminémiques** <sup>181,306,315-321</sup>.

- (Baisse), = (Absence de différence), ou + (Hausse) du paramètre chez les animaux acéruoplasminémiques homozygotes en comparaison aux animaux contrôles sauvages. CHF : Concentration hépatique en fer. CSF : Concentration splénique en fer. [ ] : concentration. Hb : hémoglobine. Sat. : Saturation de la transferrine. Les cases grises désignent les paramètres n'ayant pas été renseignés par les auteurs.

Il semble donc exister des disparités de phénotypes, notamment hépato-spléniques, entre les modèles expérimentaux d'acéruoplasminémie, parfois même entre plusieurs études utilisant un même modèle. Ces données tendent à montrer que, comme évoqué dans les chapitres précédents (*partie 2.2.2., page 54*), la fonction biologique rapportée de la céruloplasmine et les constats phénotypiques formulés dans l'acéruoplasminémie ne

coïncident pas. Ces constats laissent supposer que le rôle biologique de la céruloplasmine est incomplètement compris.

### 3. La céruloplasmine

La ferroxidase céruloplasmine, est connue pour être exprimée sous deux formes : la forme circulante synthétisée et sécrétée en grande majorité par les hépatocytes dans le plasma, et la GPI-céruloplasmine membranaire, notamment exprimée au sein des astrocytes ; ces deux formes sont les résultats d'épissages alternatifs des ARNm d'un même gène<sup>322</sup>.

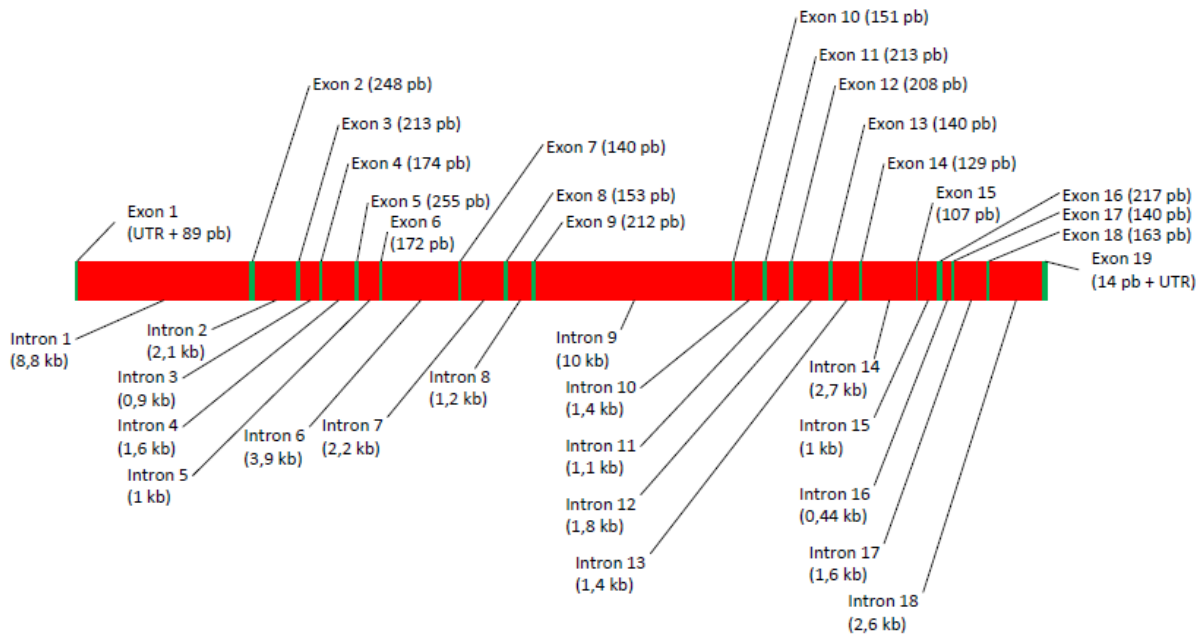
#### 3.1. Le gène codant de la céruloplasmine

La céruloplasmine est codée par un gène unique, localisé chez l'Homme sur le chromosome 3<sup>300,322</sup>.

##### 3.1.1. Structure du gène de la céruloplasmine

La région codante du gène de la céruloplasmine comprend 19 exons longs de 107 à plus de 263 paires de bases (pb), entre lesquels sont intercalés 18 introns d'une taille allant de 0,44 à 10 kb (*Figure 10*)<sup>323</sup>. Les codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TGA) de la traduction sont présents respectivement aux nucléotides codants 1 à 3 dans l'exon 1, et 3208 à 3210 dans l'exon 19<sup>323</sup>. Par ailleurs, sur les sites de branchement de tous les introns du gène, l'adénine de liaison nécessaire au passage à la conformation lasso de l'intron lors de l'épissage, est localisée à une distance comprise entre 17 et 42 pb du site accepteur d'épissage en 3' de l'intron<sup>323</sup>. Les sites d'épissage, donneurs d'une part, et accepteurs d'autre part, ont une homologie d'environ 69 à 100 % entre eux<sup>323</sup>.





*Figure 10 : Représentation des enchaînements intron/exon du gène codant de la céruloplasmine humaine*<sup>323</sup>.

**UTR : Untranslated regions**

L'expression du gène de la céruloplasmine est régulée par différents facteurs, notamment inflammatoires (*Figure 11*).

### 3.1.2. Régulation de l'expression du gène de la céruloplasmine

#### *- Régulation par l'inflammation*

Le lien entre l'inflammation et la céruloplasmine est connu ; en effet, en dépit du fait que ses niveaux plasmatiques ne soient pas toujours corrélés aux marqueurs inflammatoires classiques tels que la protéine C réactive, les niveaux de céruloplasmine sont cependant accrus dans certaines pathologies impliquant un processus inflammatoire<sup>324,325</sup>. L'inflammation, notamment en phase aiguë, joue en effet un rôle majeur dans la modulation de l'expression du gène de la céruloplasmine ; à ce titre, des données montrent que l'inflammation induite chez l'animal donne lieu à une hausse des niveaux hépatocytaires d'ARNm de céruloplasmine, suivie d'une hausse des niveaux plasmatiques de céruloplasmine<sup>322,326</sup>. D'autres données obtenues *in vitro* semblent par ailleurs montrer qu'un des effecteurs principaux de cette régulation inflammatoire est l'IL-6<sup>327</sup>. En effet, des éléments de réponse à

cette cytokine ont été identifiés sur le promoteur du gène de la céruloplasmine, ainsi que sur un amplificateur de ce dernier <sup>327</sup>. Cette induction de l'expression du gène de la céruloplasmine par l'IL-6 semble être médiée par l'activation du facteur de transcription Forkhead box protein O1 (FOXO1) <sup>328</sup>. Il apparaît en outre que d'autres cytokines aient une implication dans l'induction de la céruloplasmine ; à ce titre, l'IL-1 $\beta$  jouerait un rôle dans la régulation inflammatoire de la céruloplasmine ; cette cytokine étant capable d'induire une hausse de l'expression du gène de la céruloplasmine dans les hépatocytes et les cellules gliales <sup>322,329,330</sup>. La liaison d'IL-1 $\beta$  à son récepteur IL-1R provoquerait une activation des voies MAPK consistant en une phosphorylation accrue des protéines p38 et ERK1/2, ainsi qu'une phosphorylation accrue de NF- $\kappa$ B inhibitor alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ) et de c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) <sup>331</sup>. La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  aboutirait à une induction de la céruloplasmine par l'intermédiaire du facteur de transcription Nuclear Factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), par ailleurs co-induit par phospho-p38 <sup>331</sup>. La protéine p38 phosphorylée induirait également la transcription du gène de la céruloplasmine par activation des facteurs de transcription CCAAT-Enhancer-Binding Proteins (C/EBP) et Activator Protein 1 (AP-1) ; AP-1 serait également co-induit par phospho-ERK1/2 et phospho-JNK1 <sup>331</sup>. En outre, l'IL-1 $\alpha$  serait également à même d'induire la transcription de la céruloplasmine dans les hépatocytes <sup>330</sup>. De même, la cytokine Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) serait à même d'induire la transcription de la céruloplasmine dans les hépatocytes et les monocytes <sup>332,333</sup>.

#### *- Régulation hormonale*

L'expression du gène de la céruloplasmine est également régulé de manière importante par certaines hormones sexuelles féminines ; en effet, il apparaît que l'estradiol donne lieu à l'augmentation des niveaux d'ARNm de céruloplasmine <sup>322,334</sup>. Par ailleurs, au cours de la grossesse, les niveaux plasmatiques de céruloplasmine sont augmentés, ceci pouvant suggérer un potentiel rôle de la progestérone <sup>335</sup>. De plus, les niveaux plasmatiques de céruloplasmine sont encore davantage augmentés en cas de pré-éclampsie, en comparaison avec des femmes pour lesquelles le déroulement de la grossesse est normale <sup>322,336,337</sup>. La pré-éclampsie étant associée avec des niveaux de progestérone accrus dans le placenta mais inchangés dans le plasma comparé aux grossesses normales, le rôle de cette hormone dans l'accroissement des niveaux de céruloplasmine paraît incertain dans cette situation <sup>338,339</sup>. Par ailleurs, contrairement au traitement à l'estradiol, le traitement à la progestérone n'induit aucune

modification des concentrations plasmatiques de céruloplasmine chez l'animal, suggérant un rôle exclusif des estrogènes dans l'induction hormonale de la céruloplasmine<sup>340</sup>. De plus, des données portant sur la contraception orale montrent que les taux plasmatiques de céruloplasmine baissent chez les femmes recevant un contraceptif exclusivement progestatif, tandis que ces taux sont au contraire augmentés chez celles recevant un composé progestatif combiné à un composé estrogénique dérivé de l'estradiol, ceci semblant confirmer le rôle prépondérant de ce dernier dans l'induction de la céruloplasmine<sup>322,341</sup>.

#### *- Régulation par les métaux*

L'expression du gène de la céruloplasmine peut être induite par le biais d'une baisse des concentrations en fer au sein de l'hépatocyte ; cette baisse est en effet à même d'induire la transcription du gène<sup>141,342</sup>. A l'inverse, l'accroissement des taux de fer régule cette transcription à la baisse<sup>141,342</sup>. Ces considérations sont corroborées par des données cliniques portant sur des patients hémochromatosiques porteurs de la mutation « C282Y »<sup>343</sup>. En effet, dans le plasma de ces patients, les taux de céruloplasmine et les activités ferroxidases étaient abaissés lorsqu'une surcharge hépatique en fer non-traitée était présente, tandis que ces taux de céruloplasmine avaient des valeurs identiques à celles des sujets contrôles, chez les patients dont la surcharge avait été préalablement traitée par phlébotomie<sup>343</sup>. Par ailleurs, le cuivre serait capable d'activer la transcription du gène de la céruloplasmine, par l'intermédiaire du facteur de transcription AP-1<sup>330,344</sup>.

#### *- Régulation par l'oxygène*

De même, l'hypoxie peut avoir une influence sur l'expression du gène de la céruloplasmine ; en effet comme évoqué dans les chapitres précédents (*partie 1.5.3., pages 44 et 45*), le promoteur du gène de la céruloplasmine comporterait un élément de réponse à HIF-1<sup>247,322,345</sup>. Ajouté au fait que les niveaux d'ARNm de céruloplasmine soient décrits comme étant accrus en cas d'hypoxie, l'identification de cet élément de réponse à HIF-1 suggère que ce dernier pourrait réguler positivement l'expression du gène de la céruloplasmine<sup>247,322,345</sup>. Cependant et de manière étrange, il semblerait que la situation opposée, à savoir l'exposition à un environnement hyperbare, provoque également un accroissement des niveaux plasmatiques de céruloplasmine<sup>346</sup>.

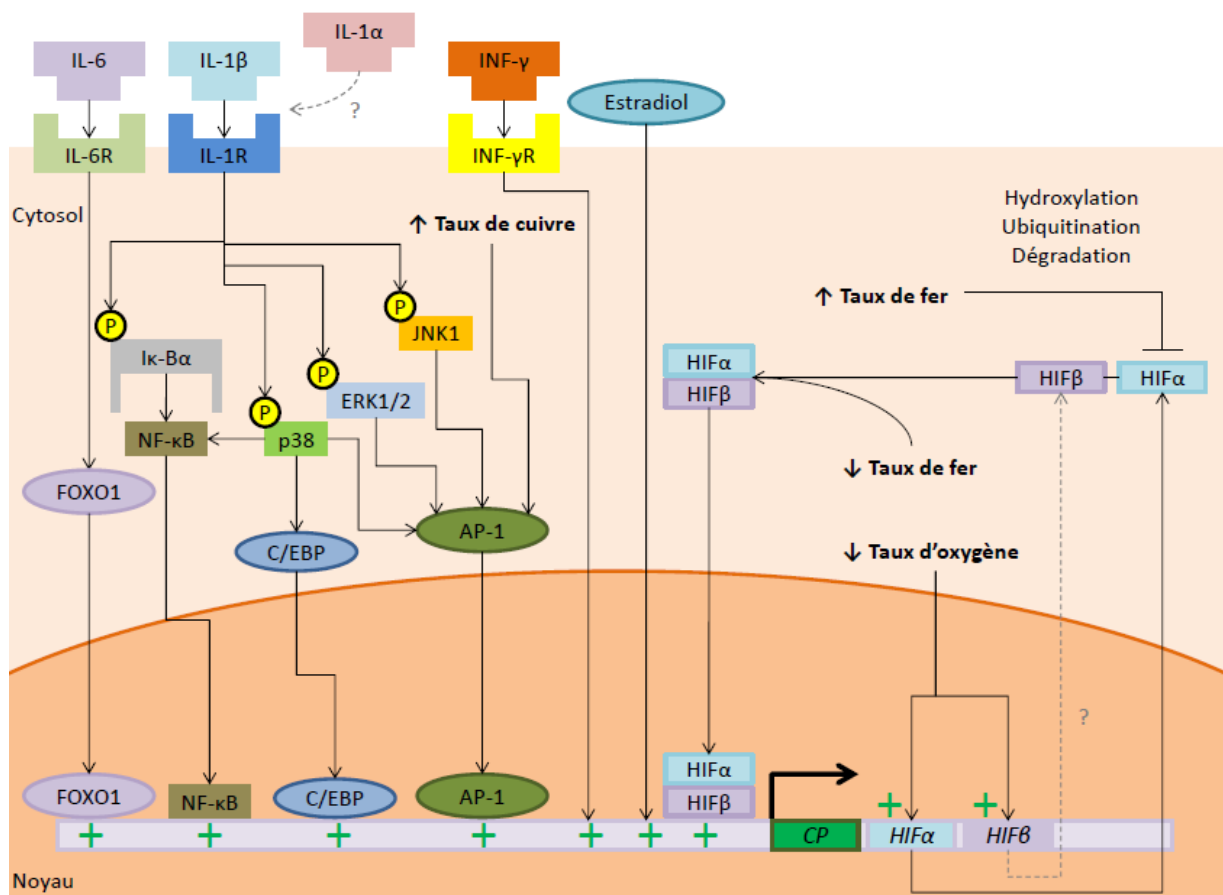


Figure 11 : Représentation des voies de régulation du gène de la céruloplasmine.

L'IL-6 se lie à son récepteur IL-6R, provoquant la transcription du gène de la céruloplasmine par l'intermédiaire du facteur de transcription FOXO1<sup>327,328</sup>. L'IL-1α semble également jouer un rôle dans l'induction de la céruloplasmine<sup>330</sup>. L'IL-1β se lie au récepteur IL-1R, provoquant la phosphorylation d'Iκ-Bα, p38, ERK1/2 et JNK1<sup>322,329-331</sup>. La forme phosphorylée de la protéine Iκ-Bα active le facteur de transcription NF-κB, lequel induit la transcription du gène de la céruloplasmine<sup>331</sup>. La forme phosphorylée de p38 participe à l'activation de NF-κB, et active également les facteurs de transcription C/EBP et AP-1, induisant à leur tour la transcription du gène de la céruloplasmine<sup>331</sup>. Par ailleurs, AP-1 est également activé par les formes phosphorylées de ERK1/2 et JNK1, ainsi que par l'augmentation des concentrations intracellulaires en cuivre<sup>330,331,344</sup>. L'IFN-γ induit également la transcription de la céruloplasmine, au même titre que l'estradiol<sup>322,332,333,341</sup>. La baisse des taux d'oxygène intracellulaires induit l'expression de HIFα, et potentiellement celle d'HIFβ ; sous l'effet de cette baisse des taux de fer, HIFα et HIFβ s'associent en une hétérodimère, à même de jouer le rôle de facteur de transcription sur le promoteur du gène de la céruloplasmine<sup>141,242-244,247,322,345</sup>. La hausse des taux de fer intracellulaires occasionne en revanche une dégradation de HIFα compromettant la formation de l'hétérodimère HIFα/HIFβ, et joue par conséquent en la défaveur de l'expression du gène de la céruloplasmine<sup>242,243,248,249</sup>.

IFN-γR : Interferon gamma Receptor

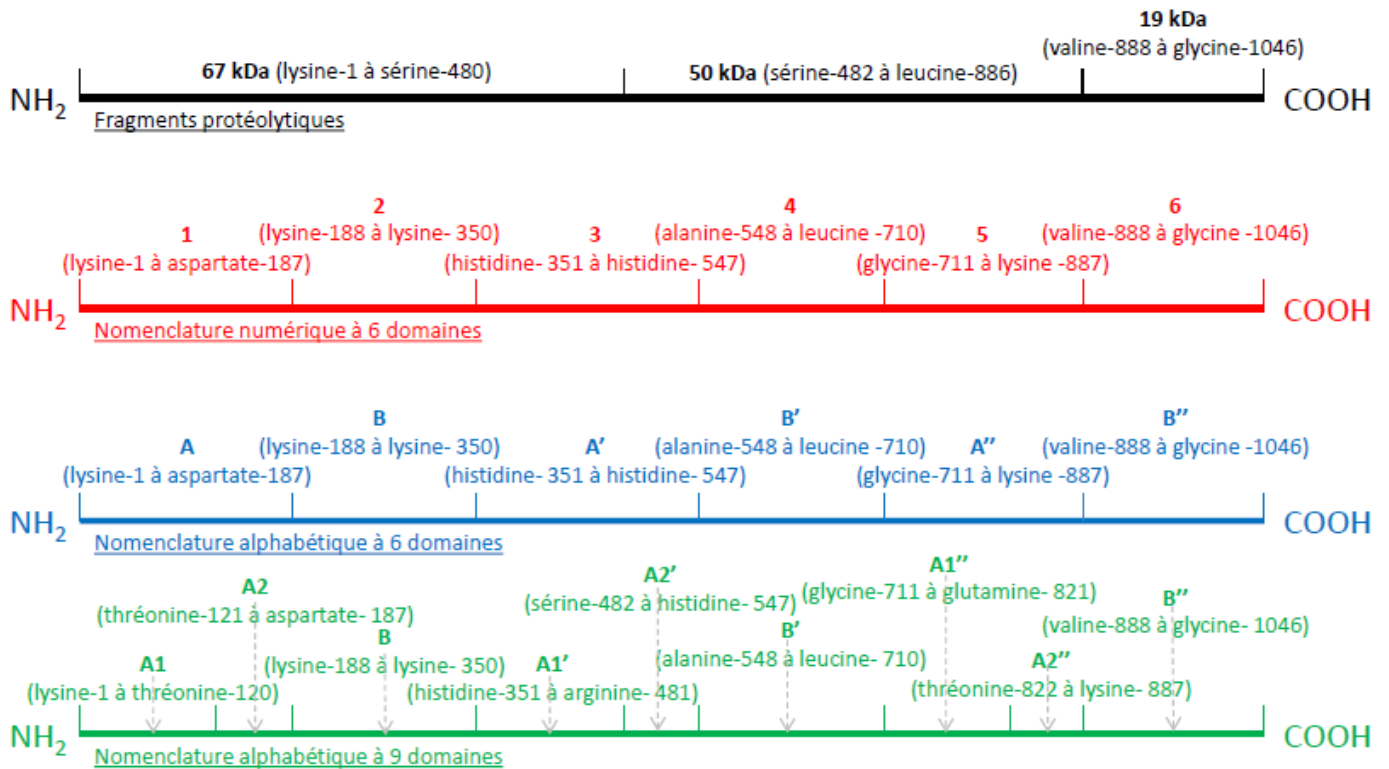
### 3.2. La protéine céruloplasmine

La céruloplasmine est une cuproprotéine de la famille des multicopper-oxydases, comportant 6 atomes de cuivre qu'elle intègre dans sa structure, et stabilisant la conformation tridimensionnelle de la protéine<sup>322,347</sup>. Ces atomes de cuivre, d'implication majeure dans la fonction de la protéine, sont à replacer dans le contexte des structures primaire, secondaire, et tertiaire de la protéine.

### 3.2.1. Structure de la glycoprotéine céruloplasmine

#### *- Structure primaire de la céruloplasmine*

La littérature portant sur la structure primaire de la céruloplasmine décrit une glycoprotéine composée d'une chaîne polypeptidique de 1046 acides aminés de 120 kDa, pour un poids moléculaire total, incluant les 4 glucosamines auxquelles elle est liée, de 132 kDa<sup>322,348,349</sup>. La protéine semble être synthétisée et sécrétée en une seule chaîne polypeptidique<sup>322,348</sup>. Elle est par ailleurs décrite comme comportant trois fragments protéolytiques ; ces derniers sont de 67, 50 et 19 kDa, dans le sens N-terminal à C-terminal respectivement<sup>350,351</sup>. Ces fragments se suivent avec des espacements d'un acide aminé : un arginine entre les fragments de 67 et 50 kDa, et un lysine entre ceux de 50 et 19 kDa<sup>348</sup>. Par ailleurs, une triplification de la protéine a été identifiée ; en effet, les 3 types de domaines successifs A1, A2, et B, sont répétés trois fois chacun avec un degré d'homologie d'environ 30 %, et dans un ordre identique sur la longueur totale de la protéine en A1', A2', B', puis A1'', A2'', et B''<sup>350,352,353</sup>. Ainsi, le fragment de 67 kDa comprend les domaines A1, A2, B, et A1', celui de 50 kDa contient A2', B', A1'' et A2'', tandis que le dernier fragment de 19 kDa contient B''<sup>350,352</sup>. Ce découpage structural en neuf domaines connaît néanmoins une variante, consistant en une structuration en six domaines A, B, A', B', A'', et B'', dans laquelle les domaines A1 et A2 sont regroupés en un seul domaine A<sup>350,352</sup>. Par ailleurs, certains auteurs se référant à la structuration en six domaines utilisent la nomenclature numérique 1, 2, 3, 4, 5, et 6 pour A, B, A', B', A'', et B'' respectivement (*Figure 12*)<sup>354,355</sup>.



*Figure 12 : Représentation de la structuration en fragments protéolytiques et en domaines de la protéine céruloplasmine<sup>350-355</sup>.*

En tant que glycoprotéine, la céruloplasmine comporte quatre glucosamines liés chacun à l'atome d'azote d'un résidu asparagine ; un premier dans le domaine A1 sur l'acide aminé N119, un second dans le domaine B sur N339, un troisième dans le domaine A1' sur N378, et enfin un dernier dans le domaine A1'' sur N743 (*Figure 13*)<sup>352,354,356,357</sup>. Certaines variations peuvent être présentes dans la structure primaire de la céruloplasmine, celles-ci se caractérisent notamment par une variabilité Glycine/Lysine au niveau des positions 79 et 449, avec pour chacune de ces deux positions, un ratio Glycine/Lysine observé à 20/80.

*- Structure secondaire de la céruloplasmine*

Ces modèles de structuration établis suite à l'étude de la structure primaire de la protéine, notamment sur la base de ses propriétés protéolytiques, trouvent en partie leur explication dans la structure secondaire de la céruloplasmine. Cette structure comprend en effet différents types de conformations ; une organisation en feuillet- $\beta$  est retrouvée sur environ 33 % des résidus, en coude- $\beta$  sur environ 31 % des résidus, tandis qu'environ 20 % des résidus sont organisés en hélices- $\alpha$  et que environ 17 % correspondent à des structures aléatoires<sup>353</sup>. Ces éléments de structure secondaire semblent effectivement expliquer certains constats en lien avec l'étude de la structure primaire de la protéine ; il est de fait observé que les points majeurs de fragmentation protéolytique tendent à correspondre à des zones inter-domaines aléatoires, tandis que les zones inter-domaines comportant une conformation en feuillet ou coude- $\beta$  ou encore hélice- $\alpha$  sont davantage résistantes à la protéolyse et tendent à rendre les domaines solidaires dans la formation d'un seul fragment protéolytique<sup>350,351,353</sup>. A titre d'exemple, les inter-domaines A1-A2 et A1''-A2'', organisés en feuillet- $\beta$  conservent cette solidarité, tandis que l'inter-domaine A1'-A2' comportant une structure secondaire aléatoire cède à la protéolyse, formant ainsi le point de rupture entre les fragments protéolytiques de 67 kDa et 50 kDa<sup>353</sup>. De même, les inter-domaines A2-B et A2'-B' organisés en hélice- $\alpha$  et coude- $\beta$  respectivement sont résistants à la protéolyse, au contraire de l'inter-domaine A2''-B'' dont la structure secondaire semble aléatoire, et qui forme le point de clivage entre les fragments de 50 kDa et 19 kDa<sup>353</sup>. En outre, la structure secondaire de la protéine repose également sur la présence de cinq ponts disulfures, liant entre eux les acides aminés : C155 à C181 (domaine A2), C257 à C338 (domaine B), C515 à C541 (domaine A2'), C618 à C699 (domaine B'), et enfin C855 à C881 (domaine A2'')<sup>350,352,354,355,358</sup>. Par ailleurs, quatre groupements sulfhydryles libres ont également été identifiés sur les positions C221 (domaine A2), C319 (domaine B), C680 (domaine B'), et C1021 (domaine B'')<sup>350,358</sup>.

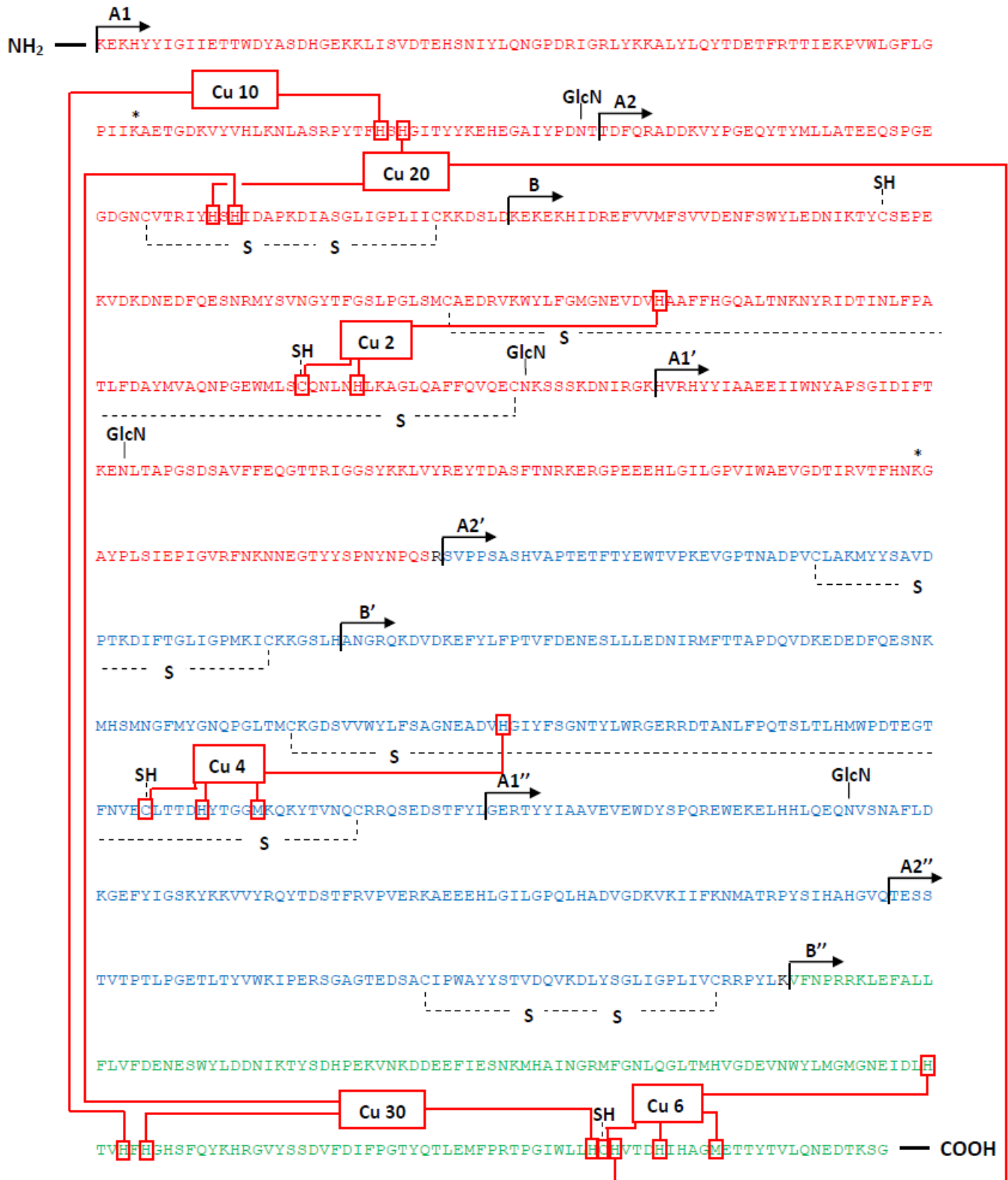


Figure 13 : Représentation de la structure primaire de la protéine céruloplasmine, accompagnée de certains éléments de sa structure secondaire et des cations de cuivre<sup>350-358</sup>.

Fragment de 67 kDa ; Fragment de 50 kDa ; Fragment de 19 kDa ; Position des glucosamines (  $\text{GlcN}$  ) ; Variabilité Glycine/Lysine (\*) ; Ponts disulfures (  $\text{---S---S---}$  ) ; Groupements sulfhydryles libres (  $\text{SH}$  ) ; Cations de cuivre et leurs liaisons (  $\text{---[ ]---[ ]---[ ]}$  )



### *- Structure tertiaire de la céruloplasmine*

La structuration primaire en six domaines décrite plus haut se retrouve dans la structure tertiaire de la protéine (*Figure 14*). En effet, les six domaines primaires de la protéine forment chacun un tonneau  $\beta$  surplombé par une longue boucle assurant la jonction entre les brins 1 et 2 du tonneau ; par ailleurs, les boucles des domaines numérotés paires et impaires sont, pour certaines d'entre-elles, liées les unes aux autres (boucle du domaine 1 avec celle du domaine 2, 3 avec 4, et 5 avec 6) <sup>355,357</sup>. Les tonneaux  $\beta$  sont organisés en deux trios : le trio des domaines 2, 4, et 6 et celui des domaines 1, 3, et 5 s'organisent chacun en triangle autour d'un même axe, mais semblent cependant être orientés de manière différente par rapport à ce dernier <sup>355</sup>. En effet, les tonneaux des domaines numérotés pairs sont orientés d'une telle manière que leur extrémité haute (coté boucle de jonction des brins 1 et 2) convergent vers l'axe, tandis qu'à l'inverse, les tonneaux des domaines impairs voient leur partie haute diverger par rapport à l'axe <sup>355</sup>.

### *3.2.2. Métaux et structure de la céruloplasmine*

#### *- Intégration des atomes de cuivre dans la céruloplasmine*

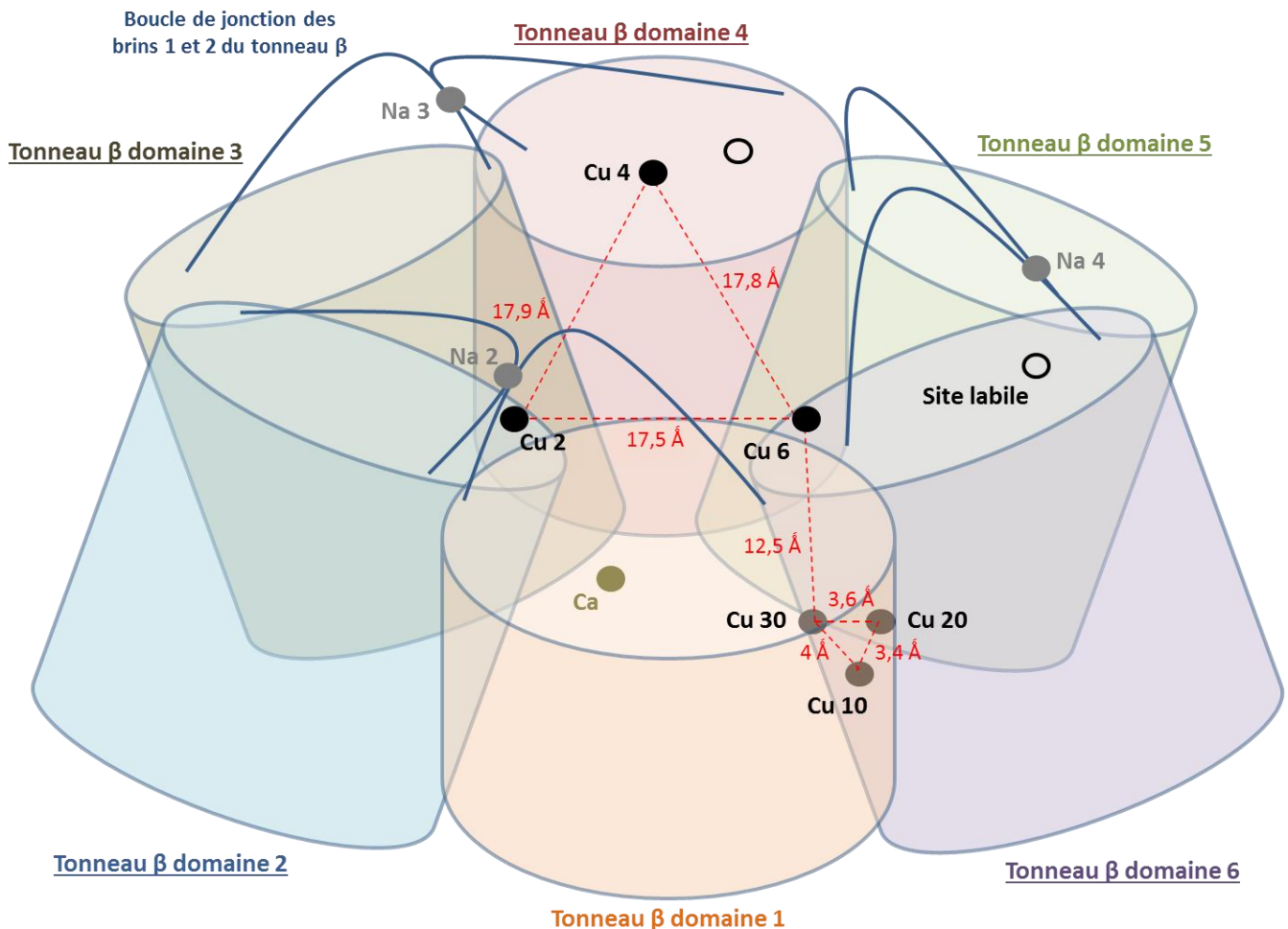
Au cours du processus de maturation de la céruloplasmine, les atomes de cuivre présents dans le cytosol des hépatocytes se lient aux protéines chaperonnes Antioxydant 1 copper chaperone (ATOX1), et migrent jusqu'aux transporteurs Copper transporting ATPase 2 (ATP7B), qui assurent leur passage dans l'appareil de Golgi, où leur intégration à la céruloplasmine a lieu <sup>322</sup>. L'intégration des atomes de cuivre à la céruloplasmine est un processus décrit comme intervenant relativement tôt suite à la synthèse de la protéine <sup>311,359</sup>. Ne nécessitant pas de caractéristiques de maturation avancée tels que la présence des glycosamines liés à l'asparagine, l'intégration des atomes de cuivre requiert cependant l'intégrité de l'ensemble des sites de liaisons au cuivre, l'absence ou le remplacement d'un acide aminé d'un des sites occasionnant effectivement un défaut total l'incorporation des atomes à la protéine <sup>311,359</sup>. L'intégration des atomes de cuivre semble en effet être un processus coopératif, la fixation des premiers atomes provoquant un changement de conformation de la protéine par allostérie, nécessaire à la fixation des atomes suivants ; il ne semble cependant pas y avoir d'ordre spécifique de fixation des atomes aux différents sites

<sup>311</sup>. Les processus de synthèse et de sécrétion de la céruloplasmine semblent indépendants des statuts d'intégration du cuivre ; en effet en cas de défaut d'incorporation du cuivre, l'apocéruloplasmine semble synthétisée et sécrétée dans des proportions et avec des cinétiques similaires à celles de l'holocéruloplasmine <sup>311</sup>. De plus, en cas de déficience en cuivre, la céruloplasmine semble malgré tout pouvoir être synthétisée sous forme d'apocéruloplasmine ; l'instabilité de cette dernière occasionne cependant sa rapide dégradation dans le plasma <sup>360</sup>.

#### *- Les centres cuivre de la céruloplasmine*

La structure tertiaire de la protéine permet la fixation de cations de cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) aux acides aminés des différents domaines de la structure primaire. En effet, la céruloplasmine renferme six cations  $\text{Cu}^{2+}$  de trois types différents dans sa structure ; trois cations de type I, un de type II et deux de type III <sup>355</sup>. Par ailleurs appelés « ions de cuivre bleu », les cations  $\text{Cu}^{2+}$  de type 1 se distinguent par leur forte absorbance à une longueur d'onde d'environ 600 nanomètres, leur détection possible par résonance paramagnétique électronique, et semblent classiquement liés dans la cuproprotéine à deux histidines, un cystéine et un méthionine <sup>350,352,353,355</sup>. Les cations  $\text{Cu}^{2+}$  de type 2, aussi appelés « ions de cuivre non-bleus » sont également détectables par résonance paramagnétique électronique et se caractérisent par leur faible absorbance à 600 nanomètres, tandis que les cations  $\text{Cu}^{2+}$  de type 3 sont indétectables par résonance paramagnétique électronique <sup>352</sup>. Séparés les uns des autres par une distance d'environ 18 angströms ( $\text{Å}$ ), les trois cations de type I sont positionnés de manière isolée dans la structure de la céruloplasmine et forment des centres mononucléaires ; ils sont numérotés Cu 2, Cu 4, et Cu 6 en référence à leur position sur les domaines 2, 4 et 6 (ou B, B', et B'') respectivement <sup>350,355,357</sup>. Le cation de type II, soit Cu 10, ainsi que les deux cations de type III, Cu 20 et Cu 30, sont tous trois regroupés à environ 4,5  $\text{Å}$  de distance les uns des autres, au niveau de l'interface des domaines 1 et 6, (soit plus précisément, des domaines A1, A2, et B''), et forment un complexe trinucéaire au cœur duquel figure une molécule de dioxygène <sup>350,355,357</sup>. Ces six cations  $\text{Cu}^{2+}$  sont chacun liés à un nombre d'acides aminés allant de deux à quatre, soit par l'atome d'azote de ce dernier dans le cas des liaisons aux histidines, soit par celui de soufre dans le cas des liaisons aux cystéines ou aux méthionines <sup>355</sup>. Ainsi les trois cations de type I sont liés aux acides aminés de leurs domaines de position respectifs ; en effet, Cu 2 est lié à H276, C319, et H324, Cu 4 est lié à H637, C680, H685, et M690, tandis

que Cu 6 forme des liaisons avec H975, C1021, H1026, et M1031<sup>350,353-355</sup>. A l'inverse les cations de types II et III du complexe trinucéaire entretiennent chacun des liaisons à la fois avec les acides aminés des domaines 1 et du domaine 6 ; ainsi, Cu 10 est lié à H101 et H978, Cu 20 se lie à H103, H161 et H1022, et Cu 30 à H163, H980 et H1020<sup>355</sup>. Chacun de ces six cations Cu<sup>2+</sup> est séparé de ses résidus de liaison par une distance allant de 1,87 à 3,32 Å<sup>357</sup>.



*Figure 14 : Représentation schématique de la structure tertiaire de la céruloplasmine et de la position des cations métalliques intégrés à la protéine<sup>350,354,355,357</sup>.*

#### *- Les autres cations intégrés à la céruloplasmine*

D'autres cations sont intégrés à la structure de la céruloplasmine ; en effet le cation calcium (Ca)<sup>2+</sup> est présent sur le domaine 1 de la protéine<sup>357</sup>. Lié à deux molécules d'eau, ainsi qu'aux acides aminés K109, Q124, D127 et D128, ce cation est suspecté de jouer un rôle

d'interaction avec le glucosamine de l'acide aminé N119 de par sa proximité d'environ 10 Å avec un des atomes de carbone de ce dernier ; Ca<sup>2+</sup> est de ce fait décrit comme possiblement impliqué dans la fixation de la céruloplasmine aux érythrocytes par les glucosamines<sup>357</sup>. Par ailleurs, trois cations sodium (Na)<sup>+</sup> sont présents dans la structure de la protéine, aux interfaces des domaines 1 et 2 (Na 2), 3 et 4 (Na 3), ainsi que 5 et 6 (Na 4) ; ces cations sont décrits comme ayant une probable implication dans la stabilité des liaisons évoquées plus haut, entre les boucles de jonction des brins 1 et 2 des tonneaux β des domaines paires et impaires<sup>357</sup>. En outre, de par sa proximité avec un site labile de liaison aux cations métalliques du domaine 6, le cation Na 4 est suspecté par certains auteurs, de jouer un rôle en lien avec les propriétés d'oxydation cationique suggérées du site labile<sup>357</sup>.

#### *- Les sites labiles de fixation des cations métalliques*

La présence de deux sites dits « labiles », pouvant recevoir des cations métalliques est décrite dans les domaines 4 et 6 ; la nature des cations semble pouvoir être multiple<sup>357,361</sup>. Ces sites sont par ailleurs décrits comme étant occupés par des cations Cu<sup>2+</sup> 50 % du temps<sup>354</sup>. Les résidus permettant la fixation des cations au niveau des sites seraient H602, E597, et D684 dans le site du domaine 4, tandis que dans le domaine 6, outre trois molécules d'eau, la fixation des cations serait assurée par les acides aminés H940, E935 et D1025<sup>354,357,361</sup>. Les caractéristiques des sites labiles suggèrent que ces derniers comportent des propriétés d'oxydation des cations métalliques<sup>357</sup>.

### 3.2.3. Expression tissulaire des différentes formes de la protéine

#### *- Expression de la forme circulante de la protéine*

Outre les hépatocytes qui expriment la majorité de la céruloplasmine circulante, l'expression de la protéine a été démontrée chez l'animal, comme ayant lieu dans d'autres tissus, notamment les glandes mammaires<sup>362</sup>. Par ailleurs, la forme sécrétée de la protéine semble pouvoir être également exprimée par des cellules circulantes telles que les lymphocytes<sup>363</sup>.

#### *- Expression de la forme membranaire de la céruloplasmine*

Dans le système nerveux central, la céruloplasmine semble exprimée par les cellules gliales, notamment les astrocytes, ainsi qu'au niveau des plexus choroïdes et des cellules leptoméningées, sous forme de céruloplasmine membranaire, enchâssée dans la membrane par son GPI<sup>364-366</sup>. Cette forme résulte d'un épissage alternatif à celui de la forme circulante, en aval de l'exon 18 du transcrit, donnant lieu à une substitution de 30 acides aminés alternatifs aux 5 derniers acides aminés présents sur la forme circulante<sup>367</sup>. La céruloplasmine membranaire semble par ailleurs exprimée dans des types cellulaires n'appartenant pas au système nerveux central, notamment ceux exprimant également la forme circulante, tels que les hépatocytes<sup>368</sup>. La GPI-céruloplasmine semble également exprimée dans les cellules de Sertoli et certaines cellules immunitaires telles que les lymphocytes et les macrophages<sup>363,368,369</sup>. Cette dernière apparaît en outre comme étant potentiellement co-localisée avec la ferroportine sur la membrane<sup>368</sup>.

#### *- Hypothèse d'une troisième forme de céruloplasmine*

Une troisième forme de céruloplasmine pourrait exister, au regard d'un transcrit alternatif identifié comme précurseur d'une protéine comportant 4 acides aminés de plus que la forme circulante, et s'exprimant exclusivement dans le placenta et les chondrocytes<sup>370</sup>.

#### 3.2.4 Activité ferroxidase de la céruloplasmine

##### *- Processus d'oxydation du fer par la céruloplasmine*

La céruloplasmine présente des caractéristiques propices à une activité enzymatique à l'égard des cations métalliques, telles qu'une répartition des charges négatives entre les larges boucles liant les brins 1 et 2 des tonneaux  $\beta$ , ceci suggérant une capacité d'attraction des ions métalliques positifs, notamment en direction des centre cuivre mononucléaires<sup>361</sup>. La céruloplasmine est en effet décrite comme pouvant oxyder différents cations ; cependant l'activité enzymatique principale de la protéine, au regard de la littérature, semble être son activité ferroxidase, exercée à l'égard de  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>361</sup>. La céruloplasmine capte un premier cation  $\text{Fe}^{2+}$  sur son site labile de fixation des cations divalents situé dans son domaine 6<sup>371</sup>. Le cation  $\text{Fe}^{2+}$  est alors oxydé par le cation  $\text{Cu}^{2+}$  présent sur le domaine 6<sup>361,371</sup>. Désormais sous

forme  $\text{Fe}^{3+}$ , le cation de fer ferrique est libéré du site labile de fixation des cations divalents, puis transféré sur le site de rétention du domaine 6 de la céruloplasmine, pour y être maintenu au moyen de quatre acides aminés chargés négativement<sup>361,371</sup>. Ce déplacement de  $\text{Fe}^{3+}$  du site de fixation des cations divalents, au site de rétention, pourrait être assuré en grande partie grâce à l'acide aminé E935<sup>354,361</sup>. Par ailleurs, le cation de cuivre du domaine 6 sollicité pour l'oxydation de l'atome de fer ferreux, et de ce fait passé à l'état réduit  $\text{Cu}^+$ , est ré-oxydé par un des cations  $\text{Cu}^{2+}$  du centre cuivre trinuélaire, lequel transfère à son tour l'électron à une des molécule d' $\text{O}_2$  du centre trinuélaire, faisant passer cette dernière à l'état réduit<sup>361,371</sup>. Un autre cation  $\text{Fe}^{2+}$  peut alors être capté par la céruloplasmine au niveau de son domaine 4, pour y subir un processus d'oxydation vraisemblablement identique au premier, et impliquant cette fois le cation  $\text{Cu}^{2+}$  du domaine 4<sup>361,371</sup>. Le transfert de ce second atome de fer oxydé vers le site de rétention du domaine 4 semble impliquer l'acide aminé E597 de manière importante<sup>354,361</sup>.

#### *- Les cinétiques enzymatiques de la céruloplasmine*

Peu d'études portent sur les cinétiques enzymatiques de la céruloplasmine. Considérant les données recueillies dans les conditions de pH et de températures les plus proches de celles du corps humain ; il apparait que dans un tampon de 0,2 molaire (M) d'acétate à pH 7 et 30°C, la céruloplasmine montre une constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 18,2 micromolaires ( $\mu\text{M}$ ) d' $\text{O}_2$  et une vitesse initiale maximale ( $V_{\text{max}}$ ) de 19,5  $\mu\text{MO}_2/\text{minute}$  pour 0,31  $\mu\text{M}$  de céruloplasmine<sup>372</sup>. Dans un tampon de 0,0133 M de phosphate, ces valeurs passaient à un  $K_m$  de 7,4  $\mu\text{M}$  d' $\text{O}_2$  et une  $V_{\text{max}}$  de 20,5  $\mu\text{MO}_2/\text{minute}$ <sup>372</sup>. Par ailleurs, à pH 7,35 et 30°C dans un tampon de 0,0133 M de phosphate, les données stœchiométriques indiquent que l'activité ferroxidase de la céruloplasmine a lieu selon un rapport de 4 cations de fer oxydés pour une molécule d' $\text{O}_2$  réduite<sup>372</sup>.

### 3.3. Rôles biologiques de la céruloplasmine

Le rôle le plus décrit de la céruloplasmine est celui d'enzyme ferroxidase ayant une implication majeure dans le métabolisme du fer ; cependant, cette protéine semble assurer d'autres fonctions biologiques moins documentées<sup>322</sup>.

### 3.3.1. Implications de la céruloplasmine dans le métabolisme du fer

#### *- Implication générale*

La céruloplasmine est connue pour être la principale ferroxidase plasmatique<sup>181,308</sup>. Il est admis que parmi ses rôles, figure celui de faciliter la libération du fer cellulaire à destination de la circulation sanguine<sup>181,182</sup>. Les données expérimentales et cliniques portant sur l'acéruloplasminémie tendent à démontrer que ce rôle est particulièrement central au niveau hépatique, cérébral, et pancréatique, du fait que ces organes soient prioritairement touchés par la surcharge en fer provoquée par l'absence de céruloplasmine<sup>300</sup>. Par ailleurs, le fait que la présence exclusive d'apocéruloplasmine inactive conduise au même phénotype de surcharge qu'une absence stricte de céruloplasmine, démontre que l'activité enzymatique de la protéine est au cœur de son rôle dans le maintien de l'homéostasie du fer<sup>300</sup>.

#### *- Rôle de la céruloplasmine dans la stabilisation de la ferroportine*

La GPI-céruloplasmine est décrite comme ayant une proximité avec la ferroportine sur la membrane des cellules, notamment des macrophages, présageant ainsi la coopération de ces deux protéines dans le processus d'excrétion du fer cellulaire<sup>368</sup>. En effet, comme évoqué dans les chapitres précédents (*partie 1.4.1., pages 34 et 35*), la céruloplasmine membranaire jouerait un rôle de stabilisation de la ferroportine sur les membranes cellulaires, notamment des astrocytes, la préservant ainsi d'une dégradation qui compromettrait la sortie du fer<sup>184</sup>. A ce titre, certains auteurs tendent à prêter à la céruloplasmine une fonction d'antagoniste à l'hepcidine, connue pour induire la dégradation de la ferroportine<sup>185</sup>. Le mécanisme suggéré consiste en une ubiquitination accrue de la ferroportine en l'absence de GPI-céruloplasmine<sup>184</sup>. En effet, l'activité ferroxidase de cette dernière à la surface des cellules permet une oxydation du fer venant d'être exporté par la ferroportine, et ce faisant, permet la réduction de la concentration du Fe<sup>2+</sup> extracellulaire ; en cas d'absence de l'activité ferroxidase assurée par la céruloplasmine, la hausse de concentration du Fe<sup>2+</sup> extracellulaire occasionnerait une rétention du Fe<sup>2+</sup> en transit au sein même de la structure de la ferroportine, donnant ainsi lieu à un changement de la conformation de la protéine, conduisant à son ubiquitination, son internalisation et sa dégradation<sup>184</sup>.

#### *- Rôle de la céruloplasmine dans la formation du complexe fer-transferrine*

L'oxydation du fer par la céruloplasmine à sa sortie de la cellule, permet la fixation du cation passé à la forme  $\text{Fe}^{3+}$  à la transferrine, la protéine de liaison du fer plasmatique assurant son transport dans l'organisme, via la circulation sanguine<sup>371,373</sup>. Durant cette étape, une interaction physique a lieu entre la céruloplasmine et la transferrine ; cette interaction est essentielle au transfert du fer à la transferrine<sup>371,373</sup>. En effet, après l'oxydation de deux atomes de fer par la céruloplasmine, ces derniers restent présents sur deux sites de rétention dans la structure de la protéine, deux molécules de transferrine se fixent alors à la céruloplasmine, permettant la formation d'un complexe<sup>371</sup>. Les deux atomes de fer oxydés migrent alors chacun jusqu'à un lobe C des molécules de transferrine, occasionnant un changement de conformation de ces dernières et aboutissant à leur désolidarisation de la céruloplasmine ; deux transferrines mono-ferriques sont alors formées<sup>371</sup>. Concernant la fixation des atomes de fer au lobe N de la transferrine, *via* le mécanisme précédemment décrit, celle-ci semble ne pouvoir avoir lieu que sur une molécule de transferrine monoférique comportant déjà un atome de fer sur son lobe C<sup>371</sup>.

#### *- Rôle potentiel de la céruloplasmine dans la captation cellulaire du NTBI*

Un rôle moins décrit de la céruloplasmine dans le métabolisme du fer a été évoqué. La protéine favoriserait notamment la captation cellulaire du fer par les hépatocytes ; cette absorption, indépendante de la transferrine, concernerait uniquement le NTBI et aurait lieu par le biais d'un mécanisme de transport spécifique aux cations trivalents<sup>342,374</sup>. Selon un mécanisme potentiel proposé par certains auteurs, le NTBI circulant sous forme  $\text{Fe}^{3+}$  serait réduit par une ferriréductase exprimée sur la membrane plasmique des cellules ; la céruloplasmine permettrait une ré-oxydation de ce fer, rendant ainsi possible son absorption par un transporteur trivalent, non-identifié, présent sur la membrane ; de cette façon, la céruloplasmine jouerait en faveur de l'absorption du fer par les hépatocytes<sup>374</sup>.

### 3.3.2. Céruloplasmine et métabolisme des métaux non-ferreux

#### *- Rôle de la céruloplasmine dans le transport du cuivre*



Le cuivre plasmatique, sous forme  $\text{Cu}^{2+}$ , est rapporté comme étant lié pour sa plus grande partie à la céruloplasmine, mais également à l'albumine grâce à un unique site de liaison au cuivre hautement affine présent sur cette protéine<sup>322,375,376</sup>. Le cuivre plasmatique circule également lié à d'autres ligands de plus bas poids moléculaire, notamment des acides aminés ; bien que plusieurs d'entre eux, tels que thréonine, semblent pouvoir se lier au cuivre dans le plasma, l'histidine semble être le ligand privilégié du cuivre parmi les acides aminés<sup>322,375,376</sup>. En tant que protéine majeure du transport plasmatique du cuivre, la céruloplasmine est décrite comme ayant un rôle particulièrement important dans le métabolisme de ce métal ; la protéine semble effectivement capable d'assurer la délivrance du cuivre à différents types cellulaires<sup>322,377</sup>. Des données montrent que certains tissus auraient une avidité supérieure pour le cuivre lié à la céruloplasmine, en comparaison à celui lié à l'albumine<sup>378</sup>. Le transfert du cuivre aux cellules par la céruloplasmine semble avoir lieu au niveau de la membrane plasmique de ces dernières<sup>379</sup>. L'holocéruloplasmine interagirait avec une réductase membranaire, potentiellement STEAP2, et libèrerait ses cations de cuivre ; ces derniers seraient réduits en  $\text{Cu}^{1+}$  par STEAP2 et importés à l'intérieur de la cellule par des transporteurs de cuivre, notamment Copper Transporter 1 (CTR1)<sup>379</sup>. Cependant, le fait que l'acéruloplasminémie héréditaire n'occasionne pas de dysfonction évidente du métabolisme du cuivre tend à nuancer l'importance du rôle de la céruloplasmine dans l'homéostasie de ce métal<sup>315</sup>. Toutefois, la céruloplasmine reste un réservoir de cuivre plasmatique majeur, contenant à elle seule environ 93% du cuivre plasmatique total<sup>380,381</sup>. En outre, même si cette fonction ne semble pas avoir de rôle biologique majeur, la céruloplasmine semble pouvoir oxyder le cuivre  $\text{Cu}^{1+}$ <sup>382</sup>.

#### *- Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation du cobalt*

Le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) est décrit comme potentiellement oxydable in-vitro par la céruloplasmine ; en effet, il a été suggéré que  $\text{Co}^{2+}$  puisse se fixer au site labile du domaine 6 avant d'y être oxydé en  $\text{Co}^{3+}$ , potentiellement par un transfert d'électron transitant par les acides aminés H940 et H975, puis Cu 6, avant d'aboutir au centre cuivre trinuéculaire après être passé par les résidus C1021 et H1020 ou H1022<sup>354,361</sup>. De même, une oxydation de  $\text{Co}^{2+}$  dans le site labile du domaine 4 est suspectée, avec un possible transfert d'électron vers le centre cuivre trinuéculaire par les résidus H602 et H685, puis les atomes Cu 4 et Cu 6 ; il

semble cependant que les électrons puissent transiter par d'autres voies impliquant d'autres acides aminés<sup>361</sup>.

### 3.3.3. Autres rôles biologiques de la céruloplasmine

#### - *Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation de l'oxyde nitrique*

Outre ses propriétés d'oxydation des ions métalliques, la céruloplasmine semble capable d'exercer cette fonction à l'égard de molécules plus complexes ; c'est notamment le cas de l'oxyde nitrique (NO), lequel peut être oxydé en  $\text{NO}^+$  par la céruloplasmine probablement *via* la réduction d'un de ses cations  $\text{Cu}^{2+}$  de type 1 en  $\text{Cu}^{1+}$ <sup>383</sup>. A ce titre, l'acéruloplasminémie semble associée chez l'homme à une altération du métabolisme du NO, caractérisée par une baisse significative de la concentration en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) dans le plasma des patients, reflétant une baisse de l'activité NO oxydase plasmatique ; cette activité oxydase précède en effet la formation de  $\text{NO}_2^-$ , consistant en l'hydratation de  $\text{NO}^+$  en acide nitreux ( $\text{HNO}_2$ ) suivi d'une perte d'ion  $\text{H}^+$  aboutissant à la molécule  $\text{NO}_2^-$ <sup>383</sup>. Compte tenu de ses propriétés d'oxydation du NO, la céruloplasmine est supposée pouvoir intervenir dans la modulation de la vasomotricité et de la réponse aux phénomènes ischémiques et hypoxiques<sup>383</sup>. De plus, la céruloplasmine exprimée dans les cellules gliales pourrait participer à la hausse d'activité de la NO synthase, en réponse à un stimuli inflammatoire<sup>384</sup>. Cependant, le rôle de la céruloplasmine dans le métabolisme du NO semble être minime, notamment compte tenu du fait que le NO soit majoritairement métabolisé au sein des cellules, et non dans le plasma<sup>385</sup>.

#### - *Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation des amines biogènes*

La céruloplasmine jouerait par ailleurs un rôle dans le métabolisme des certains amines biogènes de faible poids moléculaire<sup>322,354,386</sup>. Une activité d'oxydation de la céruloplasmine à l'égard d'amines biogènes a en effet été recensée ; cette oxydation concernerait notamment la sérotonine, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline<sup>322,354,386</sup>. L'oxydation de ce type de médiateurs par la céruloplasmine, ou par d'autres cuproprotéines ayant une activité oxydase, les inactiverait et jouerait par ce biais un rôle de régulation de l'activité de ces dernières<sup>322</sup>.

### *- Rôle de la céruloplasmine dans l'oxydation des lipides sanguins*

La céruloplasmine possède des propriétés d'oxydation des lipides de type Low Density Lipoprotéin (LDL), médiées par les atomes du cuivre présents dans sa structure ; il est rapporté que les deux isoformes de la céruloplasmine sont à même d'oxyder les LDL dans des proportions similaires <sup>333,387</sup>. Cependant, contrairement à la monomère circulante intacte de 132 kDa, la céruloplasmine à l'état de fragment protéolytique d'environ 115 kDa est décrite comme ayant des propriétés antioxydantes à l'égard des LDL, malgré une activité oxydase présentée comme étant relativement conservée <sup>387</sup>. Les effets de la céruloplasmine sur l'état d'oxydation des LDL, variables en fonction de l'intégrité de la protéine, laissent à penser que l'enzyme peut également jouer un rôle dans le métabolisme des lipides sanguins <sup>387</sup>.

### *- Fonctions antioxydantes de la céruloplasmine*

La céruloplasmine est également décrite comme ayant des propriétés antioxydantes ; en effet, il semblerait que la protéine inhibe les réactions d'oxydation causées notamment par l'anion superoxyde <sup>333,388</sup>. Par ailleurs, de par son activité ferroxidase rapportée comme favorisant l'excrétion du fer cellulaire, la céruloplasmine limite les réactions de Fenton au sein des cellules, cette dernière consistant en la formation de radical hydroxyle à partir de fer ferreux et de peroxyde d'hydrogène <sup>110,141,182</sup>. De cette manière, la céruloplasmine aurait un potentiel effet protecteur contre les dommages oxydatifs causés à l'encontre de différentes structures cellulaires ; ce rôle protecteur de la protéine contre les dommages oxydatifs semble confirmé par la hausse de peroxydation lipidique observée dans les tissus cérébraux des patients acéruloplasminémiques, notamment les noyaux caudé et putamen <sup>389,390</sup>.

## CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Le principal rôle biologique rapporté de la céruloplasmine est d'oxyder le fer sortant des cellules, assurant ainsi la liaison du fer ferrique à la transferrine, sa protéine de transport plasmatique. De plus, l'activité ferroxidase de la céruloplasmine est décrite comme étant nécessaire, notamment dans les macrophages, au maintien de l'expression membranaire de la ferroportine, la protéine d'export du fer cellulaire. De ce fait, la céruloplasmine est considérée comme essentielle à la sortie du fer macrophagique.

Cependant, chez les patients atteints d'acéruoplasminémie héréditaire, une pathologie génétique aboutissant à un déficit de céruloplasmine et d'activité ferroxidase plasmatique, il semble qu'aucune surcharge significative en fer ne soit rapportée dans la rate, principal organe de résidence des macrophages. De même, les cellules hépatiques de Kupffer, soit les macrophages résidents du foie, ne sont sujet à aucune surcharge en fer chez ces patients, alors même que leurs hépatocytes sont à l'inverse surchargés en fer.

Un paradoxe existe donc entre la fonction rapportée de la céruloplasmine dans la sortie du fer macrophagique, et le phénotype hépatosplénique exprimé par les patients acéruoplasminémiques. Dès lors, il semble que le rôle biologique exact de la céruloplasmine demeure à ce jour incomplètement compris. De plus, les modèles animaux utilisés jusqu'alors ne permettent pas de comprendre ce phénotype hépatosplénique acéruoplasminémique.

Notre hypothèse est que la céruloplasmine n'est pas indispensable à la sortie du fer macrophagique, et que des mécanismes sans lien direct avec le rôle rapporté de la céruloplasmine sont à l'origine du phénotype hépatosplénique acéruoplasminémique. Une meilleure compréhension de ce dernier et du rôle de la céruloplasmine, sont les objectifs de ce travail de thèse, lequel sera développé en deux parties distinctes, présentant :

- L'acquisition de données relatives au phénotype des patients acéruoplasminémiques homozygotes, au moyen d'une synthèse des cas cliniques rapportés dans la littérature, afin de confirmer le phénotype hépatosplénique considéré.
- Le développement et la caractérisation d'un nouveau modèle de rats acéruoplasminémiques, dans le but, d'une part de reproduire le phénotype hépatosplénique constaté dans l'acéruoplasminémie humaine, et d'autre part de tenter d'explorer les mécanismes conduisant à ce phénotype afin de mieux comprendre le rôle de la céruloplasmine.

*SECTION 1: SYNTHÈSE DES CAS CLINIQUES D'ACERULOPLASMINÉMIE  
HÉRÉDITAIRE PRÉSENTS DANS LA LITTÉRATURE*

**Article soumis pour publication :**

**“The liver and spleen iron load phenotype in hereditary aceruloplasminemia point out a missing link in iron metabolism.”**

## Résumé :

L'acéruplasminémie héréditaire est une maladie génétique rare de transmission autosomique récessive, causée par des mutations du gène codant pour la céruloplasmine, et donnant lieu à une absence de céruloplasmine, ou à une abolition de son activité ferroxidase. La pathologie est caractérisée par de basses concentrations en fer dans le plasma, associées à une saturation de la transferrine basse. Des surcharges en fer ont par ailleurs lieu chez les patients au niveau hépatique, pancréatique, et cérébral. Compte tenu de la rareté de la pathologie et des données cliniques disponibles, notre objectif était rassembler les cas d'acéruplasminémie publiés dans la littérature, afin d'établir une synthèse des caractéristiques phénotypiques de la pathologie.

Une recherche a été réalisée sur les bases de données bibliographiques en utilisant les mots clef : « aceruloplasminemia », « hereditary aceruloplasminemia », « genetic aceruloplasminemia », « aceruloplasminaemia », « hypoceruloplasminemia », « ceruloplasmin mutation ». Une recherche complémentaire a été réalisée en utilisant les références bibliographiques des articles trouvés grâce à la recherche par mots clefs.

92 patients ont été identifiés ; les caractéristiques relevées étaient des taux de céruloplasmine plasmatiques très bas, ou indétectables, au même titre qu'une activité ferroxidase plasmatique, très basse ou indétectable, lorsqu'elle était évaluée. Pour la plupart, les patients souffraient de complications, notamment un diabète et des troubles neurologiques. Les concentrations plasmatiques en fer ainsi que les saturations de la transferrine étaient basses, et souvent associées à une anémie. Une surcharge hépatique en fer majoritairement hépatocytaire, évaluée par IRM et colorations de Perls, était présente chez les patients, tandis qu'aucune surcharge splénique en fer n'était identifiable.

Les données cliniques recensées dans cette synthèse, montrent une absence de surcharge en fer dans les macrophages, malgré le rôle rapporté de la céruloplasmine dans la sortie du fer macrophagique. Ainsi, un paradoxe existe entre le rôle biologique de la céruloplasmine et le phénotype hépatosplénique rencontré dans l'acéruplasminémie héréditaire. Ces données suggèrent donc que la physiopathologie de l'acéruplasminémie est incomplètement comprise.

## **The liver and spleen iron phenotypes in hereditary aceruloplasminemia point out a missing link in iron metabolism**

Thibault Cavey, Moussa Kenawi, Luis Cano, Martine Ropert, Pierre Brissot, Olivier Loréal.

INSERM, Univ Rennes, INRA, CHU Rennes, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer),  
F-35000 Rennes, France

Running Title : Iron load in hereditary aceruloplasminemia

### **CORRESPONDING AUTHOR :**

Olivier Loréal, INSERM U1241, CHU Rennes, Rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

Mail : [olivier.loreal@univ-rennes1.fr](mailto:olivier.loreal@univ-rennes1.fr)

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank the Fondation Maladies Rares, the Région Bretagne (MK), the Association Fer-Métaux Essentiels-Recherche- Santé (AFeMERS), and the Association Hémochromatose Ouest and Fédération Française des Associations de Malades de l'Hémochromatose for their support.

### **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest regarding this work.

**Key Words** : iron overload; Ceruloplasmin; Iron metabolism; Rare Disease; Genetic Disease.

## Introduction

Hereditary Aceruloplasminemia (HA –OMIM #604290) is a rare recessive genetic disease related to mutations within the *CP* gene encoding the ceruloplasmin protein.<sup>1-4</sup> HA is characterized, by low plasma iron concentration and microcytic anemia associated to iron overload targeting the liver, the pancreas but also, which is unique during systemic genetic iron overload diseases, the retina and the brain.<sup>5,6</sup> Both iron-related neurodegeneration and limited efficacy of chelators to remove brain iron, make the prognosis of HA severe.<sup>6,7</sup>

Alternative splicing of the *CP* gene generates two ceruloplasmin proteins: one is secreted in plasma by hepatocytes, the second is a cell membrane anchored form (CP-GPI), expressed especially on astrocytes.<sup>5,6,8</sup> Ceruloplasmin activity is linked to its ferroxidase property<sup>5,9</sup> which transforms ferrous iron, exported from cells by ferroportin, especially from macrophages<sup>10</sup>, into ferric iron form, thus allowing its interaction with transferrin.

Mechanisms leading to HA are attributed to a loss of the ceruloplasmin-related ferroxidase activity<sup>5,6,10</sup> decreasing iron supply to plasma. Macrophages should thus be iron overloaded, similarly to findings in ferroportin disease (FD)<sup>11,12</sup> related to mutations in the *SLC40a1* gene encoding the ferroportin. However, experiments in *Cp*<sup>-/-</sup> mice models and cultured cells provide conflicting results<sup>10,13,14</sup>, and it has been suggested that hepatocytes are the main cells that are iron loaded in the liver.

To progress in the understanding of the HA, we systematically characterized the hepato-splenic phenotype in previously published case reports to explore the iron balance between hepatocytes and macrophages.

## Methods

The very low prevalence of HA led us to perform a literature search of reported clinical cases in Medline until March 2018, by using the following keywords: aceruloplasminemia, hereditary



aceruloplasminemia, genetic aceruloplasminemia, aceruloplasminaemia, hypoceruloplasminemia, ceruloplasmin mutation. It was completed by a manual search within the reference sections of the articles. Recorded data are presented as supplemental material S1. References of clinical reports used in the letter and synthesis are presented in the supplemental material section (S2).

## Results and Discussion

Ninety-two different patients were identified. Ceruloplasminemia, when reported, was extremely low or not detectable (n=70), or very low (n=8) likely depending from the assay method and limit of quantifications. Ferroxidase activity, studied in 16 patients, was either undetectable (n=8) or very low (n=8). Homozygous or compound heterozygous *CP* gene mutations, were determined in 71 patients. According the reports, serum iron concentration and transferrin saturation were strongly decreased (Table 1), and biochemical or physical (MRI) liver iron quantification and/or Perls staining performed in liver slices, demonstrated hepatic iron excess in all evaluated patients. Higher serum ferritin levels were found in males (supplemental data, S1) in the whole population, and in japanese or european subgroups. An anemia was reported in 51 cases, absent in 17 cases and not reported in 24 cases.

Patients were mostly from Asia (n=51; 41 from Japan), whereas 35 were Europeans, 6 from the American continent, and 1 from Oceania. The situation initiating the diagnostic procedure was identifiable for 84 patients: neurological symptoms (n=45), family background (n=19), anemia (n=5) diabetes (n=5), abnormal iron parameters (n=6), and non-specific signs (n=4). Eighty-six percent of patients (n= 80) presented at least one classical symptom of HA previously reported in their past-history: diabetes, microcytic anemia, neurological symptoms, iron metabolism-related signs - which should have led to an earlier diagnosis.

The age at diagnosis was  $50.4 \pm 11.4$  years.

The development of iron overload in HA is supposed to involve the loss of ferroxidase activity<sup>5,6</sup>, that limits iron release, especially from macrophages. However, histopathological and MRI data did

not fit with this hypothesis. Histological studies, performed in 50 liver biopsies, reported 36 times an hepatocyte predominant localization of iron deposits, whereas in Kupffer cell (KC) the absence of significant iron deposits was mentioned in 10 cases, and only small amount were reported in 10 cases. Moreover, in 30 patients for whom no comment was made on KC, 9 iron-stained liver slice photographs were presented, and iron deposits appeared in hepatocytes but were barely visible in KC, if any. Photographs of iron staining found in 8 additional reports further supported predominant iron deposition in the hepatocytes.

Such findings contrast with observations during FD, the archetype of impaired cellular iron export, characterized by iron overload in KC.<sup>11</sup> Moreover, focusing on MRI illustrations find in reports, we did not find a clear hyposignal in spleen that would have supported iron overload in spleen. This was in deep contrast with to the HA iron overloaded liver (“black liver”), and with the usual massive splenic iron excess observed in the FD, related to macrophage iron deposition and providing a critical argument for the diagnosis guidance.<sup>12</sup> Controversial data are reported in spleen of *Cp*<sup>-/-</sup> mice. Harris et al. found spleen iron accumulation, together with an impairment of iron release from macrophages and hepatocytes.<sup>10</sup> However, Yamamoto et al.<sup>13</sup> did not mention iron accumulation in the spleen, and Gouya et al.<sup>14</sup> reported both the absence of iron accumulation in spleen of *Cp*<sup>-/-</sup> mice and a decrease of iron release from hepatocytes but not from macrophages. An impact of ceruloplasmin on hepatic iron mobilization is supported by the improvement of iron release from perfused liver obtained from pigs with severe ferroxidase activity decrease.<sup>15,16</sup> It is noteworthy that a decrease of the ferroportin protein expression has been reported in the liver of two HA patients<sup>17</sup>, and that data obtained on Hela cells suggests a stabilizing role of the CP-GPI on ferroportin protein<sup>17</sup>.

In hemochromatosis<sup>18</sup>, hepcidin deficiency induces a transferrin saturation increase, with the appearance of non-transferrin-bound iron (NTBI), the final effector of hepatocyte iron overload. In HA, the authors reported low levels of serum hepcidin in five of 9 evaluated patients and normal

values for three patients. A low hepcidin/ferritin ratio, witness of hepcidin deficiency during hemochromatosis<sup>19</sup>, is reported in three patients<sup>20</sup>. Moreover, a porto-centrolobular decreasing gradient of hepatocytic iron deposits, similar to what is found in hemochromatosis<sup>21</sup>, supporting hepcidin deficiency, was reported in 6 cases, visible on additional photographs in 2, and reported absent once. NTBI was not detected in the only HA patient who was checked for it<sup>22</sup>. It is noteworthy that <sup>59</sup>Fe isotopic studies performed in 5 patients were consistent with an increase of plasma iron clearance whereas other parameters did not provide unambiguous results. This was different from data in *Cp*<sup>-/-</sup> mice in which a normal timing of tissue iron distribution was reported.<sup>10</sup> The differences could be related to iron requirement for erythropoiesis in response to anemia in patients, whereas *Cp*<sup>-/-</sup> mice were not anemic.<sup>10</sup> Hepcidin deficiency in HA could also be due, like in beta-thalassemia<sup>23</sup>, to negative signals related to anemia/hypoxia<sup>24</sup> and/or to erythropoietin.<sup>25</sup> Low transferrin saturation levels could also decrease hepcidin expression. Links between *Cp* and *Hfe* genes have been reported in mice<sup>14</sup>, but without argument for a synergistic effect of *Hfe* and *Cp* gene mutations.

In conclusion, in HA, the iron hepato-splenic phenotype suggests that: i) the absence of ceruloplasmin does not prevent iron mobilization from macrophages; ii) other mechanisms than decreased ferroxidase activity could be involved in the development of iron excess. Further understanding of the mechanisms underlying this unexpected hepato-splenic iron phenotype could help explain how brain iron excess, a major issue for HA patients, can develop.

**Authorship** : TC collected and interpreted the data, performed statistical analysis and contributed to write the paper. MK contributed to interpretation of data, scientific discussion and to write the paper; LC contributed to statistical analysis and to write the paper; MR and PB contributed to interpretation of data and to write the paper; OL designed the study, collected and interpreted the data and wrote the paper.

**Acknowledgements.** The authors thank the Fondation Maladies Rares, The Région Bretagne (MK), the Association Fer-Métaux Essentiels-Recherche- Santé (AFeMERS), the Association Hémochromatose Ouest and the Fédération Française des Associations de Malades de l'Hémochromatose (FFAMH) for their support.

**Conflict of interest** : The authors have no conflict of interest regarding this work.

## References

1. Miyajima H, Nishimura Y, Mizoguchi K, et al. Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology*. 1987;37(5):761–7.
2. Logan JI, Harveyson KB, Wisdom GB, Hughes AE, Archbold GP. Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus. *Qjm*. 1994;87(11):663–70.
3. Yoshida K, Furihata K, Takeda S, et al. A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet*. 1995;9(3):267–72.
4. Morita H, Ikeda S, Yamamoto K, et al. Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann. Neurol*. 1995;37(5):646–56.
5. Harris ZL. Aceruloplasminemia. *J. Neurol. Sci*. 2003;207(1–2):108–109.
6. Kono S. Aceruloplasminemia: an update. *Int Rev Neurobiol*. 2013;110:125–51.
7. Vroegindewij LHP, van der Beek EH, Boon AJW, et al. Aceruloplasminemia presents as Type 1 diabetes in non-obese adults: a detailed case series. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc*. 2015;32(8):993–1000.
8. De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, et al. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *Embo J*. 2007;26(12):2823–31.
9. Osaki S, Johnson D, E. F. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem*. 1966;241:2746–2751.
10. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1999;96(19):10812–7.
11. Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32(1):131–8.
12. Pietrangelo A. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica*. 2017;102(12):1972–1984.

13. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, et al. Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1588(3):195–202.
14. Gouya L, Muzeau F, Robreau AM, et al. Genetic study of variation in normal mouse iron homeostasis reveals ceruloplasmin as an HFE-hemochromatosis modifier gene. *Gastroenterology*. 2007;132(2):679–86.
15. Lee GR, Nacht S, Lukens JN, Cartwright GE. Iron metabolism in copper-deficient swine. *J. Clin. Invest*. 1968;47(9):2058–2069.
16. Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I. *J. Biol. Chem*. 1971;246(9):3018–3023.
17. Kono S, Yoshida K, Tomosugi N, et al. Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin-mediated internalization of ferroportin. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802968-975.
18. Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, et al. Haemochromatosis. *Nat. Rev. Dis. Primer*. 2018;4:18016.
19. van Dijk BAC, Laarakkers CMM, Klaver SM, et al. Serum hepcidin levels are innately low in HFE-related haemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels. *Br. J. Haematol*. 2008;142(6):979–985.
20. Finkenstedt A, Wolf E, Hofner E, et al. Hepatic but not brain iron is rapidly chelated by deferasirox in aceruloplasminemia due to a novel gene mutation. *J Hepatol*. 2010;53(6):1101–7.
21. Deugnier YM, Loréal O, Turlin B, et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. *Gastroenterology*. 1992;102(6):2050–9.
22. Loréal O, Turlin B, Pigeon C, et al. Aceruloplasminemia: new clinical, pathophysiological and therapeutic insights. *J Hepatol*. 2002;36(6):851–6.

23. Camberlein E, Zanninelli G, Detivaud L, et al. Anemia in beta-thalassemia patients targets hepatic hepcidin transcript levels independently of iron metabolism genes controlling hepcidin expression. *Haematologica*. 2008;93(1):111–5.
24. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007;117(7):1926–32.
25. Kautz L, Jung G, Valore EV, et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. 2014;46(7):678–84.

**Table 1**

|  | <b>N</b>  | <b>Mean value</b> | <b>Standard deviation</b> | <b>Range</b>    |
|--|-----------|-------------------|---------------------------|-----------------|
| <b>Age at diagnosis</b>                      | <b>90</b> | <b>50.5</b>       | <b>11.4</b>               | <b>16-70</b>    |
| <b>Diagnosis delay</b>                       | <b>78</b> | <b>10.8</b>       | <b>11.3</b>               | <b>0-44</b>     |
| <b>Serum iron (<math>\mu\text{M}</math>)</b> | <b>60</b> | <b>5.5</b>        | <b>4.4</b>                | <b>0.5-33.8</b> |
| <b>Transferrin saturation (%)</b>            | <b>35</b> | <b>10.6</b>       | <b>6.7</b>                | <b>3-45</b>     |
| <b>Ferritinemia (ng/ml)</b>                  | <b>80</b> | <b>1197</b>       | <b>761</b>                | <b>85-3530</b>  |

**Table 1: Bioclinical findings in AH Patients.** N: number of patients for whom the corresponding data was available. The transferrin saturation values were either directly obtained from the reports, or calculated from the serum iron concentration and total iron binding capacity indicated in the report.



## **Supplementary data S1**

### ***Recorded data***

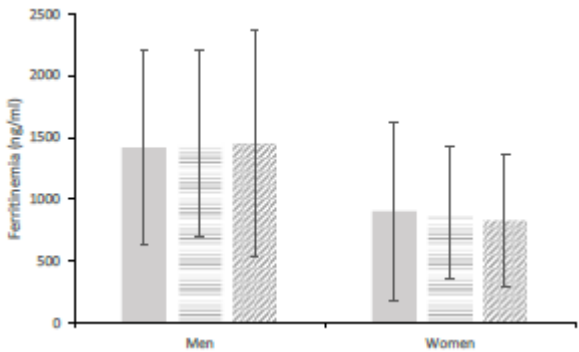
The following data were recorded, when available: continent and country of the patient; signs triggering the procedure leading to the HA diagnosis; age at diagnosis; first symptom belonging to the classical HA picture and age of appearance when reported, allowing the calculation of diagnostic delay between the first sign and the diagnosis; presence of neurological symptoms and age of appearance; diabetes and its age of appearance; anemia and its age appearance with microcytosis or not; serum ceruloplasmin concentration; ferroxidase activity; serum iron and copper concentrations; transferrin saturation level when reported or calculated from the total iron binding capacity (TIBC) ; ferritinemia; Hb levels, mean corpuscular volume (MCV), reticulocytes; iron staining in bone marrow; <sup>59</sup>Fe isotopic studies; histopathologic study of liver biopsy including presence of iron deposits in hepatocytes and/or sinusoidal cells evaluated by Perls staining, fibrosis, steatosis, hepatitis, inflammation; publication of iron staining pictures of liver biopsy; abdominal MRI with presence or not of iron excess in the liver and spleen; MRI pictures of liver and spleen; brain MRI : presence of iron deposits; nucleotide mutations within the *CP* gene and consequences on peptide sequence; liver iron concentration (LIC) determined by biochemical assay, MRI or SQUID (n=1); recorded treatment, with their efficacy and tolerance.

### ***Statistical analysis***

The SPSS software was used to analyze the data. Non-parametric Spearman rank test, Kruskal Wallis and Mann and Whitney tests were used when appropriate. Differences for qualitative values between groups were studied using Chi-2 test. P values < 0.05 were considered statistically significant.



**Supplementary data S3**



**Serum ferritin levels in men and women.** Whole population: grey ; european population: horizontal lines ; japanese population: oblique line. The difference between men groups and each respective women group were significant:  $p < 0.0001$  between men and women in the whole population;  $p < 0.04$  between men and women of the european population and  $p < 0.08$  between men and women of the japanese population.

*SECTION 2: CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MODELE DE RATS  
ACERULOPLASMINEMIQUES, ET EXPLORATIONS DES MECANISMES A L'ORIGINE  
DU PHENOTYPE HEPATOSPENIQUE EXISTANT DANS L'ACERULOPLASMINEMIE*

**Article publié dans “The FASEB Journal” :**

**“Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload : lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia.”**

## **Résumé :**

Au regard du rôle biologique de la céruloplasmine, décrite comme nécessaire à la sortie du fer macrophagique, l'absence de surcharge en fer dans les macrophages hépatiques et spléniques des patients acéruoplasminémiques met en lumière un paradoxe, suggérant une connaissance incomplète du rôle biologique exact de la céruloplasmine. Cette idée est supportée par le fait que les modèles de souris acéruoplasminémiques réalisés présentaient des phénotypes divergents. Notre objectif était de développer et de caractériser un modèle original de rats acéruoplasminémiques, afin de reproduire le phénotype hépatosplénique humain et de mieux comprendre le rôle biologique de la céruloplasmine.

L'invalidation du gène de la céruloplasmine a été réalisée par la technologie CRISPR/Cas9 en utilisant des rats Sprague-Dawley. La céruloplasmine plasmatique, l'activité ferroxidase, les paramètres plasmatiques du fer et le NTBI ont été mesurés. Des colorations de Perls ont été réalisées sur des coupes de foie et de rate. Une quantification élémentaire a été réalisée par ICP-MS dans différentes matrices. Les ARNm des principaux gènes du métabolisme du fer et du cuivre ont été quantifiés, au même titre que certaines protéiques du métabolisme du fer.

Les concentrations plasmatiques de céruloplasmine et de cuivre, ainsi que l'activité ferroxidase des animaux homozygotes étaient effondrées, attestant de la validité du modèle. Les concentrations plasmatiques en fer et la saturation de la transferrine étaient abaissées ; les animaux ne présentaient néanmoins pas d'anémie. La présence d'une surcharge en fer hépatocytaire, associée à une baisse du fer splénique, corroborait le phénotype rencontré chez l'Homme, et mimait un phénotype d'hepcidino-déficiência. Le ratio entre les niveaux d'ARNm d'hepcidine et la concentration hépatique en fer était abaissé chez les animaux homozygotes, évoquant une hepcidino-déficiência relative ; les niveaux de NTBI de ces animaux n'étaient cependant pas augmentés. Les niveaux d'ARNm des gènes codant pour les principaux transporteurs du fer et du cuivre, ainsi que pour l'hephaestine, étaient inchangés entre les groupes. Les animaux homozygotes et hétérozygotes présentaient une baisse des niveaux de cuivre splénique, associée, chez les animaux homozygotes uniquement, à une hausse du manganèse plasmatique et du cobalt érythrocytaire.

Nos données suggèrent que ce modèle est adapté à l'étude du phénotype hépatosplénique rencontré dans l'acéruoplasminémie humaine. De plus, au regard des liens connus entre le métabolisme du fer et celui des métaux non-ferreux, les variations des

paramètres du cuivre splénique et du manganèse plasmatique, ouvrent de nouvelles voies d'investigations relatives aux mécanismes responsables du phénotype acéruplasminémique.

# Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload: lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia

Moussa Kenawi,\* Emmanuel Rouger,\* Marie-Laure Island,\* Patricia Leroyer,\* François Robin,\* Séverine Rémy,<sup>†</sup> Laurent Tesson,<sup>†</sup> Ignacio Anegon,<sup>†</sup> Kévin Nay,<sup>‡</sup> Frédéric Derbré,<sup>‡</sup> Pierre Brissot,\* Martine Ropert,\* Thibault Cavey,\* and Olivier Loréal\*<sup>1</sup>

\*INSERM, Univ Rennes, INRA, Platform Analyse Élémentaire et Métabolisme des Métaux, UMR 1241, Institut NuMeCan (Nutrition Metabolisms and Cancer), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Pontchaillou, Rennes, France; <sup>†</sup>INSERM UMR 1064- Centre de Recherches en Transplantation et Immunologie (CRTI), Transgenic Rats ImmunoPhenomic facility, Nantes, France; and <sup>‡</sup>Laboratory Movement, Sport, and Health Sciences (M2S-EA7470), University Rennes 2–Ecole Normale Supérieure (ENS) Rennes, Bruz, France

**ABSTRACT:** Hereditary aceruloplasminemia (HA), related to mutations in the ceruloplasmin (*Cp*) gene, leads to iron accumulation. Ceruloplasmin ferroxidase activity being considered essential for macrophage iron release, macrophage iron overload is expected, but it is not found in hepatic and splenic macrophages in humans. Our objective was to get a better understanding of the mechanisms leading to iron excess in HA. A clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) knockout of the *Cp* gene was performed on Sprague-Dawley rats. We evaluated the iron status in plasma, the expression of iron metabolism genes, and the status of other metals whose interactions with iron are increasingly recognized. In *Cp*<sup>-/-</sup> rats, plasma ceruloplasmin and ferroxidase activity were absent, together with decreased iron concentration and transferrin saturation. Similarly as in humans, the hepatocytes were iron overloaded conversely to hepatic and splenic macrophages. Despite a relative hepcidin deficiency in *Cp*<sup>-/-</sup> rats and the loss of ferroxidase activity, potentially expected to limit the interaction of iron with transferrin, no increase of plasma non-transferrin-bound iron level was found. Copper was decreased in the spleen, whereas manganese was increased in the plasma. These data suggest that the reported role of ceruloplasmin cannot fully explain the iron hepatosplenic phenotype in HA, encouraging the search for additional mechanisms.—Kenawi, M., Rouger, E., Island, M.-L., Leroyer, P., Robin, F., Remy, S., Tesson, L., Anegon, I., Nay, K., Derbré, F., Brissot, P., Ropert, M., Cavey, T., Loréal, O. Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload: lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia. *FASEB J.* 33, 000–000 (2019). www.fasebj.org

**KEY WORDS:** hepcidin · CRISPR/Cas9 · genetic disease · metals · hepatocyte

Hereditary aceruloplasminemia (HA) [Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 604290] is a rare genetic disease affecting about 1 person per 2 million (1). The disease

**ABBREVIATIONS:** BMP, bone morphogenetic protein; Cas9, CRISPR associated protein 9; *Cp*, ceruloplasmin; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; ERK, extracellular signal-regulated kinases; HA, hereditary aceruloplasminemia; *Hamp*, hepcidin antimicrobial peptide; *Hjv*, hemojuvelin BMP coreceptor; *Hsc70*, heat shock cognate 70; LIC, liver iron concentration; NTBI, nontransferrin-bound iron; SD, Sprague-Dawley; sgRNA, single guide RNA; SIC, spleen iron concentration; *Slc11a2*, solute carrier family 11 member 2; *Slc40a1*, solute carrier family 40 member 1; SMAD, sons of mother against decapentaplegic; STAT, signal transducer and activator of transcription; *Tfr2*, transferrin receptor 2; UIBC, unsaturated iron bound capacity

<sup>1</sup> Correspondence: INSERM UMR 1241, Institut NuMeCan, Hôpital Pontchaillou, Rennes Cedex 35033, France. E-mail: olivier.loreal@univ-rennes1.fr

doi: 10.1096/fj.201901106R

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

is related to homozygous or compound heterozygous mutations within the ceruloplasmin (*Cp*) gene, located on chromosome 3 (2). HA is characterized by progressive iron overload targeting especially the liver and brain and resulting in severe complications at variable ages, including diabetes and neurologic disturbances (3–5). Despite iron overload, serum iron and transferrin saturation are low, and anemia is also observed (3, 4).

*Cp* encodes the ceruloplasmin protein in 2 different forms resulting from an alternative splicing (6). The first gene product is mainly expressed by hepatocytes and secreted in plasma (7). The second one is characterized by the presence of a glycosylphosphatidylinositol sequence allowing its anchorage in plasmic membrane, especially in astrocytes, according to *in vitro* studies (8). Ceruloplasmin is a multicopper oxidase that catalyzes oxidation of ferrous iron into ferric iron (9). Ferroxidase activity requires the association of the peptidic sequence with 6 atoms of



copper (7, 10). This biologic activity is reported to play a key role in the iron release from cells, especially macrophages, providing iron to plasma for maintaining sufficient amounts of bioavailable iron to the cells (11, 12). It has been reported that, following the iron release by the iron exporter ferroportin, ceruloplasmin permits, by oxidizing iron, its association to transferrin (9). Each transferrin molecule may link up to 2 iron atoms and, subsequently, deliver iron to every cell in the body (9). Moreover, a role of glycosylphosphatidylinositol ceruloplasmin in the stabilization of ferroportin on cell membrane has also been reported (13, 14).

Such a biologic role suggests that, in HA, iron should be retained within macrophagic cells similarly to the reported findings in the ferroportin disease, in which the activity of the iron exporter is strongly decreased (15, 16). Similarly, during inflammatory processes characterized by high hepcidin levels, iron retention is observed within macrophages due to hepcidin increase (17, 18) that induces internalization and degradation of ferroportin (19, 20). However, from published HA case reports, it appears that, in the liver, the Kupffer cells are almost constantly spared by iron excess (4, 5, 21–23) and that, in the spleen, there is no increase of iron concentration (4, 5, 21, 22), contrasting with the observations in the ferroportin disease (15, 16).

Therefore, the hepatosplenic phenotype of iron overload observed in human HA does not fit with the reported biologic role of ceruloplasmin, and our aim was to investigate the mechanisms contributing to iron misdistribution between spleen and liver in order to progress in the understanding of the biologic role of ceruloplasmin and of the mechanisms underlying the development of HA. It is noteworthy that ceruloplasmin knockout mouse models give contrasting data regarding the iron overload phenotype in liver and spleen. Indeed, some animal data show only hepatic iron overload, with no significant iron concentration increase in the spleen (24–26). Other reports describe both hepatic and splenic iron overload (11, 27) with, in the liver, presence of iron within hepatic macrophages (11, 28). Thus, these data contrast with the clinical findings in humans (4, 5, 21, 22) and suggest that mice could not be fully appropriate to mimic human HA. We hypothesized that a rat model could provide relevant information to understand the disease; thus, we used the rat as an alternative model to characterize the disease. We selected the Sprague-Dawley (SD) rat, in which the type of hepatic iron load phenotype obtained during oral iron supplementation is very similar to the human profile, both during genetic hemochromatosis and in excessive oral iron intake (29). Therefore, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) technology was used to generate and study a new rat aceruloplasminemic model aiming to mimic the unexpected human aceruloplasminemic hepato-splenic iron phenotype and to characterize the impact of aceruloplasminemia on other metals involved in biologic processes (Cu, Zn, Mn, Mo, Co) that could play a role during aceruloplasminemia.

## MATERIAL AND METHODS

### Development of an aceruloplasminemic animal model

SD rats were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). All of the animal care procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Pays de la Loire region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (CEEA-PdL-2015-692). The single guide RNA (sgRNA) was designed and produced by the facility TacGene (Paris, France). The sgRNAcr377 used targeted the exon 1 of *Cp* and had the following sequence: 5'-GGAAT-TACTGAAGCAGTTT-3'. The sgRNA (200 ng/ $\mu$ l) and Cas9 protein (3  $\mu$ M) were incubated at room temperature for 10 min to allow formation of RNP complexes and then were kept at 4°C until microinjection. Process and microinjection were performed as previously described (30). Briefly, zygotes were collected from pre-pubescent (4–5-wk-old) SD donor female rats, superovulated by injection of pregnant mare serum gonadotropin (30 IU, i.p.; Merck GmbH, Darmstadt, Germany) and, 48 h later, of human chorionic gonadotropin (20 IU; Merck), that were mated with SD fertile males. One-cell-stage fertilized embryos were sequentially microinjected into the male pronucleus and into the cytoplasm. The same day, surviving embryos were implanted within oviduct of pseudo-pregnant females (0.5 day postcoital) and grown until full term.

### Genotyping

Tail biopsies from 8–10-d-old rats were digested overnight at 56°C in 500  $\mu$ l of tissue digestion buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.2 M NaCl, 100  $\mu$ g/ml proteinase K). The CRISPR's nuclease-targeted regions were PCR amplified from diluted lysed samples (1/20) with a high-fidelity polymerase (Herculase II fusion polymerase; Agilent, Santa Clara, CA, USA). To detect gene edition, locus-specific primers were used, and mutations were analyzed by heteroduplex mobility assay–capillary electrophoresis (HMA-CE) and direct sequencing of PCR products.

### Characterization of aceruloplasminemic rats

From this founder, after crossing with wild-type SD rats, 3 groups (wild-type, heterozygotes, and homozygotes) of 10 rats each were obtained. The genotype of animals was performed by PCR using primers. DNA extractions were performed from young rat tails by using the Nucleospin Tissue Kit (Macherey Nagel, Duren, Germany) and then dosed with Spectrometer ND-1000 (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PCR was realized by using 200 ng of DNA and by using specific primers: forward primer (5'-GGGCTCCAAGAGGAAGAAAC-3'), reverse primer (5'-ATTTGGCCCATAAACAACAAAGAA-3'), and GoTaq G2 Hot Start Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA) on an Applied Biosystem Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) with the following sequence: 3 min of heating at 95°C, followed by 30 cycles composed of 1 min at 95°C, 1 min at 62°C, and 2 min at 72°C, before a final single step at 72°C for 5 min. PCR products were investigated on 3% agarose gel. Gels were exposed to UV in a transilluminator (Thermo Fisher scientific), and blot pictures were analyzed with Vision-Capt software (Vilber, Eberhardzell, Germany).

All studied animals were 6-mo-old males. During breeding, animals were submitted at reversed lighting, had free access to water and standard rat food, and had benefited from litter changing 1 time per week. A standard diet, designed to support growth and maintenance (Teklad Global 16% protein Rodent



Diet; Envigo, Indianapolis, IN, USA), contained 200 mg/kg of iron, 15 mg/kg of copper, 100 mg/kg of manganese, and 70 mg/kg of zinc. The protocol was validated by the Animal Experimentation Ethics Committee of Région Bretagne, France (8554).

Animals were unfed for 10 h and anesthetized by isoflurane. After a laparotomy from symphysis to xiphoid appendix, 1 ml of portal blood was collected. Then, cardiac blood sampling was performed in 2 successive phases: 1 ml on nonheparinized syringe and a larger volume on sodium-heparinate syringe, respectively, leading to cardiac arrest and animal death. The different organs were then collected, each one was rapidly split into 2 parts, and they were placed either in formaldehyde 4% or in liquid nitrogen.

### Sample conditioning and storage

For serum preparation, after 2 h at room temperature, non-heparinized blood samples were centrifuged (200 g; 10 min). Supernatants were collected, (centrifuged at 800 g; 3 min), then divided into aliquots, and finally stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

For plasma preparation and erythrocyte cleaning, heparinized blood samples were centrifuged 10 min at 2230 g ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Supernatants were then collected and divided into aliquots in 100–600  $\mu\text{l}$  samples before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In total, 3–4 ml of NaCl 0.9% was added for washing of blood cell pellets, then gently mixed to these last ones, and centrifuged at 1833 g for 10 min at  $20^{\circ}\text{C}$ . The washing was repeated 3 times. Then blood cell pellets were collected, divided into aliquots, and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tissues collected in liquid nitrogen were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Hemoglobin measurement

Hemoglobin concentration was measured in the clinical analysis platform of Rennes University Hospital (Rennes, France) by a spectrophotometry method using an ABL 90 robot (Radiometer; Bronshøj, Denmark).

### Biochemical assays

Plasma measurements were performed in the clinical analysis platform of Rennes University Hospital. Ceruloplasmin assays were performed by immunoturbidimetric method by a Cobas 8000 robot (Roche, Basel, Switzerland), using a Ceruloplasmin 100 test kit (Roche) that contained a rabbit anti-human ceruloplasmin antibody. Serum and plasma iron concentrations, as well as unsaturated iron bound capacity (UIBC) values, were obtained by colorimetric method using the kits Iron Gen.2, 750 tests (Roche), and Unsaturated Iron-Binding Capacity, 100 tests (Roche), respectively, both performed by a Cobas 8000 robot (Roche) according to the principles previously reported (31). Transferrin saturation was calculated from UIBC value by the following equation:  $[\text{iron}/(\text{iron} + \text{UIBC})] \times 100$ . Ferroxidase activity was measured on plasma samples by spectrophotometry using a Cobas C111 robot (Roche), according to the method previously reported by Lainé *et al.* (32). Non-transferrin-bound iron (NTBI) was quantified in serum rat samples by a method previously reported by Breuer *et al.* (33).

### Quantification of metals in tissues and erythrocytes

For each tissue sample, a biopsy fragment of about  $3 \times 3$  mm was cut and desiccated at  $120^{\circ}\text{C}$  for 10–15 h. Samples were then recut

for obtaining a weight between 0.5 and 3 mg. For erythrocytes, 250  $\mu\text{l}$  of each sample was used. Assays were performed using Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) apparatus equipped with a collision reaction cell as previously reported (31).

### Histologic analysis

Formaldehyde-fixed biopsies were paraffin embedded. Organ slices (4  $\mu\text{m}$ ) were performed and stained by using hemalun-eosin-safron and Perls methods in the H2P2 platform (UMS Biosit, Rennes, France).

### Real-time quantitative PCR

Total RNAs were extracted following the procedure of the Nucleospin RNA Plus (Macherey Nagel) extraction kit and then measured with Spectrometer ND-1000 (Nanodrop).

The reverse transcriptase step was performed by using the High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) kit for obtaining 2  $\mu\text{g}$  of cDNA per sample of 20  $\mu\text{l}$  before a final one-sixth dilution in nuclease-free water.

Quantitative PCRs were realized using 384-well plates, with 2  $\mu\text{l}$  of sample, 1  $\mu\text{l}$  of forward primer then 1  $\mu\text{l}$  of reverse primer, and 5  $\mu\text{l}$  of Sybr Green 1 per well. Plates were then covered with a transparent film and centrifuged for 1 min at 1000 rpm. Runs were performed in a 7900 HT Fast Real-Time PCR System, and data were processed with SDS 2.4 software (Thermo Fisher Scientific). Housekeeping genes used were hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*), TATA box-binding protein (*Tbp*), and glucuronidase- $\beta$  (*Gusb*). Delta  $C_t$  was calculated by subtracting for each sample the mean  $C_t$  of these 3 genes to the  $C_t$  of the target gene. Primer pairs used are indicated in Supplemental Table S1.

### Western blotting

Cell membrane protein extraction was performed as previously reported by Canonne-Hergaux *et al.* (34), but at 100,000 g for 1 h. Total protein extraction and Western blotting using 10% acrylamide gels were performed as previously described by Salaun *et al.* (35). The following antibodies were used: ferroportin (AIT001, 1:500; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), phosphorylated (p)-sons of mother against decapentaplegic (SMAD)1/5/8-Ser463/465 (ab92698, 1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA), p-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-Tyr705 (9131, 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p-extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2-Thr202-Tyr204 (4376, 1:1000; Cell Signaling Technology), hephaestin (ab108003, 1:250; Abcam), and heat shock cognate 70 (Hsc70) (sc-7298, 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). We used this p-ERK1/2-Thr202-Tyr204 antibody (36–41), as well as this p-STAT3-Tyr705 antibody (42–45), on the basis of their use in rats, as reported in the literature. We tested the p-SMAD1/5/8-Ser463/465 in human hepatomaG2 cells hepatic cells that were exposed or not to BMP6, an inducer of SMAD1/5/8 phosphorylation (46). By Western blot, we clearly found a signal increase at about 55 kDa in the sample treated by bone morphogenetic protein 6 (BMP6), compared with the untreated sample (unpublished results). We tested the expression of ferroportin by Western blot in spleen and liver samples and found a significant expression at the expected MW close to 60 kDa; the signal totally disappeared when the peptide used for immunization was added during antibody incubation. Regarding hephaestin, we analyzed rat spleen and liver and found, at the expected MW (close to 130 kDa), a significant expression of the protein in the

spleen, known to express hephaestin, and not in the liver, which expresses very low levels of hephaestin mRNA (47, 48). The blot quantification analyses were conducted using Image Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan).

### Statistical analysis

All of the data were analyzed statistically with SPSS software (IBM SPSS, Chicago, IL, USA) using nonparametric tests. The 3 groups were submitted to Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test when appropriate. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Data are presented as means  $\pm$  SD.

## RESULTS

### Generation of ceruloplasmin-deficient rats

An sgRNA targeting exon 1 of *Cp* (Fig. 1A, B) was designed and then microinjected and complexed with Cas9 in rat zygotes ( $n = 189$ ) and implanted ( $n = 154$ ) in pseudopregnant females. Offspring ( $n = 47$ ) were genotyped and resulted in the generation of mutated animals ( $n = 30$ ) with different types in insertions and deletions (unpublished results). Among these mutated rats, one of them showed a mutation that resulted in a 54 base pair deletion and a 2 base pair insertion in exon 1 of *Cp* (Fig. 1C). This resulted in the disruption of the coding frame and the appearance of a premature stop codon occurring in exon 2 (Fig. 1D) with a predicted degradation of the whole mRNA due to the widely distributed mechanism of nonsense-mediated mRNA decay (49).

This founder animal was crossed with wild-type animals, and the mutation was observed in the F1 offspring. F1 heterozygous mutated animals were crossed to obtain homozygous mutated animals (Fig. 1E).

### Characterization of the iron phenotype in aceruloplasminemic rat model

Plasma ceruloplasmin assays showed very low ceruloplasmin concentrations in homozygotes and significantly lowered values in heterozygotes compared with wild-type rats (Fig. 2A). Ferroxidase activity was almost undetectable in homozygotes and was half preserved in heterozygote animals (Fig. 2B).

Plasma iron concentration was significantly decreased in homozygotes and fully preserved in heterozygotes compared with wild types, in both peripheral and portal plasma (Fig. 2C, D). Transferrin saturation followed the same variations (Fig. 2E, F). NTBI levels were decreased in both portal and systemic plasma in homozygotes as compared with wild types and heterozygotes (Fig. 2G, H).

Hemoglobin concentrations were not affected in homozygous and heterozygous groups as compared with controls, and erythrocyte iron concentration was not modified by the presence of the mutation at a heterozygous or homozygous state (Fig. 2I, J).

Liver iron concentration (LIC) was significantly higher in homozygous rats, whereas spleen iron concentration (SIC) was significantly lower compared with values found in wild-type animals; in heterozygous rats, both LIC and SIC were not affected compared with wild-type animals (Fig. 2K, L).

Perls staining showed liver iron deposits in homozygotes, located in hepatocytes and sparing Kupffer cells (Fig. 3A, B). Spleen iron deposits, mainly located in macrophages from the red pulp, appeared to be lower in homozygotes than in wild-type animals (Fig. 3C, D).

### Characterization of the non-iron metal phenotype in aceruloplasminemic rats

Plasma copper concentrations were strongly decreased in homozygotes and half preserved in heterozygotes, whereas erythrocyte copper concentrations were not affected in mutated animals (Fig. 4A, B). Liver copper concentration was unchanged, whereas spleen copper was significantly lower in homozygotes and heterozygotes compared with wild-type animals (Fig. 4C, D).

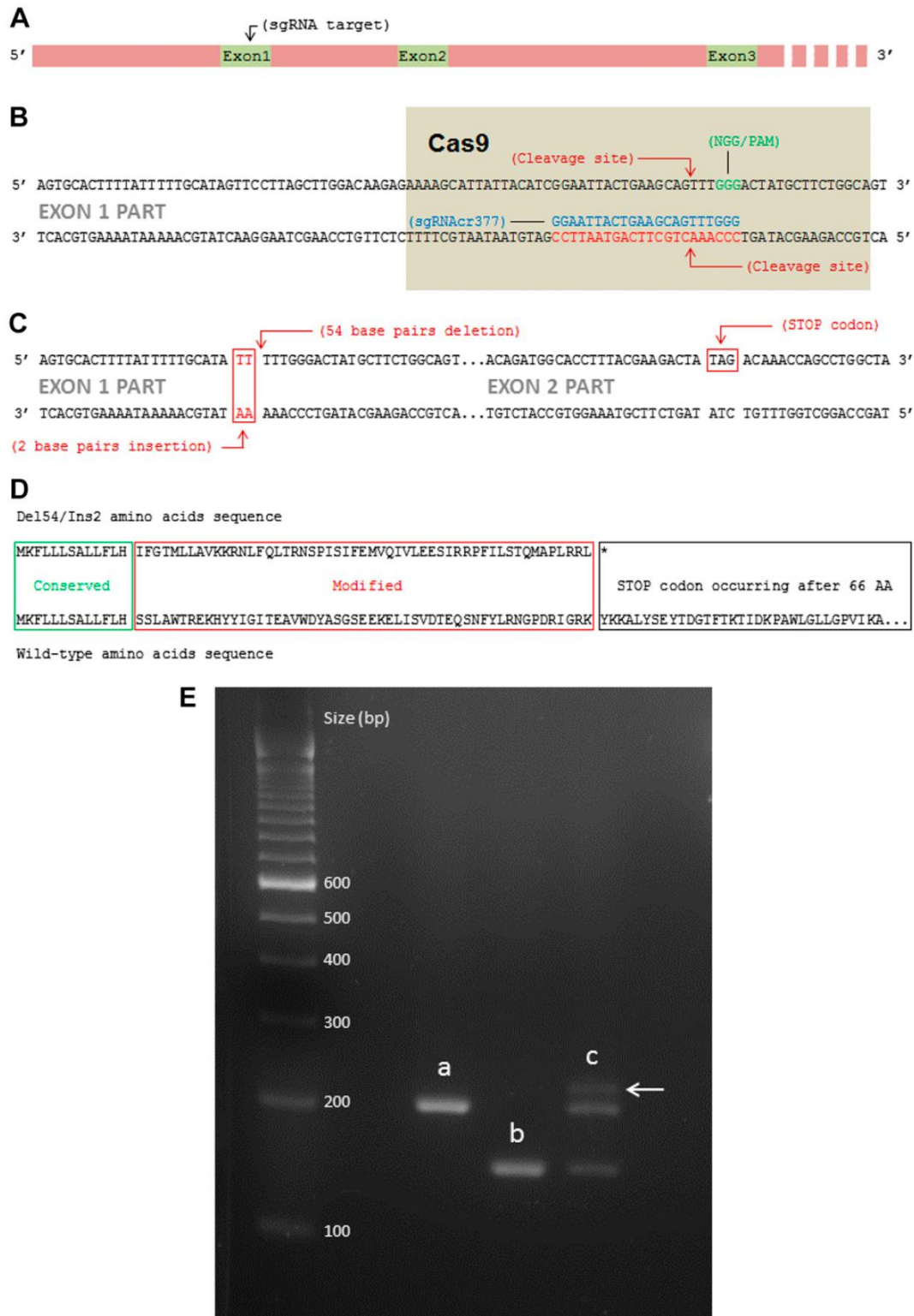
Concentrations of other metals including molybdenum, manganese, zinc, and cobalt were also investigated in liver, spleen, erythrocytes, and plasma of animals (Supplemental Table S2). In homozygous animals, a significant increase of cobalt and manganese concentrations was found in erythrocytes and plasma, as compared with heterozygous and controls (Fig. 4E, F).

### Impact of aceruloplasminemia on the expression of iron metabolism genes

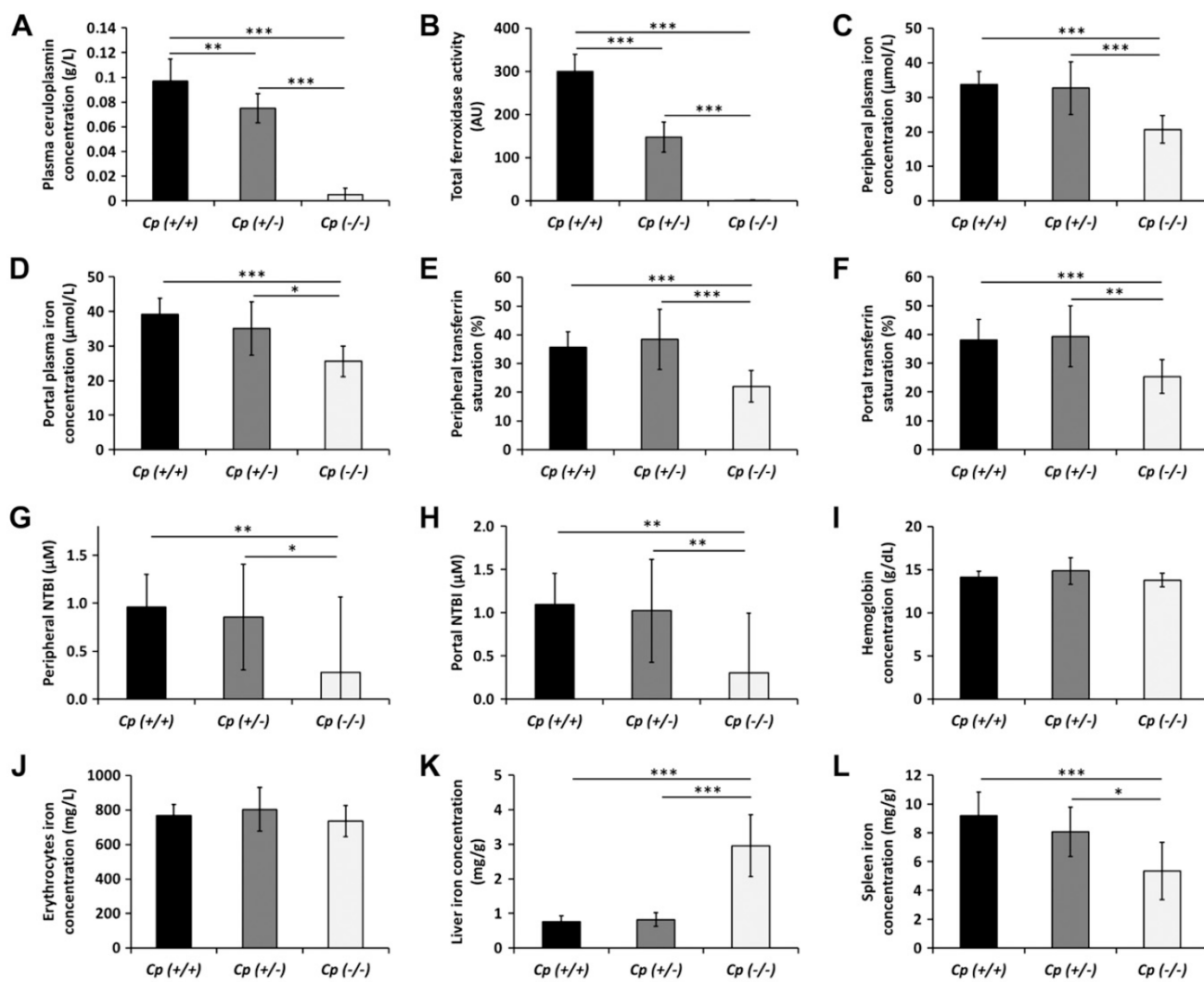
In the liver, hepcidin antimicrobial peptide (*Hamp*) mRNA levels were slightly but significantly decreased in homozygous as compared with heterozygous animals but not *vs.* wild-type rats (Fig. 5A). The ratio between *Hamp* mRNA and LIC levels was strongly decreased in homozygous animals as compared with wild-type and heterozygous animals (Fig. 5B). Hepatic mRNA levels of transferrin receptor 2 (*Tfr2*), hemojuvelin BMP coreceptor (*Hjv*), and *Hfe* genes (Supplemental Fig. S1) did not change between the groups. Levels of p-ERK1/2, p-STAT3, and p-SMAD1/5/8 proteins did not show significant variations between wild-type and homozygous animals (Fig. 5C and Supplemental Fig. S2). Transferrin receptor, solute carrier family 11 member 2 (*Slc11a2*), solute carrier family 39 member 14 (Supplemental Fig. S1), solute carrier family 40 member 1 (*Slc40a1*), and hephaestin (Fig. 5D, E) mRNA levels were not affected in homozygous and heterozygous animals. It is noteworthy that hepatic hephaestin mRNA levels were particularly low in all groups. The hepatic expression of cell membrane ferroportin was not significantly modulated in aceruloplasminemic rats (Fig. 5F and Supplemental Fig. S2). Hephaestin cell membrane protein was undetectable both in wild-type and homozygous groups in the liver (unpublished results).

In the spleen, the mRNA levels of *Slc40a1* were slightly but significantly increased in homozygous as compared with wild-type animals only (Fig. 5G). The mRNA levels





**Figure 1.** A) A global location of sgRNA in exon 1 is schematically presented. B) The CRISPR/Cas9 process is depicted in the region around the sgRNA targeted site, in exon 1 of *Cp*. C) The resulting mutation selected for our model and the stop codon occurring in exon 2 due to the frame shift are also represented. D) The frame shift resulting protein is exhibited and compared with the wild-type sequence. Del, deletion; Ins, insertion. E) Example of agarose gel picture representing the 3 genotypes used in the present study. Blots *a* from *Cp*<sup>+/+</sup> rats can be recognized by a band of about 200 base pairs; *Cp*<sup>-/-</sup> animals are characterized by a lower band *b* of about 150 base pairs, whereas *Cp*<sup>+/-</sup> shows a double band *c* corresponding to the 2 alleles. Heteroduplexes are present above *Cp*<sup>+/-</sup> bands, as indicated by the white arrow.



**Figure 2.** Consequences of the mutation on ceruloplasmin protein and activity, plasma iron bioavailability, and tissue iron concentrations. *A*) Plasma ceruloplasmin concentration,  $n = 10$  in all groups. *B*) Total ferroxidase activity,  $n = 10$  in all groups. AU, arbitrary unit. *C*) Peripheral plasma iron concentration,  $n = 10$  in all groups. *D*) Portal plasma iron concentration,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  group,  $n = 9$  in  $Cp^{+/-}$  and  $Cp^{-/-}$  groups. *E*) Peripheral plasma transferrin saturation,  $n = 10$  in all groups. *F*) Portal plasma transferrin saturation,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  group,  $n = 9$  in  $Cp^{+/-}$  and  $Cp^{-/-}$  groups. *G*) Peripheral plasma NTBI concentration,  $n = 10$  in all groups. *H*) Portal plasma NTBI concentration,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  and  $Cp^{-/-}$  groups,  $n = 9$  in  $Cp^{+/-}$  group. *I*) Hemoglobin concentration,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  and  $Cp^{-/-}$  groups,  $n = 8$  in  $Cp^{+/-}$  group. *J*) Erythrocyte iron concentration,  $n = 10$  in all groups. *K*) LIC,  $n = 10$  in all groups. *L*) SIC,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  and  $Cp^{+/-}$  groups,  $n = 9$  in  $Cp^{-/-}$  group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

of transferrin receptor, *Slc11a2* (Supplemental Fig. S1), and hephaestin (Fig. 5H) were not different between the three groups. Ferroportin and hephaestin cell membrane protein expression was not significantly modulated in homozygous animals (Fig. 5I and Supplemental Fig. S2).

In the duodenum, mRNA levels of *Slc11a2* (Supplemental Fig. S1), *Slc40a1*, and *hephaestin* genes (Fig. 5J, K) were not affected by homozygous or heterozygous state. Ferroportin and hephaestin cell membrane protein expression was unchanged between wild-type and homozygous animals (Fig. 5L and Supplemental Fig. S2).

### Impact of aceruloplasminemia on the expression of copper metabolism genes

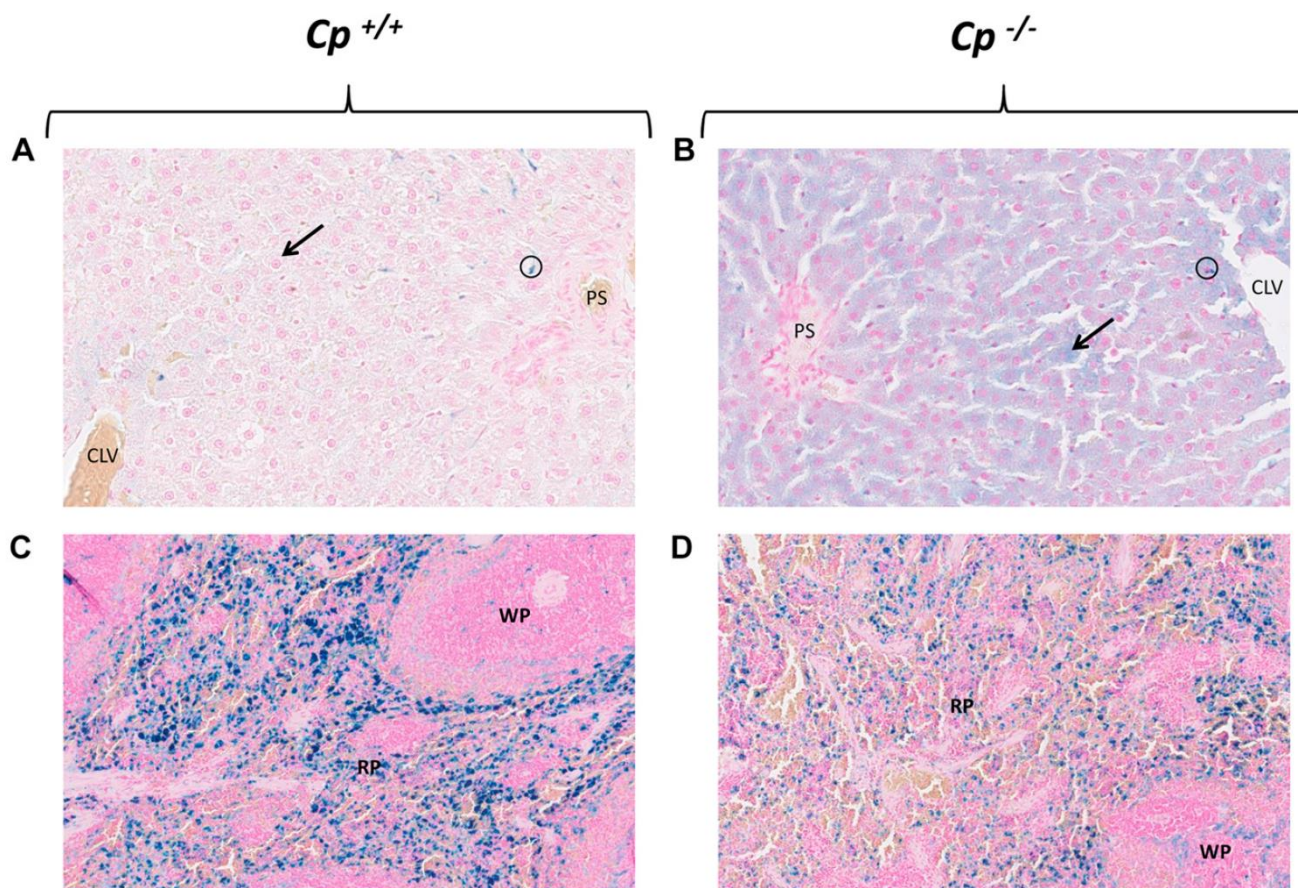
Hepatic mRNA levels of the 2 genes encoding factor V and factor VIII that are multicopper oxidases were unchanged

in homozygous and heterozygous animals compared with controls (Supplemental Fig. S3). mRNA levels of *Atp7a*, *Atp7b*, and *Slc31a1* genes that encode copper transporters were unchanged in both liver and spleen (Supplemental Fig. S3).

### DISCUSSION

Our data, obtained in a new aceruloplasminemic rat model, shows that serum biochemical parameters obtained in the  $Cp^{-/-}$  were in accordance with those reported in humans (4, 5) and in one mouse model (50). Indeed, both ceruloplasmin and ferroxidase activity were undetectable. Moreover, plasma iron concentration and transferrin saturation levels were significantly decreased in homozygous animals only, supporting a strong decrease of plasma iron bioavailability. Importantly, there





**Figure 3.** A, B) Perls staining of liver and spleen. Liver of  $Cp^{+/+}$  (A) and  $Cp^{-/-}$  (B) rats. Kupffer cells (example surrounded in black); hepatocytes (example pointed with black arrow). CLV, centrolobular vein; PS, portal space. C, D) Spleen of  $Cp^{+/+}$  (C) and  $Cp^{-/-}$  (D), with indication of red pulp (RP) and white pulp (WP).

was neither anemia nor reduction of erythrocyte iron content in our model, in contrast with human findings (4, 22, 51) and some mouse models (28, 52, 53), but in accordance with another mouse model (11).

Our findings with, in the liver, a highly predominant hepatocyte iron overload and, in the spleen, a decrease of iron concentration fully fit the human disease (4, 5, 21, 22), whereas data obtained from mice are very contrasted (11, 24–28). We must underline that in mice, the genetic background in inbred strains plays a major role as a modifier of the iron phenotype (54, 55). Conversely, our data have been obtained in an outbred strain that keeps a significant genetic background variability that may help to identify strong elements involved in the development of the phenotype (56). Indeed, it has been recently reported that, for most applications in animal studies, the use of robust and diverse subjects is preferred to obtain generalizable conclusions across conditions and populations (57). It has been proposed that, contrary to classic expectations, the adoption of outbred animals as research subjects may improve experimental replicability (57). Moreover, it should be outlined that, conversely to rats and humans, in mice, iron deposits during iron overload may be localized in the nucleus of hepatocytes, suggesting significant differences in the iron metabolism of mouse hepatocytes (58). In addition, there is only 1 gene of hepcidin in rats like in

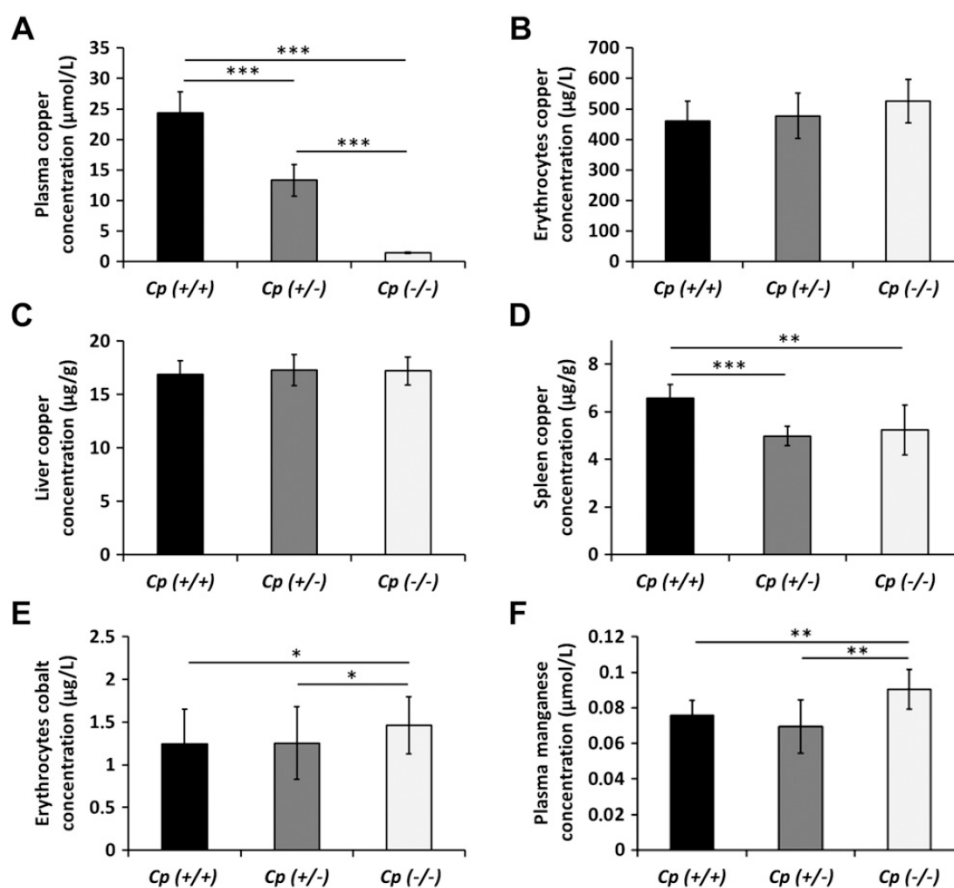
humans, in contrast with mice that exhibit 2 genes, the role of the second one being not yet clearly established (59, 60). Therefore, we thought that a rat model would be valuable to get complementary and relevant information for a better understanding of ceruloplasmin functions involved in HA.

Our histologic data, as reported in humans (4, 5, 21, 22), showing that iron deposits are mainly located in hepatocytes, whereas both Kupffer cells, the resident macrophages in the liver, and spleen macrophages did not exhibit significant iron deposits compared with controls, contrast with the classic pathophysiological hypothesis postulating iron retention in macrophages during HA (13). Our data strongly suggest that, during HA, iron is not retained within macrophage despite the strong decrease of ferroxidase activity. These findings contrast with those in mice showing that iron egress is decreased in macrophages when ferroxidase activity is altered (27). However, they are in agreement with other mouse reports (24–26), suggesting that iron egress is not altered in macrophages.

Therefore, complementary mechanisms contributing to the hepatocyte iron load must be searched. During genetic hemochromatosis, the archetype of hepatocyte iron overload, the following mechanistic sequence is involved in the iron loading process: hepcidin deficiency, related to mutations not only in the *Hfe* gene but also in *Hju*, *Hamp*, or



**Figure 4.** A) Plasma copper concentration,  $n = 10$  in all groups. B) Erythrocyte copper concentrations,  $n = 10$  in all groups. C) Liver copper concentrations,  $n = 10$  in all groups. D) Spleen copper concentrations,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  and  $Cp^{+/-}$  groups,  $n = 8$  in  $Cp^{-/-}$  group. E) Erythrocyte cobalt concentrations,  $n = 10$  in all groups. F) Plasma manganese concentrations,  $n = 10$  in all groups. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



*Tfr2* genes, leads to an increase of transferrin saturation with appearance of NTBI (61), quickly taken up by hepatocytes through the Zrt- and Irt-like protein 14 (ZIP 14) (62).

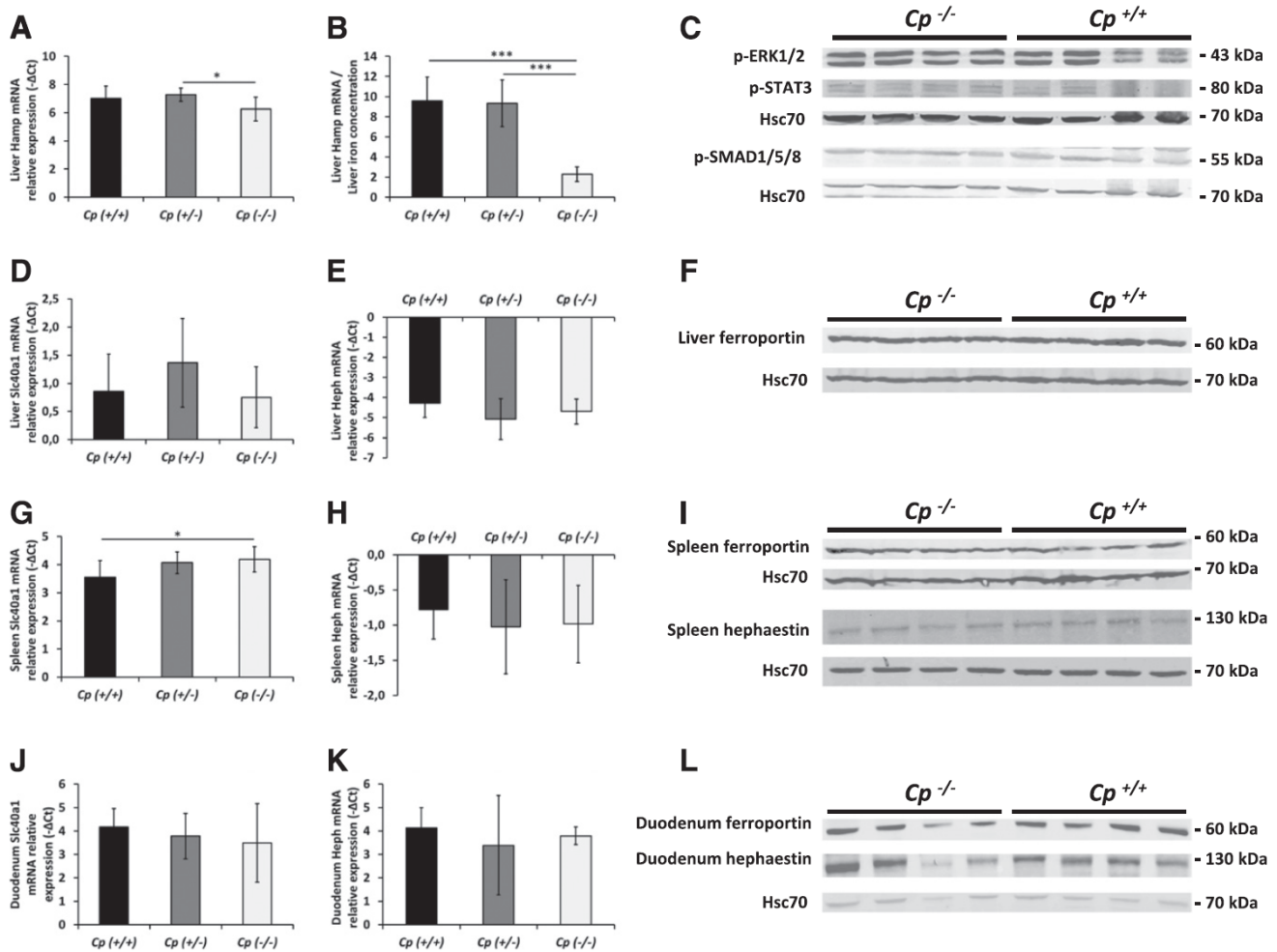
Our data show that the homozygous  $Cp^{-/-}$  animals presented a relative hepcidin deficiency, as indicated by a drop of the hepcidin on LIC ratio, reflecting the absence of the expected increase of hepcidin mRNA levels in the liver of iron-overloaded animals. Moreover, we did not find any modulation of *Hfe*, *Hjv*, and *Tfr2* hepatic mRNA steady-state levels that could have participated to the genesis of the relative hepcidin-deficient state. In addition, the transduction pathways that depend on these genes did not seem affected as suggested by the absence of phosphorylation level decrease of ERK1/2, SMAD1/5/8, and STAT3. Whether an inhibitory signal resulting from an erythropoietic effect of the disease is involved, even in absence of anemia, deserves further investigation. It is noteworthy that, whereas the expression of the iron exporter ferroportin, (the hepcidin target) on cell membrane has been reported in cell models to be impaired in macrophages in case of ceruloplasmin deficiency (13, 14, 63), we did not find any modulation of ferroportin mRNA and protein levels in the spleen, which is particularly rich in macrophages, and in the liver.

Ferroxidase activity being reported as required for the iron association to transferrin (64), we looked for an increase of NTBI in the serum of homozygous animals, despite the absence of transferrin saturation increase.

Similarly to what has been reported in humans (4), we did not find any NTBI increase in systemic blood flow as well as in portal flow that receives iron from spleen and digestive tract. Moreover, the mRNA levels of solute carrier family 39 member 14, the specific transporter of NTBI (62), was not modulated in the liver of  $Cp^{-/-}$  animals. Taken together, these data suggest that alternative mechanisms allow the transfer of iron on transferrin. In this context, it is noteworthy that the expression level of hephaestin that could be involved in a compensation of ceruloplasmin deficiency was not significantly increased in the spleen and in the duodenum in aceruloplasminemic rats. Moreover, the ferroportin expression level was not affected in spleen, liver, and duodenum.

Finally, considering strong relationships between ceruloplasmin and Cu and previous reports underlying potential interactions between the metabolism of iron and those of other metals (65), we investigated the concentration of these metals in plasma and tissues in order to identify elements that could play a role in the development of the disease. We therefore explored whether the aceruloplasminemic condition modulated the concentrations of Cu, Mn, Zn Co, and Mo in liver, spleen, erythrocytes, and plasma.

The multicopper oxidase ceruloplasmin is the most important carrier of Cu in plasma, described as containing about 93% of this metal (66), in accordance with lowered plasma copper concentrations in patients with HA (4, 5, 22, 51) and with animal data (25). Therefore, as expected,



**Figure 5.** A) Liver Hamp mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in all groups. B) Ratio between liver Hamp mRNA levels and LIC,  $n = 10$  in all groups. C) Representative examples of liver p-ERK1/2, p-STAT3, and p-SMAD1/5/8 blots with Hsc70 as load control protein. D) Liver Slc40a1 mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in all groups. E) Liver hephaestin (Heph) mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in all groups. F) Representative example of liver ferroportin blots with Hsc70 as load control protein. G) Spleen Slc40a1 mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in all groups. H) Spleen Heph mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in all groups. I) Representative example of spleen ferroportin and Heph blots with Hsc70 as load control protein. J) Duodenum Slc40a1 mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  and  $Cp^{+/-}$  groups,  $n = 9$  in  $Cp^{-/-}$  group. K) Duodenum Heph mRNA levels expressed in negative  $\Delta C_b$ ,  $n = 10$  in  $Cp^{+/+}$  and  $Cp^{+/-}$  groups,  $n = 9$  in  $Cp^{-/-}$  group. L) Representative example of duodenum ferroportin and Heph blots with Hsc70 as load control protein. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

we found a strong decrease of plasma Cu in aceruloplasminemic animals. Regarding the liver, HA case reports are not univocal on copper concentrations, which have been found stable (22) or increased (3). As previously described in HA mouse models (25, 28), liver copper concentrations in our  $Cp^{-/-}$  rats did not show any significant variations. However, we found a decrease of spleen copper concentrations in  $Cp^{-/-}$  and  $Cp^{+/-}$  animals compared with wild-type rats, contrasting with a previous report in HA mice (25). It should be noted that this variation affected both  $Cp^{-/-}$  and  $Cp^{+/-}$  animals, whereas, when analyzing plasma and tissue iron parameters, significant variations were only found in  $Cp^{-/-}$  animals. Therefore, it can be hypothesized that the decrease of ceruloplasmin is involved in the spleen copper decrease. This decrease in spleen copper content does not seem related to a lowered copper entry into spleen macrophages


during the erythrophagocytosis process, as suggested by the equal erythrocyte copper contents between the 3 groups.

It is noteworthy that in  $Cp^{-/-}$  animals, the plasma manganese levels were found to be increased. The role of ferroportin in Mn egress being supported by previous data (65), this observation supports the absence of a direct effect of ceruloplasmin on metal egress. Interestingly, we did not find an overexpression of hephaestin that could have compensated for the absence of ceruloplasmin in the spleen, both at mRNA and at protein levels.

Whether these alterations play a role during HA will require further investigation.

In summary, this new aceruloplasminemic rat model mimics the human hepatosplenic iron load phenotype during HA. Our data suggest that iron overload in this disease is not primarily related to iron retention within



macrophages. Whether hepcidin deficiency plays, despite the absence of NTBI, a role in the development of hepatocyte iron load remains to be clarified. Elucidation of the mechanisms involved in these iron metabolism disturbances could help to further understand how iron develops in the brain of human aceruloplasminemia, causing devastating complications. 

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fondation Maladies Rares, Région Bretagne (to M.K.), INSERM, and Association Fer et Métaux Essentiels et Recherche en Santé (AFEMERS). This work was partially supported by the Transgènèse pour les Etudes Fonctionnelles sur les Organismes Modèles (TEFOR) project funded by the Investissements d'Avenir French Government Program (ANRI-INSB-0014) and also a member of Cephedra infrastructure. This work was realized in the context of the Labex Immunotherapy Grand Ouest (IGO) project (ANR-11-LABX-0016-01) and the Institut Hospitalo Universitaire (IHU-Cesti) project (ANR-10-IBHU-005), both of which are part of the Investissements d'Avenir French Government Program. The IHU-Cesti Project is also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. The authors thank the U1154-UMR7196 TacGene for design and production of the single guide RNA4.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M. Kenawi performed experiments, collected and analyzed the data, and wrote the manuscript; E. Rouger, M. L. Island, P. Leroyer, F. Robin, K. Nay, F. Derbré, M. Ropert, and T. Cavey performed research experiments and corrected the manuscript; S. Rémy and L. Tesson designed and performed research experiments and collected and analyzed data; I. Anegon supervised the research and partially wrote the manuscript; P. Brissot contributed to the design of the study, the analysis of data, and to writing the manuscript; and O. Loréal designed the study, contributed to the experiment, analyzed the data, and wrote the manuscript.

## REFERENCES

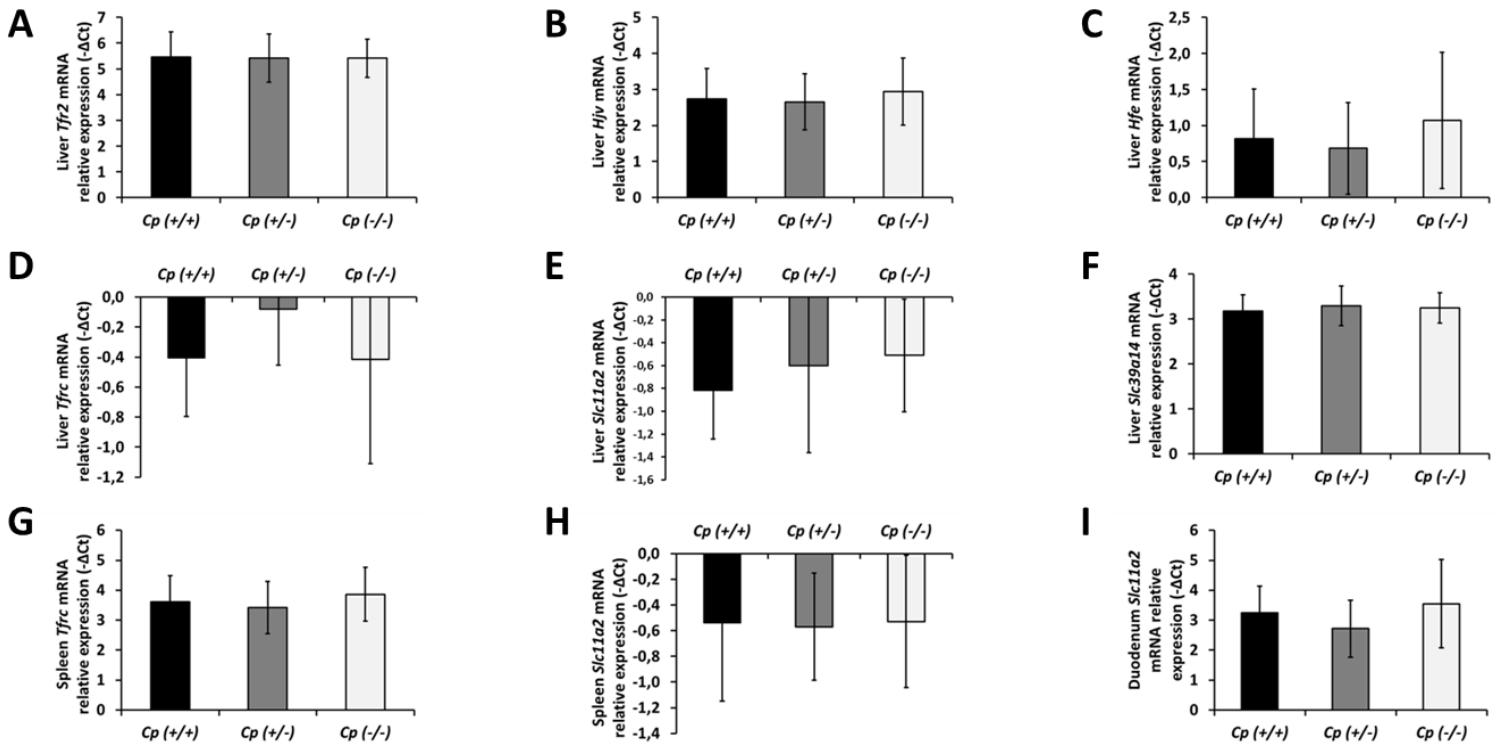
- Miyajima, H. (2015) Aceruloplasminemia. *Neuropathology* **35**, 83–90
- Yang, F., Naylor, S. L., Lum, J. B., Cutshaw, S., McCombs, J. L., Naberhaus, K. H., McGill, J. R., Adrian, G. S., Moore, C. M., and Barnett, D. R., et al. (1986) Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3257–3261
- Bosio, S., De Gobbi, M., Roetto, A., Zecchina, G., Leonardo, E., Rizzetto, M., Lucetti, C., Petrozzi, L., Bonuccelli, U., and Camaschella, C. (2002) Anemia and iron overload due to compound heterozygosity for novel ceruloplasmin mutations. *Blood* **100**, 2246–2248
- Loréal, O., Turlin, B., Pigeon, C., Moisan, A., Ropert, M., Morice, P., Gandon, Y., Jouanolle, A.M., Verin, M., Hider, R. C., Yoshida, K., and Brissot, P. (2002) Aceruloplasminemia: new clinical, pathophysiological and therapeutic insights. *J. Hepatol.* **36**, 851–856
- Finkenstedt, A., Wolf, E., Höfner, E., Gasser, B. I., Bösch, S., Bakry, R., Creus, M., Kremser, C., Schocke, M., Theurl, M., Moser, P., Schranz, M., Bonn, G., Poewe, W., Vogel, W., Janecke, A. R., and Zoller, H. (2010) Hepatic but not brain iron is rapidly chelated by deferasirox in aceruloplasminemia due to a novel gene mutation. *J. Hepatol.* **53**, 1101–1107

- Patel, B. N., Dunn, R. J., and David, S. (2000) Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **275**, 4305–4310
- Sato, M., and Gitlin, J. D. (1991) Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **266**, 5128–5134
- Patel, B. N., and David, S. (1997) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 20185–20190
- Osaki, S., Johnson, D. A., and Frieden, E. (1966) The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J. Biol. Chem.* **241**, 2746–2751
- Hellman, N. E., Kono, S., Mancini, G. M., Hoogeboom, A. J., De Jong, G. J., and Gitlin, J. D. (2002) Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **277**, 46632–46638
- Harris, Z. L., Durley, A. P., Man, T. K., and Gitlin, J. D. (1999) Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10812–10817
- Young, S. P., Fahmy, M., and Golding, S. (1997) Ceruloplasmin, transferrin and apotransferrin facilitate iron release from human liver cells. *FEBS Lett.* **411**, 93–96
- De Domenico, I., Ward, D. M., di Patti, M. C., Jeong, S. Y., David, S., Musci, G., and Kaplan, J. (2007) Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* **26**, 2823–2831
- Kono, S., Yoshida, K., Tomosugi, N., Terada, T., Hamaya, Y., Kanaoka, S., and Miyajima, H. (2010) Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin-mediated internalization of ferroportin. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 968–975
- Pietrangelo, A. (2004) The ferroportin disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **32**, 131–138
- Pietrangelo, A. (2017) Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* **102**, 1972–1984
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., and Ganz, T. (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* **113**, 1271–1276
- Wrighting, D. M., and Andrews, N. C. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **108**, 3204–3209
- De Domenico, I., Ward, D. M., Langelier, C., Vaughn, M. B., Nemeth, E., Sundquist, W. L., Ganz, T., Musci, G., and Kaplan, J. (2007) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2569–2578
- Theurl, I., Theurl, M., Seifert, M., Mair, S., Nairz, M., Rumpold, H., Zoller, H., Bellmann-Weiler, R., Niederegger, H., Talasz, H., and Weiss, G. (2008) Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* **111**, 2392–2399
- Skidmore, F. M., Drago, V., Foster, P., Schmalfuss, I. M., Heilman, K. M., and Streiff, R. R. (2008) Aceruloplasminemia with progressive atrophy without brain iron overload: treatment with oral chelation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 467–470
- Kono, S., Suzuki, H., Takahashi, K., Takahashi, Y., Shirakawa, K., Murakawa, Y., Yamaguchi, S., and Miyajima, H. (2006) Hepatic iron overload associated with a decreased serum ceruloplasmin level in a novel clinical type of aceruloplasminemia. *Gastroenterology* **131**, 240–245
- Piperno, A., and Alessio, M. (2018) Aceruloplasminemia: waiting for an efficient therapy. *Front. Neurosci.* **12**, 903
- Jiang, R., Hua, C., Wan, Y., Jiang, B., Hu, H., Zheng, J., Fuqua, B. K., Dunaief, J. L., Anderson, G. J., David, S., Vulpe, C. D., and Chen, H. (2015) Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain. *J. Nutr.* **145**, 1003–1009
- Meyer, L. A., Durley, A. P., Prohaska, J. R., and Harris, Z. L. (2001) Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 36857–36861
- Gouya, L., Muzeau, F., Robreau, A. M., Letteron, P., Couchi, E., Lyoumi, S., Deybach, J. C., Puy, H., Fleming, R., Demant, P., Beaumont, C., and Grandchamp, B. (2007) Genetic study of variation in normal mouse iron homeostasis reveals ceruloplasmin as an HFE-hemochromatosis modifier gene. *Gastroenterology* **132**, 679–686
- Chen, H., Attieh, Z. K., Gao, H., Huang, G., Su, T., Ke, W., and Vulpe, C. D. (2009) Age-related changes in iron homeostasis in mouse ferroxidase mutants. *Biomaterials* **22**, 827–834
- Yamamoto, K., Yoshida, K., Miyagoe, Y., Ishikawa, A., Hanaoka, K., Nomoto, S., Kaneko, K., Ikeda, S., and Takeda, S. (2002) Quantitative

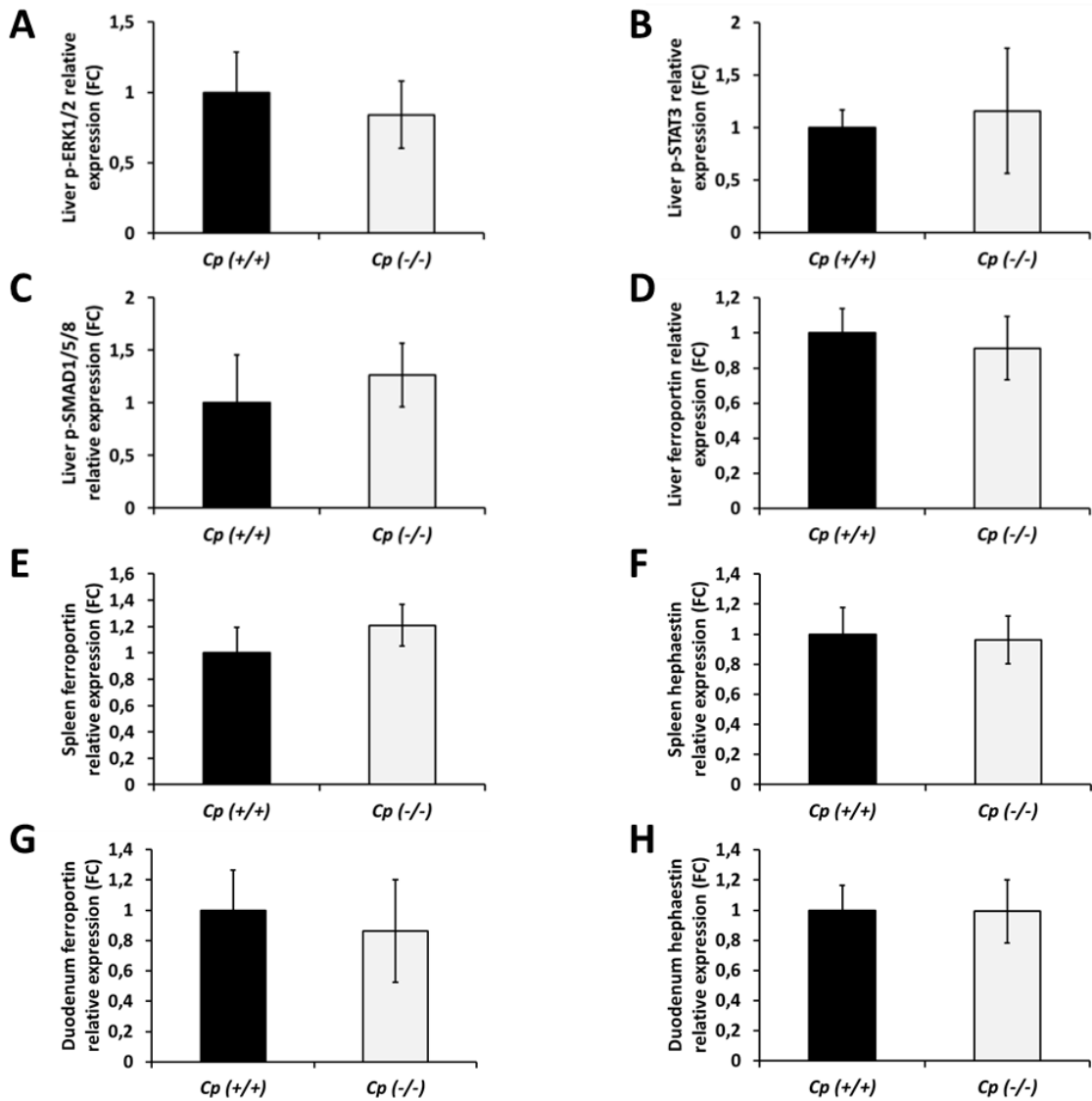


- evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1588**, 195–202
29. Bacon, B. R., Tavill, A. S., Brittenham, G. M., Park, C. H., and Recknagel, R. O. (1983) Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest.* **71**, 429–439
  30. Remy, S., Chenouard, V., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Brussels, L., Heslan, J. M., Nguyen, T. H., Bellien, J., Merot, J., De Cian, A., Giovannangeli, C., Concordet, J. P., and Anegon, I. (2017) Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci. Rep.* **7**, 16554
  31. Cavey, T., Ropert, M., de Tayrac, M., Bardou-Jacquet, E., Island, M. L., Leroyer, P., Bendavid, C., Brissot, P., and Loréal, O. (2015) Mouse genetic background impacts both on iron and non-iron metals parameters and on their relationships. *Biomaterials* **28**, 733–743
  32. Lainé, F., Ropert, M., Lan, C. L., Loréal, O., Bellissant, E., Jard, C., Pouchard, M., Le Treut, A., and Brissot, P. (2002) Serum ceruloplasmin and ferroxidase activity are decreased in HFE C282Y homozygote male iron-overloaded patients. *J. Hepatol.* **36**, 60–65
  33. Breuer, W., and Cabantchik, Z. I. (2001) A fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron. *Anal. Biochem.* **299**, 194–202
  34. Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., and Gros, P. (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* **93**, 4406–4417
  35. Salaun, E., Lefeuvre-Orfila, L., Cavey, T., Martin, B., Turlin, B., Ropert, M., Loreal, O., and Derbré, F. (2016) Myricetin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* **120**, 178–187
  36. Comejo, P., Varela, P., Videla, L. A., and Fernández, V. (2005) Chronic iron overload enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat liver. *Nitric Oxide* **13**, 54–61
  37. Chen, L., Xiong, S., She, H., Lin, S. W., Wang, J., and Tsukamoto, H. (2007) Iron causes interactions of TAK1, p21ras, and phosphatidylinositol 3-kinase in caveolae to activate IκappaB kinase in hepatic macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**, 5582–5588
  38. Zhang, Y., Cheng, Y., Wang, N., Zhang, Q., and Wang, K. (2014) The action of JAK, SMAD and ERK signal pathways on hepcidin suppression by polysaccharides from *Angelica sinensis* in rats with iron deficiency anemia. *Food Funct.* **5**, 1381–1388
  39. Poli, M., Lusciati, S., Gandini, V., Maccarinelli, F., Finazzi, D., Silvestri, L., Roetto, A., and Arosio, P. (2010) Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* **95**, 1832–1840
  40. Tangudu, N. K., Buth, N., Strnad, P., Cirstea, I. C., and Spasić, M. V. (2019) Deregulation of hepatic Mek1/2<sup>+</sup>Erk1/2 signaling module in iron overload conditions. *Pharmaceuticals (Basel)* **12**, 70
  41. Wallace, D. F., Summerville, L., Crampton, E. M., Frazer, D. M., Anderson, G. J., and Subramaniam, V. N. (2009) Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology* **50**, 1992–2000
  42. Cavey, T., Pierre, N., Nay, K., Allain, C., Ropert, M., Loréal, O., and Derbré, F. (2017) Simulated microgravity decreases circulating iron in rats: role of inflammation-induced hepcidin upregulation. *Exp. Physiol.* **102**, 291–298
  43. Armitage, A. E., Eddowes, L. A., Gileadi, U., Cole, S., Spottiswoode, N., Selvakumar, T. A., Ho, L. P., Townsend, A. R., and Drakesmith, H. (2011) Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood* **118**, 4129–4139
  44. De Domenico, I., Zhang, T. Y., Koenig, C. L., Branch, R. W., London, N., Lo, E., Daynes, R. A., Kushner, J. P., Li, D., Ward, D. M., and Kaplan, J. (2010) Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2395–2405
  45. Huang, H., Constante, M., Layoun, A., and Santos, M. M. (2009) Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood* **113**, 3593–3599
  46. Kersten, C., Sivertsen, E. A., Hystad, M. E., Forfang, L., Smeland, E. B., and Myklebust, J. H. (2005) BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol.* **6**, 9
  47. Li, Y. Q., Bai, B., Zheng, Q. Q., Yan, H., and Zhuang, G. H. (2013) Quantitative study of iron metabolism-related genes expression in rat. *Biomed. Environ. Sci.* **26**, 808–819
  48. Zhang, A. S., Xiong, S., Tsukamoto, H., and Enns, C. A. (2004) Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood* **103**, 1509–1514
  49. Frischmeyer, P. A., and Dietz, H. C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1893–1900
  50. Guo, P., Cui, R., Chang, Y. Z., Wu, W. S., Qian, Z. M., Yoshida, K., Qiao, Y. T., Takeda, S., and Duan, X. L. (2009) Hepcidin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides* **30**, 262–266
  51. Ogimoto, M., Anzai, K., Takenoshita, H., Kogawa, K., Akehi, Y., Yoshida, R., Nakano, M., Yoshida, K., and Ono, J. (2011) Criteria for early identification of aceruloplasminemia. *Intern. Med.* **50**, 1415–1418
  52. Cherukuri, S., Tripoulas, N. A., Nurko, S., and Fox, P. L. (2004) Anemia and impaired stress-induced erythropoiesis in aceruloplasminemic mice. *Blood Cells Mol. Dis.* **33**, 346–355
  53. Fuqua, B. K., Lu, Y., Frazer, D. M., Darshan, D., Wilkins, S. J., Dunn, L., Loguinov, A. V., Kogan, S. C., Matak, P., Chen, H., Dunaief, J. L., Vulpe, C. D., and Anderson, G. J. (2018) Severe iron metabolism defects in mice with double knockout of the multicopper ferroxidases hephaestin and ceruloplasmin. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 405–427
  54. Dupic, F., Fruchon, S., Bensaid, M., Borot, N., Radosavljevic, M., Loreal, O., Brissot, P., Gilfillan, S., Bahram, S., Coppin, H., and Roth, M. P. (2002) Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology* **122**, 745–751
  55. Dupic, F., Fruchon, S., Bensaid, M., Loreal, O., Brissot, P., Borot, N., Roth, M. P., and Coppin, H. (2002) Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut* **51**, 648–653
  56. Brower, M., Grace, M., Kotz, C. M., and Koya, V. (2015) Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Lab. Anim. Res.* **31**, 166–173
  57. Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J., and Mogil, J. S. (2018) Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat. Methods* **15**, 994–996
  58. Smith, A. G., Carthew, P., Francis, J. E., Edwards, R. E., and Dinsdale, D. (1990) Characterization and accumulation of ferritin in hepatocyte nuclei of mice with iron overload. *Hepatology* **12**, 1399–1405
  59. Ilyin, G., Courselaud, B., Troadec, M.-B., Pigeon, C., Alizadeh, M., Leroyer, P., Brissot, P., and Loréal, O. (2003) Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett.* **542**, 22–26
  60. Courselaud, B., Troadec, M.-B., Fruchon, S., Ilyin, G., Borot, N., Leroyer, P., Coppin, H., Brissot, P., Roth, M. P., and Loréal, O. (2004) Strain and gender modulate hepatic hepcidin 1 and 2 mRNA expression in mice. *Blood Cells Mol. Dis.* **32**, 283–289
  61. Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., and Loréal, O. (2012) Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 403–410
  62. Jenkitkasemwong, S., Wang, C. Y., Coffey, R., Zhang, W., Chan, A., Biel, T., Kim, J. S., Hojyo, S., Fukada, T., and Knutson, M. D. (2015) SLC39A14 is required for the development of hepatocellular iron overload in murine models of hereditary hemochromatosis. *Cell Metab.* **22**, 138–150
  63. Marques, L., Auriac, A., Willemetz, A., Banha, J., Silva, B., Canonne-Hergaux, F., and Costa, L. (2012) Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol. Dis.* **48**, 110–120
  64. Brissot, P., and Loréal, O. (2016) Iron metabolism and related genetic diseases: a cleared land, keeping mysteries. *J. Hepatol.* **64**, 505–515
  65. Loréal, O., Cavey, T., Bardou-Jacquet, E., Guggenbuhl, P., Ropert, M., and Brissot, P. (2014) Iron, hepcidin, and the metal connection. *Front. Pharmacol.* **5**, 128
  66. Cartwright, G. E., and Wintrobe, M. M. (1964) Copper metabolism in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **14**, 224–232

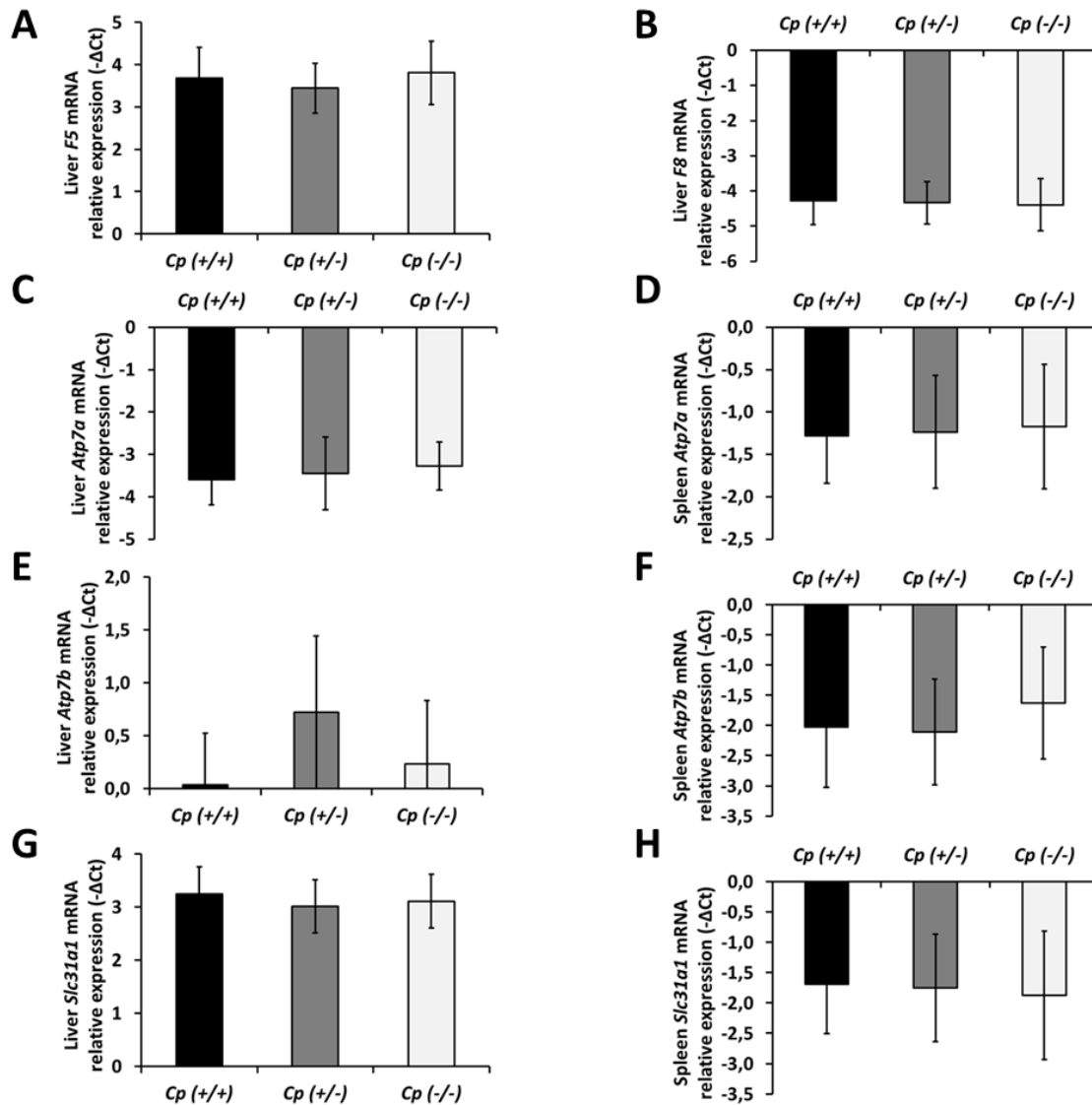
Received for publication May 2, 2019.  
Accepted for publication August 26, 2019.



**Supplemental data Figure 1 :** Liver *Tf2* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (A). Liver *Hjv* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (B). Liver *Hfe* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (C). Liver *Tfrc* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (D). Liver *Slc11a2* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (E). Liver *Slc39a14* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (F). Spleen *Tfrc* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (G). Spleen *Slc11a2* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (H). Duodenum *Slc11a2* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in *CP*<sup>+/+</sup> and *CP*<sup>+/-</sup> groups, n=9 in *CP*<sup>-/-</sup> group (I).



**Supplemental data Figure 2 :** Liver p-ERK1/2 protein levels expressed in fold-change, n=8 in all groups (A). Liver p-STAT3 protein levels expressed in fold-change, n=8 in all groups (B). Liver p-SMAD1/5/8 protein levels expressed in fold-change, n=8 in all groups (C). Liver ferroportin protein levels expressed in fold-change, n=8 in all groups (D). Spleen ferroportin protein levels expressed in fold-change, n=8 in all groups (E). Spleen hephaestin protein levels expressed in fold-change, n=8 in all groups (F). Duodenum ferroportin protein levels expressed in fold-change, n=7 in *CP<sup>+/+</sup>* group, n=6 in *CP<sup>-/-</sup>* group (G). Duodenum hephaestin protein levels expressed in fold-change, n=7 in *CP<sup>+/+</sup>* group, n=6 in *CP<sup>-/-</sup>* group (H).



**Supplemental data Figure 3 :** Liver *F5* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (A). Liver *F8* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (B). Liver *Atp7a* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (C). Spleen *Atp7a* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (D). Liver *Atp7b* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (E). Spleen *Atp7b* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (F). Liver *Slc31a1* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (G). Spleen *Slc31a1* mRNA levels expressed in negative delta cycle threshold, n=10 in all groups (H).

| <b>Gene</b>     | <b>Forward primer</b>     | <b>Reverse primer</b>  |
|-----------------|---------------------------|------------------------|
| <i>Atp7a</i>    | TGGCTGGAACACATAGCGAA      | TCCACTTGTTCTTCACTCAGGA |
| <i>Atp7b</i>    | CAAGGTCATCGAGGAAATCGGC    | CATGACGGGGATGCCAAACA   |
| <i>F8</i>       | TGCCATGGGACTATGTGAGC      | TTTGCCGTGTGGAAAAACCG   |
| <i>F5</i>       | ATCTATGGGAGGAGGCACGA      | TGCGTCTTGGATTGGAActCA  |
| <i>Gusb</i>     | TCGAACAATCGGTTGCAGG       | AGCCAATGAAGTTCCGAAGC   |
| <i>Hamp</i>     | CTGCAGCCTTGGCATGG         | CAGCAGCGCACTGTCACTCA   |
| <i>Heph</i>     | ATGCACTGCCACGTTACTGA      | CTGCAGAATCACAGCTTTTCCA |
| <i>Hfe</i>      | GTGGGATCACCATTGTGCCAT     | ATGCTGCAGGTCACTCACACT  |
| <i>Hjv</i>      | TCCTCTTTGTCCAAGCCACC      | TCGCCCCCATGACAGAAC     |
| <i>Hprt1</i>    | CTGATTATGGACAGGACTGAAAGAC | CCAGCAGGTCAGCAAAGAAct  |
| <i>Slc11a2</i>  | CTTTGTCTGCTCCGCTTTGTC     | ATGGGGGCTGCTGCTATTTC   |
| <i>Slc31a1</i>  | ACGAGATGATGATGCCTATGACC   | AACACTGCCACAAAAGCTCC   |
| <i>Slc39a14</i> | GGCTGGAGGATTTCACTGTGT     | ACCAAACAGCACCAACAGGA   |
| <i>Slc40a1</i>  | AGGACTGGATTGTTGTCGT       | GACTGGGGAACCGAATGTCA   |
| <i>Tbp</i>      | GGGATTGTACCACAGCTCCA      | CAGCAAACCGCTTGGGATTA   |
| <i>Tjrc</i>     | AGCTGGACTGCAGGAGACTA      | GGGCTGGCAGAAACCTTGAA   |
| <i>Tjr2</i>     | CATGTACAACGTGCGCATCA      | GGAAAATGTGGCGGAATGGG   |

**Supplemental data Table 1** : Sequences of forward and reverse primers used for real time qPCR.

|                                | CP <sup>+/+</sup> |        |        | CP <sup>+/-</sup> |        |         | CP <sup>-/-</sup> |        |        | p-value |
|--------------------------------|-------------------|--------|--------|-------------------|--------|---------|-------------------|--------|--------|---------|
|                                | N                 | Mean   | SD     | N                 | Mean   | SD      | N                 | Mean   | SD     |         |
| Liver molybdenum (µg/g)        | 10                | 2,05   | 0,30   | 10                | 2,18   | 0,29    | 10                | 2,09   | 0,19   | ns      |
| Liver zinc (µg/g)              | 10                | 100,95 | 10,19  | 10                | 101,15 | 9,68    | 10                | 99,86  | 8,56   | ns      |
| Liver cobalt (µg/g)            | 10                | 0,21   | 0,16   | 10                | 0,16   | 0,06    | 10                | 0,13   | 0,04   | ns      |
| Liver manganese (µg/g)         | 10                | 7,99   | 1,18   | 10                | 7,71   | 0,93    | 10                | 8,66   | 0,52   | ns      |
| Spleen molybdenum (µg/g)       | 10                | 0,80   | 0,14   | 10                | 0,72   | 0,22    | 8                 | 0,66   | 0,13   | ns      |
| Spleen zinc (µg/g)             | 10                | 76,59  | 8,57   | 10                | 89,80  | 34,71   | 8                 | 77,88  | 7,59   | ns      |
| Spleen cobalt (µg/g)           | 10                | 0,08   | 0,03   | 10                | 0,06   | 0,02    | 8                 | 0,08   | 0,03   | ns      |
| Spleen manganese (µg/g)        | 10                | 1,04   | 0,12   | 10                | 1,06   | 0,09    | 8                 | 0,95   | 0,10   | ns      |
| Plasma molybdenum (µmol/L)     | 10                | 0,19   | 0,06   | 10                | 0,17   | 0,03    | 10                | 0,18   | 0,04   | ns      |
| Plasma zinc (µmol/L)           | 10                | 23,31  | 2,09   | 10                | 23,24  | 3,95    | 10                | 22,22  | 1,97   | ns      |
| Plasma cobalt (µmol/L)         | 10                | 0,03   | 0,02   | 10                | 0,03   | 0,01    | 10                | 0,03   | 0,02   | ns      |
| Erythrocytes molybdenum (µg/L) | 10                | 0,59   | 0,54   | 10                | 0,85   | 1,34    | 10                | 0,7    | 0,67   | ns      |
| Erythrocytes zinc (µg/L)       | 10                | 6960   | 591,85 | 10                | 7337,2 | 1216,32 | 10                | 7004,7 | 579,59 | ns      |

*Supplemental data Table 2* : Metal concentrations in liver, spleen, plasma, and erythrocytes. ns : no statistically significant difference.

## DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif de préciser le phénotype hépatosplénique acéruoplasminémique chez l'Homme, au moyen, i) d'une synthèse des cas reportés dans la littérature, ii) et d'un modèle de rats knock-out développé pour mimer ce phénotype, et permettre son étude. Notre hypothèse était que la céruloplasmine n'est pas indispensable à la sortie du fer macrophagique, et que des mécanismes sans lien direct avec le rôle rapporté de la céruloplasmine sont à l'origine du phénotype hépatosplénique rencontré dans la pathologie. Les données récoltées chez l'Homme ont mis en évidence une surcharge en fer hépatocytaire, sans surcharge en fer macrophagique, ni hépatique, ni splénique. Ce phénotype, contrastant avec le rôle biologique rapporté de la céruloplasmine, était également présent dans notre modèle de rats acéruoplasminémiques.

### A. Capacité du modèle de rats à reproduire le phénotype acéruoplasminémique humain

Un des objectifs majeurs de ce travail était de reproduire dans notre modèle de rats knock-out pour le gène de la céruloplasmine, le phénotype acéruoplasminémique rencontré chez l'Homme, notamment au niveau hépatosplénique.

Les patients acéruoplasminémiques homozygotes dont les cas étaient rapportés dans l'étude présentaient des taux plasmatiques de céruloplasmine effondrés, au même titre que leur activité ferroxidase plasmatique, lorsque celle-ci était mesurée. Nos animaux reproduisaient ces paramètres, les concentrations en céruloplasmine plasmatique ainsi que l'activité ferroxidase plasmatique totale étant réduites de moitié chez les animaux hétérozygotes, et effondrées chez les animaux homozygotes, en comparaison avec les animaux sauvages.

De plus, la synthèse des cas cliniques d'acéruoplasminémie rapportés dans la littérature mettait en évidence la fréquence de l'anémie dans la pathologie, au même titre que de basses valeurs de concentrations sériques en fer et de saturation de la transferrine. Ce phénotype plasmatique était bien reproduit chez nos animaux homozygotes, lesquels présentaient en effet une baisse des concentrations plasmatiques en fer ainsi qu'une baisse de la saturation de la transferrine en comparaison aux animaux sauvages et hétérozygotes.

L'anémie mise en évidence chez l'Homme n'était cependant pas retrouvée chez nos animaux homozygotes pour la mutation.

En termes de phénotype tissulaire, les patients figurant dans la revue des cas cliniques publiés présentaient une surcharge hépatique en fer, majoritairement hépatocytaire, avec des dépôts de fer également localisés au niveau des cellules de Kupffer dans certains cas. Aucune surcharge en fer n'était objectivable au niveau splénique, d'après les images par résonance magnétique, lesquelles ne permettaient cependant pas une quantification précise des concentrations en fer. Nos animaux homozygotes reproduisaient ce phénotype, et présentaient bien une surcharge en fer hépatique, localisée dans les hépatocytes, tandis que les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, ne présentaient pas de signes évidents de surcharge en fer, en comparaison aux animaux sauvages. Enfin, la rate des animaux homozygotes avaient des concentrations en fer abaissées en comparaison à celles des animaux sauvages et hétérozygotes.

Notre étude de synthèse des cas d'acéruplasminémie a ainsi mis en évidence des phénotypes plasmatiques et hépatospléniques, bien reproduits chez nos animaux acéruplasminémiques, à l'exception de l'anémie. L'effondrement de la céruloplasmine plasmatique et de l'activité ferroxidase dans notre modèle atteste de l'impact de la mutation dans la genèse de l'acéruplasminémie chez nos animaux, tandis que la reproduction par notre modèle, du phénotype acéruplasminémique rencontré chez l'Homme, notamment au niveau hépatosplénique, suggère que ce modèle est adapté à l'étude du phénotype hépatosplénique rencontré dans la pathologie. Cependant, l'utilisation de notre modèle pour l'étude de la surcharge en fer cérébrale acéruplasminémique ne semble pas appropriée, compte tenu de l'absence de dépôts de fer évidents dans le cerveau de nos animaux homozygotes.

#### *B. Intérêt du modèle de rats en comparaison aux modèles de souris existants*

Le modèle de rats acéruplasminémiques utilisé dans notre étude est adapté à l'étude du phénotype hépatosplénique rencontré chez l'Homme. Cependant, des modèles de souris acéruplasminémiques ont été développés auparavant, posant ainsi la question de l'intérêt particulier que présente notre modèle en comparaison avec ceux déjà existants.



En premier lieu, notre modèle semble présenter un intérêt en comparaison avec les modèles de souris utilisés précédemment, en raison des divergences de phénotypes existants entre ces derniers, certains d'entre eux échouant en effet à reproduire le phénotype acéruoplasminémique humain. Les phénotypes relatifs au métabolisme du fer rencontrés dans ces modèles sont en effet divergents en plusieurs points. Concernant le phénotype plasmatique rencontré dans ces modèles, certaines données sont semblables à celles rencontrées chez l'Homme, avec une baisse des concentrations plasmatiques en fer et de la saturation de la transferrine chez les souris homozygotes sur la mutation<sup>306,316,319,391</sup>. A l'inverse, d'autres données montrent des concentrations plasmatiques en fer et une saturation de la transferrine ne variant pas significativement en comparaison aux souris sauvages<sup>181</sup>. Par ailleurs, certains modèles de souris tendent à reproduire le phénotype hépatosplénique présent dans l'acéruoplasminémie humaine, avec une élévation des concentrations hépatiques en fer, de localisation principalement hépatocytaire, associée à une absence de variation des concentrations spléniques en fer<sup>306</sup>. D'autres modèles indiquent cependant une hausse des concentrations spléniques en fer chez les animaux acéruoplasminémiques<sup>181,317</sup>. La difficulté d'une comparaison rigoureuse de notre modèle de rats acéruoplasminémiques avec les modèles de souris réalisés précédemment tient notamment au fait que tous les paramètres de distribution du fer n'y sont pas systématiquement étudiés. Ainsi, certaines études de souris présentent, comme dans notre modèle, une baisse de la concentration plasmatique en fer, mais ne renseignent pas sur les taux de saturation de la transferrine des animaux malades<sup>317,318,320</sup>. De même, de nombreuses études renseignent sur les concentrations hépatiques en fer, en ne mentionnant pas cependant les concentrations spléniques en fer, ou encore la distribution intra-hépatique des dépôts de fer<sup>315,317,318,320,321,391</sup>.

En second lieu, notre modèle semble présenter un intérêt en raison de notre choix d'utiliser une lignée non-consanguine, les modèles de souris acéruoplasminémiques existants étant majoritairement basés sur des lignées consanguines. En effet, l'intérêt de l'utilisation préférentielle de lignées non-consanguines dans les recherches impliquant une étude phénotypique, a fait l'objet d'une synthèse récente<sup>392</sup>. L'utilisation de lignées non-consanguine pourrait permettre à ce titre une meilleure reproductibilité entre les études<sup>392</sup>. Au regard de ces considérations, l'utilisation de la lignée Sprague-Dawley présente un intérêt en comparaison aux lignées souvent utilisées dans les précédents modèles. En effet, les résultats

précédemment obtenus sur des lignées de souris consanguines C57BL/6J et BALB/c sont sujets à un manque de reproductibilité de certains paramètres étudiés. A titre d'exemple, le modèle réalisé par Patel et collaborateurs sur fond génétique C57BL/6J donne lieu à une localisation hépatique des dépôts de fer majoritairement hépatocytaire chez les souris homozygotes, ne présentant par ailleurs pas d'anémie <sup>306</sup>. A l'inverse, dans le modèle développé par Yamamoto et collaborateurs sur la lignée BALB/c, les dépôts de fer hépatiques sont localisés dans les hépatocytes ainsi que dans les cellules de Kupffer, et les souris sont par ailleurs anémiées <sup>320</sup>. Le fait que la lignée consanguine utilisée ait un impact sur le phénotype en lien avec le métabolisme du fer, a en effet déjà été caractérisé dans plusieurs études <sup>393,394</sup>. Par ailleurs, ce manque de reproductibilité phénotypique peut également être retrouvé entre des études utilisant une même mutation. A ce titre, dans l'étude de Cherukuri et collaborateurs ainsi que dans celle de Fuqua et collaborateurs, utilisant des lignées C57BL/6J, les souris homozygotes pour la mutation acéruoplasminémique sont anémiées <sup>316,319</sup>. Cependant dans l'étude de Chen et collaborateurs, les souris C57BL/6J homozygotes pour la même mutation ne présentent pas d'anémie <sup>317</sup>. De même, dans cette étude de Chen et collaborateurs, les concentrations spléniques en fer sont significativement augmentées dans le groupe homozygote, tandis qu'elles restent invariables comparées à celles des animaux C57BL/6J contrôles sauvages dans l'étude de Jiang et collaborateurs, utilisant la même mutation <sup>317,318</sup>. Néanmoins, ces divergences de phénotypes ne sont pas uniquement imputables à la consanguinité des lignées utilisées. En effet, ce défaut de reproductibilité a également eu lieu sur une lignée non-consanguine black Swiss-Webster, entre l'étude originale de Harris et collaborateurs, et une étude de Meyer et collaborateurs reprenant ce modèle sur le même fond génétique ; en effet, l'étude de Harris montrait une hausse des concentrations spléniques en fer chez les animaux homozygotes par rapport aux animaux sauvages, tandis que ces concentrations restaient inchangées dans l'étude de Meyer <sup>181,315</sup>. Ce constat suggère que le manque de reproductibilité entre les études pourrait aussi être lié à d'autres facteurs, potentiellement en lien avec une variable environnementale, cette dernière étant également à même d'influer sur les phénotypes <sup>392</sup>. Cependant, du fait de la plus grande hétérogénéité de leur fond génétique, les lignées non-consanguines reproduisent davantage la variabilité génétique présente dans la population humaine ; ainsi, ces lignées permettent de limiter les biais liés au manque de variabilité interindividuelle, exposant à une sur-évaluation de certains effets d'une condition au sein d'un groupe <sup>392</sup>. Ainsi, les résultats obtenus sur des lignées non-consanguines seraient potentiellement davantage « généralisables » que ceux obtenus sur des

lignées consanguines <sup>392</sup>. Dans l'optique d'expliquer le phénotype hépatosplénique observé chez l'Homme, l'utilisation d'une lignée ayant une variabilité génétique relativement haute serait donc préférable, afin de reproduire un contexte de fond génétique hétérogène au sein duquel, chez l'Homme, le phénotype hépatosplénique acéruoplasminémique s'exprime de manière semblable entre des patients n'ayant à première vue aucun lien de parenté.

Enfin en troisième lieu, l'utilisation originale d'un modèle de rats semble présenter un certain intérêt en comparaison à un modèle de souris, du fait que ces dernières expriment, à l'inverse de l'Homme, deux isoformes d'hepcidine <sup>395</sup>. Alors même que ces deux isoformes semblent être co-inductibles en cas de surcharge en fer hépatique, il est suggéré que leur rôle respectif pourrait diverger en partie, laissant un certain degré d'incertitude quant aux différences fonctionnelles exactes de ces deux peptides <sup>395</sup>. De plus, l'expression de ces deux isoformes serait variable en fonction du fond génétique utilisé, notamment dans les lignées de souris consanguines <sup>396</sup>. L'utilisation d'un modèle de rats semble donc moins confondante, et plus proche des conditions biologiques rencontrées chez l'Homme.

Notre modèle de rats acéruoplasminémiques semble donc présenter plusieurs intérêts dans l'étude phénotypique de l'acéruoplasminémie héréditaire, en comparaison aux modèles de souris précédents, en raison, d'une part, des divergences phénotypiques observées entre certains de ces modèles et l'acéruoplasminémie humaine, d'autre part, de l'utilisation d'une lignée non-consanguines dans notre modèle, et enfin, de l'utilisation du rat dans notre modèle, lequel au même titre que l'Homme, n'exprime qu'un seul isoforme d'hepcidine.

### *C. Rôle d'une hepcidino-déficience dans l'acéruoplasminémie*

Dans notre étude, nous avons utilisé notre modèle pour tenter d'expliquer le phénotype hépatosplénique acéruoplasminémique, à travers différentes questions mécanistiques. Parmi celles-ci, le rôle de l'hepcidine a été évalué.

Le phénotype rencontré dans l'acéruoplasminémie incite à s'interroger sur la présence d'une hepcidino-déficience dans la pathologie. En effet, d'après les données récoltées dans notre synthèse, l'acéruoplasminémie héréditaire se caractérise par un phénotype de surcharge hépatique similaire à celui rencontré dans les hémochromatoses, pathologies hepcidino-

déficientes, bien que, toujours d'après notre synthèse, l'hépcidino-déficiencia ne soit pas retrouvée de manière systématique chez les patients acéruoplasminémiques. Cependant, parmi l'ensemble des pathologies de surcharge hépatique en fer, deux grands types de surcharge semblent pouvoir être distingués : d'une part la surcharge en fer hépatocellulaire, touchant les hépatocytes avec un gradient porto-centrolobulaire décroissant et épargnant les cellules de Kupffer, et d'autre part la surcharge en fer macrophagique touchant essentiellement les cellules de Kupffer <sup>288,397</sup>. La surcharge de type hépatocellulaire est présente dans les hémochromatoses, tandis que la surcharge de type macrophagique est présente dans la maladie de la ferroportine <sup>288,397</sup>. L'acéruoplasminémie est donc caractérisée par un phénotype de surcharge hépatique similaire à celui rencontré dans les hémochromatoses, avec une localisation parenchymateuse, et la présence fréquente d'un gradient porto-centrolobulaire décroissant, malgré une physiopathologie semblant être éloignée de celle des hémochromatoses, car ne présentant pas systématiquement d'hépcidino-déficiencia. Corroborant ce constat formulé chez l'Homme, les niveaux hépatiques d'ARNm d'hépcidine retrouvés chez nos animaux homozygotes ne variaient pas significativement en comparaison à ceux des animaux sauvages, alors qu'une hausse de ce paramètre était attendue compte tenu de la surcharge hépatocytaire présente chez ces animaux <sup>219</sup>. De même, des résultats préalablement publiés dans deux modèles de souris montraient la même tendance <sup>317,319</sup>. Cependant, un autre modèle de souris montrait au contraire des niveaux hépatiques d'ARNm d'hépcidine 1 significativement abaissés chez les animaux acéruoplasminémiques homozygotes en comparaison aux animaux contrôles sauvages <sup>391</sup>. De plus, malgré des niveaux d'ARNm d'hépcidine inchangés dans notre modèle, le ratio existant entre ces niveaux d'ARNm et les concentrations hépatiques en fer étaient fortement abaissés dans le groupe homozygote en comparaison aux deux autres groupes, ceci suggérant une hépcidino-déficiencia relative dans le groupe des animaux malades. En effet, d'après ce ratio, il semble que le gène de l'hépcidine ne s'exprime pas à hauteur de ce qu'il devrait au regard des valeurs de concentrations hépatiques en fer élevées du groupe homozygote, supposées donner lieu à une surexpression du gène de l'hépcidine par le biais de la voie de transduction BMP/SMAD <sup>217,220</sup>.

Nous avons tenté de comprendre les mécanismes de cette hépcidino-déficiencia relative. Cependant, le niveau hépatique des formes phosphorylées des protéines SMAD1/5/8 ne variait effectivement pas entre les groupes homozygote et sauvage. En outre, le niveau

hépatique des formes phosphorylées de la protéine STAT3 restait également invariable entre les deux groupes, au même titre que le niveau hépatique des formes phosphorylées des protéines ERK1/2, et ce malgré une saturation de la transferrine plus basse chez les animaux homozygotes, supposée se traduire par une moindre activation du signal MAPK aboutissant à la phosphorylation des protéines ERK1/2 <sup>214-216</sup>. Par ailleurs, les données cliniques récoltées chez l'Homme, ainsi que les études réalisées sur les modèles de souris, ne fournissent pas d'éléments de réponse mécanistiques, quant à la survenue de l'hepcidino-déficience.

La question de l'implication de l'hepcidino-déficience dans la survenue du phénotype hépatosplénique, en particulier la surcharge hépatocytaire en fer, a également été posée. Au regard de cette déficience relative en hepcidine, associée à la surcharge hépatique en fer, le dosage des concentrations de NTBI semblait comporter un intérêt. En effet, le NTBI est considéré comme l'effecteur par lequel la déficience en hepcidine est à même d'induire la surcharge hépatique en fer, dans un nombre important de pathologies de surcharge en fer, notamment l'hémochromatose de type 1 associée à la mutation du gène *HFE* <sup>72</sup>. Cependant, notre synthèse rend compte d'un cas clinique montrant l'absence de NTBI, ceci tendant à corroborer le fait que les surcharges en fer hémochromatosiques et l'acéruplasminémiques soient sujets à des mécanismes physiopathologiques différents, malgré des types de surcharge hépatique en fer très proches. De plus, les niveaux de NTBI abaissés dans le sang périphérique de nos animaux homozygotes en comparaison aux deux autres groupes, par ailleurs en cohérence avec la baisse des niveaux périphériques de saturation de la transferrine dans le groupe homozygote, semblent également indiquer que le NTBI n'a pas d'implication dans la surcharge en fer hépatique observée chez les animaux malades. Cette absence d'implication du NTBI est par ailleurs confirmée par les valeurs de NTBI dans le sang portal, également abaissés dans le groupe homozygote, en cohérence avec les valeurs de saturation de la transferrine et de fer plasmatique au niveau portal, elles-mêmes abaissés chez les animaux de ce même groupe. Ce NTBI portal a été dosé dans l'hypothèse d'une élévation du NTBI portal ne se reflétant pas dans les valeurs de NTBI périphérique du fait de sa captation rapide par les hépatocytes à l'issue de la circulation portale <sup>72</sup>. Les niveaux hépatiques d'ARNm du gène *Slc39a14* n'étaient pas plus élevés chez les animaux homozygotes ; ce constat renforçait l'hypothèse d'une surcharge hépatique en fer indépendante du NTBI. En effet, le gène *Slc39a14* code pour le transporteur ZIP14 ; ce transporteur permet l'entrée massive du NTBI dans les hépatocytes, pouvant ainsi générer une surcharge en fer <sup>272</sup>. Ces

investigations relatives au NTBI et aux paramètres plasmatiques du fer dans la circulation portale semblaient d'autant plus importantes qu'aucun modèle animal d'acéruoplasminémie héréditaire ne renseigne sur les valeurs de NTBI, de paramètres plasmatiques du fer au niveau portal, ou encore d'expression du gène de ZIP14, malgré une surcharge en fer hépatique présente dans chacun de ces modèles<sup>181,306,315,317-321,391</sup>.

Une hepcidino-déficiencia relative semble donc pouvoir être présente dans l'acéruoplasminémie ; cependant, cette hepcidino-déficiencia n'est pas expliquée pour le moment. De plus, son rôle dans la survenue du phénotype hépatosplénique acéruoplasminémique ne peut pas être attesté.

#### D. Rôle des principaux transporteurs du fer et de l'hepcidina dans le phénotype acéruoplasminémique

Dans l'étude du phénotype acéruoplasminémique à travers notre modèle, se pose la question du rôle des transporteurs du fer dans la génèse de ce phénotype.

Concernant le phénotype hépatique, consistant en une surcharge en fer au niveau hépatocytaire, deux types de mécanismes majeurs pouvaient être envisagés, d'une part, une entrée de fer accrue dans les hépatocytes, d'autre part, une sortie limitée du fer hépatocytaire. L'absence apparente d'implication du NTBI et de ZIP14 évoquée plus haut, associée à des niveaux hépatiques d'ARNm de *Tfrc* et de *Slc11a2* inchangés entre les groupes, suggèrent que la surcharge hépatocytaire en fer n'est probablement pas le résultat d'une captation accrue du fer par le biais de ces transporteurs, tandis qu'à plus forte raison, une étude menée sur un modèle de souris montrait une baisse des niveaux hépatiques d'ARNm de *Tfrc* et *Slc11a2* chez les animaux acéruoplasminémiques<sup>320</sup>. De plus, dans notre modèle, l'absence de baisse des ARNm de *Tfrc* malgré la surcharge hépatique en fer, est inattendue au regard du rôle du système de régulation IRP/IRE ; en effet, comme évoqué dans l'introduction générale (*partie 1.5.3., page 46*), ce système de régulation est supposé engendrer une baisse des niveaux d'ARNm de *Tfrc* en cas de hausse des taux de fer hépatiques<sup>263</sup>. Par ailleurs, les niveaux inchangés de ferroportine et d'ARNm de *Slc40a1* au niveau hépatique, semblent indiquer l'absence d'un éventuel phénomène de rétention du fer dans les hépatocytes. Cette absence d'implication de la ferroportine était déjà suggérée par certaines données antérieures

provenant d'un modèle de souris <sup>320</sup>. Une autre étude en revanche, montrait des niveaux de ferroportine hépatique accrus en termes d'ARNm et de protéines chez les animaux acéruplasminémiques <sup>317</sup>.

Considérant le phénotype splénique, lequel consistait en une baisse des concentrations en fer, associée à une réduction des dépôts de fer dans la pulpe rouge visible histologiquement, les mécanismes envisagés semblaient probablement liés à une baisse de l'approvisionnement en fer des macrophages spléniques, ou une sortie accrue du fer macrophagique splénique. En raison de l'absence d'anémie, associée à l'absence de baisse des concentrations érythrocytaires en fer, l'hypothèse d'une moindre récupération macrophagique du fer lors de l'érythrophagocytose ne semble pas pouvoir être retenue. Les niveaux spléniques d'ARNm de *Tfrc* n'étaient pas abaissés dans le groupe homozygote, suggérant que la baisse des niveaux de fer dans les macrophages de la rate n'est pas liée au transporteur TfR1. Par ailleurs, les niveaux de ferroportine splénique membranaire ne variaient pas entre les groupes, suggérant l'absence d'implication de cette protéine dans la baisse des niveaux de fer dans la rate. Cette absence de variation des niveaux de ferroportine membranaire dans la rate et dans le foie, semble par ailleurs indiquer que la céruloplasmine n'est pas indispensable à la stabilité de la ferroportine sur les membranes cellulaires, contrastant avec le rôle décrit de la céruloplasmine à l'égard de la ferroportine macrophagique <sup>184</sup>. Cependant, les niveaux d'ARNm du gène *Slc40a1*, codant pour la ferroportine, sont légèrement mais significativement augmentés au niveau splénique dans le groupe homozygote en comparaison aux animaux sauvages. L'éventualité d'une dégradation de la ferroportine à la membrane, compensée par une hausse de l'expression de son gène codant, ne serait donc pas à exclure.

Le phénotype plasmatique rencontré dans l'acéruplasminémie ne semble pas non plus être en lien avec les transporteurs du fer. En effet, la stabilité de la ferroportine au niveau splénique suggère que la baisse des niveaux de fer plasmatique chez les animaux homozygotes n'est pas le résultat d'un moindre approvisionnement en fer provenant des macrophages. De même cette baisse du fer biodisponible ne semble pas être le résultat d'une moindre absorption du fer au niveau entérocytaire, l'expression duodénale de la ferroportine étant également stable entre les groupes tant en termes d'ARNm que de protéine, en cohérence avec des données récoltées sur un précédent modèle de souris <sup>319</sup>. De plus, l'analyse histologique du duodénum ne montrait pas d'accumulation de fer dans les

entérocytes de nos animaux homozygotes. Cependant, d'autres données montraient des niveaux de ferroportine accrus dans les entérocytes des animaux acéruoplasminémiques homozygotes<sup>317</sup>. A l'inverse, une autre étude montrait des niveaux d'ARNm de *Slc40a1* abaissés dans le duodénum des animaux acéruoplasminémiques<sup>320</sup>. Cette baisse du fer biodisponible dans l'acéruoplasminémie, au regard de nos données, ne semble pas non plus en lien avec l'absorption du fer non-héminique luminal assuré par le transporteur DMT1, les niveaux d'ARNm de *Slc11a2* codant pour le transporteur DMT1 étant inchangés dans le duodénum, comme déjà suggéré par une précédente étude<sup>320</sup>. Au regard des questionnements relatifs au rôle du duodénum, une perspective possible serait l'étude de l'absorption du fer alimentaire chez ces animaux, par prélèvement itératifs de sang veineux mésentérique, suite à l'administration d'une dose de fer par voie orale.

Enfin, l'expression de l'héphaestine a été évaluée au sein de notre modèle en raison de son activité ferroxidase rapportée ; en effet, en réponse à l'absence de céruloplasmine, un potentiel rôle compensatoire de l'héphaestine était envisagé<sup>41,318</sup>. A ce titre, dans une étude utilisant des souris acéruoplasminémiques, l'expression de l'héphaestine était accrue dans l'hippocampe et le cervelet des animaux homozygotes, comparées aux souris contrôles sauvages<sup>318</sup>. Par ailleurs, dans un autre modèle de souris knock-out, une surexpression de la ferroportine avait lieu au niveau entérocytaire en l'absence d'héphaestine, suggérant un lien entre cette ferroxidase et la protéine d'export du fer<sup>319</sup>. Cependant, nos rats acéruoplasminémiques homozygotes ne présentaient aucune modification d'expression de l'héphaestine splénique et duodénale, tant en termes d'ARNm que de protéine, en comparaison aux animaux sauvages.

Les comparaisons entre les groupes, des niveaux d'expression des principaux transporteurs du fer, ainsi que de l'héphaestine, réalisées dans notre modèle, et comparées aux données des modèles existants, ne permettent donc pas d'expliquer les phénotypes hépatiques, splénique, et plasmatique rencontrés dans l'acéruoplasminémie.

#### E. Impact de l'acéruoplasminémie sur les métaux non-ferreux



En raison des liens rapportés entre le métabolisme du fer et celui des métaux non-ferreux, l'impact de l'acéruplasminémie sur le métabolisme de ces derniers a été évalué dans notre modèle <sup>398</sup>.

A ce titre, la stabilité de l'expression de la ferroportine et des ARNm de DMT1 dans notre modèle pose certaines questions relatives au métabolisme du manganèse, du zinc, et du cobalt. En effet, la ferroportine, au même titre que DMT1, est impliquée dans le transport du manganèse, dont les concentrations plasmatiques sont significativement augmentées chez les animaux homozygotes de notre modèle <sup>398</sup>. En revanche, le zinc et le cobalt, deux métaux dont le transport peut également être assuré par la ferroportine et DMT1, avaient des concentrations plasmatiques inchangées entre les groupes <sup>398</sup>. Par ailleurs, de manière surprenante, les concentrations en zinc au niveau hépatique, splénique, et érythrocytaire, ne variaient pas non plus chez nos animaux acéruplasminémiques, quand bien même des liens étroits sont suspectés entre la céruloplasmine et le zinc ; en effet chez l'Homme, il a été rapporté qu'un excès de zinc pouvait induire une hypocuprémie, à même de causer une acéruplasminémie secondaire, par carence en cuivre <sup>399</sup>.

L'hypocuprémie est en effet attendue dans l'acéruplasminémie, en raison du fait que la céruloplasmine plasmatique renferme dans sa structure environ 93 % du cuivre plasmatique total chez l'Homme <sup>380</sup>. Cette hypocuprémie est retrouvée chez nos animaux homozygotes, lesquels présentaient une cuprémie effondrée, tandis que nos animaux hétérozygotes avaient une cuprémie environ réduite de moitié en comparaison aux animaux contrôles sauvages, ceci confirmant, au même titre que les valeurs de céruloplasmine plasmatique et d'activité ferroxidase évoquées plus haut, la présence d'une acéruplasminémie effective chez nos animaux homozygotes, en lien avec la mutation. Les concentrations en cuivre présentes dans le sérum et les tissus ont été étudiées dans un précédent modèle utilisant des souris ; comme dans notre modèle, les concentrations plasmatiques en cuivre étaient effondrées <sup>315</sup>. Cette étude présentait également des concentrations en cuivre hépatiques et spléniques inchangées entre les animaux acéruplasminémiques et sauvages <sup>315</sup>.

Dans notre modèle, les concentrations en cuivre dans le foie des animaux homozygotes ne variaient pas de celles des animaux sauvages ; en revanche, les concentrations en cuivre étaient significativement plus basses dans les rates de nos animaux acéruplasminémiques homozygotes et hétérozygotes, que dans celles de nos animaux

sauvages. Cette baisse des concentrations spléniques en cuivre étaient d'autant plus inattendue que, à l'exception des concentrations plasmatiques en céruloplasmine, des valeurs d'activité ferroxidase, et de la cuprémie, l'ensemble des variations observées dans notre modèle opposait le groupe homozygote aux deux autres groupes, les hétérozygotes ayant des paramètres du fer ne variant pas de ceux des contrôles sauvages. Ces résultats indiquent que le métabolisme du cuivre est sujet à des altérations déjà présentes chez les animaux hétérozygotes, à l'inverse du métabolisme du fer semblant uniquement impacté par l'homozygotie dans notre modèle. Ce contraste suggère que les altérations des métabolismes du fer et du cuivre sont les résultats de mécanismes distincts. Par ailleurs, les niveaux de cuivre érythrocytaires n'étaient pas diminués dans les groupes homozygotes et hétérozygotes, excluant ainsi une baisse des niveaux de cuivre spléniques due à un niveau moindre de relargage du cuivre présent dans les érythrocytes, lors de l'érythrophagocytose. A ce titre, il convient également de préciser que la hausse du cobalt érythrocytaire chez les animaux homozygotes ne s'accompagne pas d'une hausse du cobalt splénique, de même que, comme évoqué précédemment, la baisse du fer splénique chez ces mêmes animaux ne s'explique pas par une baisse du fer érythrocytaire. Ainsi, les modifications de concentrations en métaux dans les macrophages de la rate ne semblent pas être le résultat de mécanismes en lien avec le processus d'érythrophagocytose.

Le rôle des transporteurs du cuivre dans la genèse de ce phénotype a été recherché. En effet, la protéine membranaire CTR1 permet l'importation du cuivre au sein de la cellule, tandis que les transporteurs Copper transporting ATPase 1 (ATP7A) et ATP7B permettent l'importation du cuivre dans l'appareil de Golgi et ainsi son intégration aux protéines nouvellement synthétisées<sup>400</sup>. L'expression de la protéine ATP7A serait ubiquitaire, tandis qu'ATP7B serait davantage localisée dans certains organes tels que le foie, les reins, et le cerveau ; par ailleurs en cas d'excès de cuivre cellulaire, ATP7A et ATP7B seraient relocalisés au niveau de la membrane plasmique pour y assurer l'exportation du cuivre<sup>400</sup>. Cependant dans notre modèle, l'absence de différences entre les génotypes, en termes de niveaux d'ARNm spléniques des gènes codant pour Ctr1, Atp7a et Atp7b, suggère que les mécanismes à l'origine de la baisse du cuivre splénique chez les animaux hétérozygotes et homozygotes, seraient indépendants de ces transporteurs du cuivre, sous réserve de résultats identiques en termes d'expression protéique de ces transporteurs. L'expression de ces gènes était par ailleurs inchangée entre les groupes au niveau hépatique et duodéal.

L'absence de variations des concentrations hépatiques en cuivre dans notre modèle est inattendue, au regard du phénotype rencontré dans la maladie de Wilson, une pathologie résultant de mutations du gène codant d'ATP7B<sup>401</sup>. En effet, cette pathologie est caractérisée par une surcharge hépatique en cuivre, en raison de l'invalidation de la protéine ATP7B<sup>400</sup>. Ce phénotype hépatique s'explique par le fait que l'invalidité d'ATP7B compromet l'excrétion du cuivre hépatique par les canaux biliaires<sup>400</sup>. D'autre part, l'importation du cuivre dans l'appareil de Golgi est également altérée par l'absence d'ATP7B, et de ce fait, l'incorporation du cuivre aux cuproprotéines, notamment la céruloplasmine, dont les concentrations plasmatiques sont effondrées dans la pathologie<sup>400,401</sup>. Ainsi, le cuivre hépatique n'est ni évacué par voie biliaire, ni exporté à l'extérieur de la cellule au travers de la sécrétion de céruloplasmine, donnant de fait lieu à une surcharge hépatique en cuivre. Dans notre modèle acéculoplasminémique, comme dans la maladie de Wilson, la céruloplasmine n'est pas sécrétée chez les animaux homozygotes, ce qui signifie que le cuivre hépatocytaire censé intégrer la structure de la céruloplasmine, ne peut pas être exporté en même temps que cette dernière. De plus, compte tenu de la nature de la mutation opérée dans notre modèle, laquelle aboutit à un codon STOP dès l'exon 2, le processus d'intégration des atomes de cuivre à la céruloplasmine n'a probablement pas lieu, du fait que la majeure partie de la structure primaire de la protéine ne soit pas synthétisée. Le cuivre destiné à entrer dans la structure de la céruloplasmine, serait donc supposé s'accumuler dans les hépatocytes, étant donné que la céruloplasmine n'est pas sécrétée. Pour ces raisons, une surcharge hépatique en cuivre pouvait être attendue. De plus, le gène codant pour *Atp7b*, protéine assurant l'évacuation du cuivre intracellulaire par voie biliaire, ne s'exprime pas davantage chez nos animaux homozygotes. Ceci suggère, sous réserve d'une expression et d'une localisation de la protéine inchangée entre les groupes, que l'absence de stase du cuivre dans les hépatocytes n'est pas imputable à un mécanisme de drainage accru du cuivre, faisant intervenir *Atp7b*.

A ce titre, le dosage plasmatique d'autres cuproprotéines circulantes exprimées et sécrétées par les hépatocytes présenterait un intérêt, afin d'évaluer un éventuel accroissement de leur sécrétion par compensation, pouvant expliquer l'absence d'accumulation de cuivre dans les hépatocytes. L'expression hépatique transcriptionnelle des gènes *F5* et *F8* codant pour les cuproportéines circulantes Facteur V et Facteur XIII demeurerait inchangée entre les groupes ; cependant, cette invariabilité reste à confirmer en termes de concentrations de ces protéines dans le plasma. A ce titre, le dosage du cuivre échangeable plasmatique dans notre modèle présenterait également un intérêt ; en effet, le ratio entre le cuivre échangeable et le

cuivre plasmatique total est fortement accru dans la maladie de Wilson<sup>402</sup>. A ce titre, ce ratio peut être utilisé comme un outil diagnostique fiable et discriminant de la pathologie<sup>403</sup>. Ceci semble pouvoir s'expliquer notamment par le fait que la concentration plasmatique en céruloplasmine, contenant environ 93 % du cuivre plasmatique, soit effondrée dans la maladie de Wilson<sup>380,401</sup>. Ainsi, le dosage du cuivre échangeable dans notre modèle permettrait de déterminer le ratio entre cette forme de cuivre et le cuivre plasmatique total chez les animaux acéruplasminémiques homozygotes et hétérozygotes, afin de déterminer dans quelle mesure le cuivre résiduel fait partie de la structure de cuproprotéines. Au vue des données actuellement fournies par notre modèle, la présence de voies alternatives de transport du cuivre est supposée. Cette suggestion semble d'autant plus envisageable, si l'on considère, comme évoqué précédemment, les baisses de concentrations en cuivre splénique ne s'accompagnant pas de modifications d'expression des gènes codant pour les transporteurs du cuivre. Cependant, l'absence de lien apparent entre les concentrations tissulaires en cuivre dans notre modèle, et les transporteurs du cuivre, doit être confirmée par l'évaluation de l'expression protéique de ces transporteurs, et, également, par l'étude de leur localisation, au regard des données montrant l'influence du cuivre sur la localisation de ces transporteurs à l'échelle subcellulaire<sup>404</sup>.

En outre, au regard de données démontrant l'intérêt de considérer les valeurs de fractionnements isotopiques des différents éléments, au-delà des simples concentrations de l'isotope de plus forte abondance, une comparaison de l'isotopie du cuivre splénique entre les groupes semble intéressante<sup>405</sup>.

Les données recueillies dans notre modèle suggèrent que l'acéruplasminémie a un impact sur le métabolisme de certains métaux non ferreux, tels que le manganèse et le cobalt ; la nature exacte de ces liens reste cependant inconnue. De plus, bien qu'un impact de l'acéruplasminémie sur le métabolisme du cuivre soit supposé en raison du lien entre le cuivre et la céruloplasmine, notre modèle a mis en évidence, de façon inattendue, une baisse des concentrations spléniques en cuivre y compris chez les animaux hétérozygotes. Cette altération du métabolisme du cuivre dans l'acéruplasminémie héréditaire n'est pas rapportée dans la littérature à ce jour.

#### *F. Conclusion et perspectives*

La synthèse des cas cliniques publiés d'acéruoplasminémie héréditaire a confirmé la présence d'un phénotype hépatosplénique associé à la pathologie, consistant en une surcharge hépatique en fer majoritairement hépatocytaire sans surcharge splénique en fer. Ce phénotype hépatosplénique était accompagné de paramètres plasmatiques du fer caractérisés par des concentrations plasmatiques en fer et des saturations de la transferrine anormalement basses, souvent associées à une anémie.

Le modèle de rats acéruoplasminémiques développé et caractérisé, a généré une acéruoplasminémie effective chez les animaux homozygotes, et a permis de reproduire des caractéristiques phénotypiques présentes chez l'Homme, en particulier le phénotype hépatosplénique en fer. Cependant, les investigations mécanistiques menées sur ce modèle n'ont pas, pour le moment, permis d'expliquer le phénotype hépatosplénique présent dans l'acéruoplasminémie. Notamment, il a pu être établi que la surcharge hépatocytaire en fer n'est pas le résultat d'un mécanisme en lien avec le NTBI et provoqué par l'hépcidino-déficience.

De même, deux protéines majeures ne semblent pas impliquées : la ferroportine, dont l'interaction avec la céruloplasmine est décrite dans la littérature, ainsi que l'hephaestine ayant une proximité fonctionnelle avec la céruloplasmine. Nos hypothèses se tournent vers l'existence d'un moyen de transport alternatif du fer, par le biais d'un ou plusieurs transporteurs membranaires non identifiés comme tels à ce jour. A ce titre, une analyse transcriptomique a été menée sur des foies et des rates d'animaux homozygotes et contrôles sauvages, avec des résultats préliminaires indiquant la modulation significative d'un certain nombre de gènes, sans lien apparent avec le métabolisme du fer. Ces modifications d'expression de gènes doivent cependant être confirmées par d'autres méthodes.

Par ailleurs, les données ayant trait à l'absorption duodénale du fer sont peu présentes dans notre modèle, les investigations portant sur l'axe hépatosplénique ayant été privilégiées ; de plus notre étude utilisait des rats à jeun, et ne rendait compte d'aucun paramètre dynamique en lien avec les processus de transport du fer. A cet égard, une perspective intéressante consisterait en la réalisation d'un cathétérisme portal faisant suite à une administration de fer par voie orale, en vue de prélèvements itératifs visant à caractériser les

paramètres plasmatiques du fer en situation post-prandiale, notamment en termes de concentrations portales en NTBI.

Notre modèle a permis de mettre en évidence des altérations du métabolisme du cuivre jusqu'alors non-répertoriées, consistant en une baisse du cuivre splénique chez les animaux homozygotes et hétérozygotes. Ces modifications ne semblaient pas en lien avec l'expression des gènes codant pour les principaux transporteurs du cuivre. Un dosage du cuivre échangeable plasmatique, ainsi qu'une étude des fractionnements isotopiques du cuivre dans la rate entre les différents génotypes, sont envisagés afin de mieux comprendre l'impact de l'acéruplasminémie sur le métabolisme de ce métal.

Enfin, au regard du phénotype rencontré dans l'acéruplasminémie humaine, la pertinence des modèles murins semble devoir être questionnée. En effet, notre revue systématique des cas cliniques publiés suggérait la présence d'une surcharge cérébrale en fer chez la majorité des patients acéruplasminémiques homozygotes. Plusieurs modèles de souris développés précédemment ne reproduisaient pas cette présence excessive de fer dans le cerveau des animaux<sup>317,318</sup>. De même, dans notre modèle, les rats acéruplasminémiques homozygotes ne présentaient aucun dépôt de fer dans le cerveau. S'ajoutant aux problématiques évoquées plus haut, concernant la reproduction du phénotype hépatosplénique et plasmatique rencontré chez l'Homme, les difficultés des modèles murins à mimer la surcharge cérébrale acéruplasminémique, suggère l'intérêt de tenter l'utilisation d'autres espèces afin d'essayer de reproduire l'intégralité du phénotype acéruplasminémique rencontré chez l'Homme.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Finch, C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* **84**, 1697–1702 (1994).
2. Brissot, P. & Loréal, O. Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries. *J. Hepatol.* **64**, 505–515 (2016).
3. Green, R. *et al.* Body iron excretion in man: a collaborative study. *Am. J. Med.* **45**, 336–353 (1968).
4. Waligora, J. & Perlemuter, L. *Anatomie: enseignement des centres hospitalo-universitaires.* (Masson, 1975).
5. Fairweather-Tait, S. J. Iron nutrition in the UK: getting the balance right. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 519–528 (2004).
6. Jacobs, A. & Miles, P. Role of gastric secretion in iron absorption. *Gut* **10**, 226 (1969).
7. Gulec, S., Anderson, G. J. & Collins, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **307**, G397–G409 (2014).
8. Han, O., Failla, M. L., Hill, A. D., Morris, E. R. & Smith Jr, J. C. Reduction of Fe (III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J. Nutr.* **125**, 1291–1299 (1995).
9. Ganz, T. Systemic iron homeostasis. *Physiol. Rev.* **93**, 1721–1741 (2013).
10. McKie, A. T. *et al.* An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755–1759 (2001).
11. Latunde-Dada, G. O., Simpson, R. J. & McKie, A. T. Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **138**, 991–995 (2008).
12. Wyman, S., Simpson, R. J., McKie, A. T. & Sharp, P. A. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. *FEBS Lett.* **582**, 1901–1906 (2008).
13. Lane, D., Bae, D.-H., Merlot, A., Sahni, S. & Richardson, D. Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* **7**, 2274–2296 (2015).

14. Gunshin, H. *et al.* Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood* **106**, 2879–2883 (2005).
15. Gunshin, H. *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482 (1997).
16. Yanatori, I. & Kishi, F. DMT1 and iron transport. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 55–63 (2019).
17. Ehrnstorfer, I. A., Manatschal, C., Arnold, F. M., Laederach, J. & Dutzler, R. Structural and mechanistic basis of proton-coupled metal ion transport in the SLC11/NRAMP family. *Nat. Commun.* **8**, 14033 (2017).
18. Gunshin, H. *et al.* Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* **115**, 1258–1266 (2005).
19. Mims, M. P. *et al.* Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood* **105**, 1337–1342 (2005).
20. Blanco, E., Kannengiesser, C., Grandchamp, B., Tasso, M. & Beaumont, C. Not all DMT1 mutations lead to iron overload. *Blood Cells. Mol. Dis.* **43**, 199–201 (2009).
21. Shayeghi, M. *et al.* Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**, 789–801 (2005).
22. Latunde-Dada, G. O., Takeuchi, K., Simpson, R. J. & McKie, A. T. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett.* **580**, 6865–6870 (2006).
23. Le Blanc, S., Garrick, M. D. & Arredondo, M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **302**, C1780–C1785 (2012).
24. Yanatori, I. *et al.* Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol.* **11**, 39 (2010).
25. Raffin, S. B., Woo, C. H., Roost, K. T., Price, D. C. & Schmid, R. Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J. Clin. Invest.* **54**, 1344–1352 (1974).
26. Uc, A., Stokes, J. B. & Britigan, B. E. Heme transport exhibits polarity in Caco-2 cells: evidence for an active and membrane protein-mediated process. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, G1150–G1157 (2004).



27. Gottlieb, Y., Truman, M., Cohen, L. A., Leichtmann-Bardoogo, Y. & Meyron-Holtz, E. G. Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica* **97**, 1489–1493 (2012).
28. Parmley, R. T., Barton, J. C., Conrad, M. E., Austin, R. L. & Holland, R. M. Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin—iron absorption. *Exp. Mol. Pathol.* **34**, 131–144 (1981).
29. West, A. R. & Oates, P. S. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 150–158 (2008).
30. Fuqua, B. K., Vulpe, C. D. & Anderson, G. J. Intestinal iron absorption. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **26**, 115–119 (2012).
31. McKie, A. T. *et al.* A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* **5**, 299–309 (2000).
32. Drakesmith, H., Nemeth, E. & Ganz, T. Ironing out ferroportin. *Cell Metab.* **22**, 777–787 (2015).
33. Donovan, A. *et al.* The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* **1**, 191–200 (2005).
34. Corradini, E. *et al.* Lack of enterocyte iron accumulation in the ferroportin disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* **35**, 315–318 (2005).
35. Quigley, J. G. *et al.* Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* **118**, 757–766 (2004).
36. Benito, P., House, W. & Miller, D. Comparison of oral and intraperitoneal iron supplementation in anaemic rats: a re-evaluation of the mucosal block theory of iron absorption. *Br. J. Nutr.* **79**, 533–540 (1998).
37. Stoffel, N. U., Zeder, C., Brittenham, G. M., Moretti, D. & Zimmermann, M. B. Iron absorption from supplements is greater with alternate day than with consecutive day dosing in iron-deficient anemic women. *Haematologica* (2019) doi:10.3324/haematol.2019.220830.

38. De Domenico, I. *et al.* The Molecular Mechanism of Heparin-mediated Ferroportin Down-Regulation. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2569 (2007).
39. Smith, M. D. & Pannaciulli, I. Absorption of inorganic iron from graded doses: its significance in relation to iron absorption tests and the "mucosal block" theory. *Brit J Haematol* **4**, 428–434 (1958).
40. Vulpe, C. D. *et al.* Hephhaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* **21**, 195 (1999).
41. Chen, H. *et al.* Hephhaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. *Blood* **103**, 3933–3939 (2004).
42. Vashchenko, G. & MacGillivray, R. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients* **5**, 2289–2313 (2013).
43. Han, O. & Kim, E. Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1000–1010 (2007).
44. Zerounian, N. R. & Linder, M. C. Effects of copper and ceruloplasmin on iron transport in the Caco 2 cell intestinal model. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 138–148 (2002).
45. Coppen, D. & Davies, N. Studies on the roles of apotransferrin and caeruloplasmin (EC 1.16.3.1) on iron absorption in copper-deficient rats using an isolated vascularly-and lumenally-perfused intestinal preparation. *Br. J. Nutr.* **60**, 361–373 (1988).
46. Xu, E. *et al.* Deletion of hephaestin and ceruloplasmin induces a serious systemic iron deficiency and disrupts iron homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**, 1905–1910 (2018).
47. Cherukuri, S. *et al.* Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metab.* **2**, 309–319 (2005).
48. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. & Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *cell* **117**, 285–297 (2004).

49. MacGillivray, R. *et al.* The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J. Biol. Chem.* **258**, 3543–3553 (1983).
50. Koechlin, B. A. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXVIII. The  $\beta$ 1-Metal-combining Protein of Human Plasma I a, b. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2649–2653 (1952).
51. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 46–54 (2019).
52. Morgan, E. Factors affecting the synthesis of transferrin by rat tissue slices. *J. Biol. Chem.* **244**, 4193–4199 (1969).
53. Lecureuil, C. *et al.* Transgenic mice as a model to study the regulation of human transferrin expression in Sertoli cells. *Hum. Reprod.* **19**, 1300–1307 (2004).
54. Tsutsumi, M., Skinner, M. & Sanders-Bush, E. Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. Regulation by serotonin and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* **264**, 9626–9631 (1989).
55. Bloch, B., Popovici, T., Levin, M. J., Tuil, D. & Kahn, A. Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 6706–6710 (1985).
56. Gomme, P. T., McCann, K. B. & Bertolini, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov. Today* **10**, 267–273 (2005).
57. Schümann, K., Schäfer, S. & Forth, W. Iron absorption and biliary excretion of transferrin in rats. *Res. Exp. Med. (Berl.)* **186**, 215–219 (1986).
58. Rutili, G. & Arfors, K. Protein concentration in interstitial and lymphatic fluids from the subcutaneous tissue. *Acta Physiol. Scand.* **99**, 1–8 (1977).
59. Lee, E. Y.-H., Barcellos-Hoff, M. H., Chen, L.-H., Parry, G. & Bissell, M. J. Transferrin is a major mouse milk protein and is synthesized by mammary epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **23**, 221–226 (1987).

60. Van Eijk, H., Van Noort, W., Dubelaar, M.-L. & Van der Heul, C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin. Chim. Acta* **132**, 167–171 (1983).
61. Jaeken, J. *et al.* Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin. Chim. Acta* **144**, 245–247 (1984).
62. Bailey, S. *et al.* Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution. *Biochemistry* **27**, 5804–5812 (1988).
63. Adam, N., Trumm, M., Smith, V. C., MacGillivray, R. T. & Panak, P. J. Incorporation of transuranium elements: coordination of Cm (III) to human serum transferrin. *Dalton Trans.* **47**, 14612–14620 (2018).
64. He, Q.-Y., Mason, A. B., Tam, B. M., MacGillivray, R. T. & Woodworth, R. C. Dual role of Lys206–Lys296 interaction in human transferrin N-lobe: Iron-release trigger and anion-binding site. *Biochemistry* **38**, 9704–9711 (1999).
65. Kumar, R. & Mauk, A. G. Protonation and anion binding control the kinetics of iron release from human transferrin. *J. Phys. Chem. B* **116**, 3795–3807 (2012).
66. Azari, P. R. & Feeney, R. E. Resistance of metal complexes of conalbumin and transferrin to proteolysis and to thermal denaturation. *J Biol Chem* **232**, 293–302 (1958).
67. Makey, D. G. & Seal, U. S. The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct.* **453**, 250–256 (1976).
68. Steere, A. N., Byrne, S. L., Chasteen, N. D. & Mason, A. B. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1820**, 326–333 (2012).
69. Beilby, J. *et al.* Transferrin index: an alternative method for calculating the iron saturation of transferrin. *Clin. Chem.* **38**, 2078–2081 (1992).
70. Yeap, B. B. *et al.* Higher ferritin levels, but not serum iron or transferrin saturation, are associated with Type 2 diabetes mellitus in adult men and women free of genetic haemochromatosis. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **82**, 525–532 (2015).

71. Peyrin-Biroulet, L., Williet, N. & Cacoub, P. Guidelines on the diagnosis and treatment of iron deficiency across indications: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* **102**, 1585–1594 (2015).
72. Sahlstedt, L., Ebeling, F., Von Bonsdorff, L., Parkkinen, J. & Ruutu, T. Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **113**, 836–838 (2001).
73. Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C. & Loréal, O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1820**, 403–410 (2012).
74. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 2258–2262 (1983).
75. McClelland, A., Kühn, L. C. & Ruddle, F. H. The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* **39**, 267–274 (1984).
76. Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R. & Greaves, M. Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J. Biol. Chem.* **257**, 8516–8522 (1982).
77. Schneider, C., Owen, M., Banville, D. & Williams, J. Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* **311**, 675 (1984).
78. Aisen, P. Transferrin receptor 1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2137–2143 (2004).
79. Jing, S. & Trowbridge, I. Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J.* **6**, 327–331 (1987).
80. Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C. & Walz, T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* **116**, 565–576 (2004).
81. Hayes, G. R., Enns, C. A. & Lucas, J. J. Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology* **2**, 355–359 (1992).
82. Byrne, S. L. *et al.* Effect of glycosylation on the function of a soluble, recombinant form of the transferrin receptor. *Biochemistry* **45**, 6663–6673 (2006).

83. Williams, A. M. & Enns, C. A. A mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycosylation sites shows reduced functionality and an association with binding immunoglobulin protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 17648–17654 (1991).
84. Rutledge, E. A., Root, B. J., Lucas, J. J. & Enns, C. A. Elimination of the O-linked glycosylation site at Thr 104 results in the generation of a soluble human-transferrin receptor. *Blood* **83**, 580–586 (1994).
85. Speeckaert, M. M., Speeckaert, R. & Delanghe, J. R. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **47**, 213–228 (2010).
86. Turkewitz, A. P., Amatruda, J. F., Borhani, D., Harrison, S. C. & Schwartz, A. L. A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment. *J. Biol. Chem.* **263**, 8318–8325 (1988).
87. Buchegger, F., Trowbridge, I. S., Liu, L. S., White, S. & Collawn, J. F. Functional analysis of human/chicken transferrin receptor chimeras indicates that the carboxy-terminal region is important for ligand binding. *Eur. J. Biochem.* **235**, 9–17 (1996).
88. Johnson, L. S., Dunn, K., Pytowski, B. & McGraw, T. E. Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1251–1266 (1993).
89. Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. & Van Der Goot, F. G. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* **3**, e2758 (2008).
90. Daro, E., Van Der Sluijs, P., Galli, T. & Mellman, I. Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9559–9564 (1996).
91. Elkin, S. R., Lakoduk, A. M. & Schmid, S. L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wien. Med. Wochenschr.* **166**, 196–204 (2016).

92. Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T. & Kishi, F. Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 22220–22228 (2000).
93. Nunez, M., Gaete, V., Watkins, J. A. & Glass, J. Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J. Biol. Chem.* **265**, 6688–6692 (1990).
94. Scheiber, B. & Goldenberg, H. NAD (P) H: ferric iron reductase in endosomal membranes from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 225–230 (1993).
95. Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A. & Fleming, M. D. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* **108**, 1388–1394 (2006).
96. Ohgami, R. S. *et al.* Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.* **37**, 1264 (2005).
97. Nemeth, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T. & Camaschella, C. Heparin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* **105**, 1803–1806 (2005).
98. Kawabata, H. *et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2 A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* **274**, 20826–20832 (1999).
99. West, A. P. *et al.* Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J. Biol. Chem.* **275**, 38135–38138 (2000).
100. Silvestri, L., Nai, A., Pagani, A. & Camaschella, C. The extrahepatic role of TFR2 in iron homeostasis. *Front. Pharmacol.* **5**, 93 (2014).
101. Pagani, A. *et al.* Comment on: PACE4 (PCSK6): another proprotein convertase linked to iron homeostasis? *Haematologica* **100**, e380 (2015).
102. Deaglio, S. *et al.* Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* **100**, 3782–3789 (2002).
103. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).

104. Andrews, N. C. & Schmidt, P. J. Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* **69**, 69–85 (2007).
105. Liu, J. *et al.* Metalloproteins containing cytochrome, iron–sulfur, or copper redox centers. *Chem. Rev.* **114**, 4366–4469 (2014).
106. Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* **248**, 31–40 (1997).
107. Breuer, W., Greenberg, E. & Cabantchik, Z. I. Newly delivered transferrin iron and oxidative cell injury. *FEBS Lett.* **403**, 213–219 (1997).
108. Spangler, B. *et al.* A reactivity-based probe of the intracellular labile ferrous iron pool. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 680 (2016).
109. Rothman, R. J., Serroni, A. & Farber, J. L. Cellular pool of transient ferric iron, chelatable by deferoxamine and distinct from ferritin, that is involved in oxidative cell injury. *Mol. Pharmacol.* **42**, 703–710 (1992).
110. Winterbourn, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* **82**, 969–974 (1995).
111. Inoue, S. & Kawanishi, S. Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res.* **47**, 6522–6527 (1987).
112. Thomas, C., Mackey, M. M., Diaz, A. A. & Cox, D. P. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep.* **14**, 102–108 (2009).
113. Lane, D. J., Robinson, S. R., Czerwinska, H., Bishop, G. M. & Lawen, A. Two routes of iron accumulation in astrocytes: ascorbate-dependent ferrous iron uptake via the divalent metal transporter (DMT1) plus an independent route for ferric iron. *Biochem. J.* **432**, 123–132 (2010).
114. Rauen, U. *et al.* Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities. *ChemBioChem* **8**, 341–352 (2007).
115. Glickstein, H. *et al.* Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* **108**, 3195–3203 (2006).



116. Shi, H., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L. & Philpott, C. C. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* **320**, 1207–1210 (2008).
117. Leidgens, S. *et al.* Each member of the poly-r (C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *J. Biol. Chem.* **288**, 17791–17802 (2013).
118. Nandal, A. *et al.* Activation of the HIF prolyl hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2. *Cell Metab.* **14**, 647–657 (2011).
119. Frey, A. G. *et al.* Iron chaperones PCBP1 and PCBP2 mediate the metallation of the dinuclear iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 8031–8036 (2014).
120. Harrison, P. M. & Arosio, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **1275**, 161–203 (1996).
121. Arosio, P., Elia, L. & Poli, M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* **69**, 414–422 (2017).
122. Arosio, P., Adelman, T. G. & Drysdale, J. W. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.* **253**, 4451–4458 (1978).
123. Turano, P., Lalli, D., Felli, I. C., Theil, E. C. & Bertini, I. NMR reveals pathway for ferric mineral precursors to the central cavity of ferritin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 545–550 (2010).
124. Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1790**, 589–599 (2009).
125. Mehlenbacher, M. *et al.* Iron oxidation and core formation in recombinant heteropolymeric human ferritins. *Biochemistry* **56**, 3900–3912 (2017).
126. Worwood, M. *et al.* Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13. 3→19qter. *Hum. Genet.* **69**, 371–374 (1985).
127. Lawson, D. M. *et al.* Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* **349**, 541 (1991).
128. Wang, W., Knovich, M. A., Coffman, L. G., Torti, F. M. & Torti, S. V. Serum ferritin: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1800**, 760–769 (2010).

129. Levi, S. *et al.* Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J. Biol. Chem.* **263**, 18086–18092 (1988).
130. Ebrahimi, K. H., Bill, E., Hagedoorn, P.-L. & Hagen, W. R. Spectroscopic evidence for the role of a site of the di-iron catalytic center of ferritins in tuning the kinetics of Fe (ii) oxidation. *Mol. Biosyst.* **12**, 3576–3588 (2016).
131. Pozzi, C. *et al.* Iron binding to human heavy-chain ferritin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 1909–1920 (2015).
132. Wang, Z. *et al.* Structure of human ferritin L chain. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 800–806 (2006).
133. Wade, V. J. *et al.* Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in ferritin. *J. Mol. Biol.* **221**, 1443–1452 (1991).
134. Koralewski, M. *et al.* Morphology and Magnetic Structure of the Ferritin Core during Iron Loading and Release by Magneto-optical and NMR Methods. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 7777–7787 (2018).
135. Levi, S. *et al.* A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 24437–24440 (2001).
136. Santambrogio, P. *et al.* Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 1129–1137 (2007).
137. Cazzola, M. *et al.* Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* **101**, 1996–2000 (2003).
138. Lange, H., Kispal, G. & Lill, R. Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274**, 18989–18996 (1999).
139. Shvartsman, M., Kikkeri, R., Shanzer, A. & Cabantchik, Z. I. Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **293**, C1383–C1394 (2007).

140. Sheftel, A. D., Zhang, A.-S., Brown, C., Shirihai, O. S. & Ponka, P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood* **110**, 125–132 (2007).
141. Lawen, A. & Lane, D. J. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 2473–2507 (2013).
142. Wolff, N. A. *et al.* Evidence for mitochondrial localization of divalent metal transporter 1 (DMT1). *FASEB J.* **28**, 2134–2145 (2014).
143. Froschauer, E. M., Schweyen, R. J. & Wiesenberger, G. The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* **1788**, 1044–1050 (2009).
144. Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M. & Kaplan, J. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1007–1016 (2009).
145. Chen, W. *et al.* Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 16263–16268 (2009).
146. Rouault, T. A. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–164 (2012).
147. Wiedemann, N. *et al.* Essential role of Isd11 in mitochondrial iron–sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J.* **25**, 184–195 (2006).
148. Pandey, A., Golla, R., Yoon, H., Dancis, A. & Pain, D. Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe–S cluster synthesis. *Biochem. J.* **448**, 171–187 (2012).
149. Cai, K. *et al.* Human mitochondrial chaperone (mtHSP70) and cysteine desulfurase (NFS1) bind preferentially to the disordered conformation, whereas co-chaperone (HSC20) binds to the structured conformation of the iron-sulfur cluster scaffold protein (ISCU). *J. Biol. Chem.* **288**, 28755–28770 (2013).

150. Yoon, T. & Cowan, J. Iron– sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078–6084 (2003).
151. Tsai, C.-L. & Barondeau, D. P. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe– S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132–9139 (2010).
152. Yan, R., Adinolfi, S. & Pastore, A. Ferredoxin, in conjunction with NADPH and ferredoxin-NADP reductase, transfers electrons to the IscS/IscU complex to promote iron–sulfur cluster assembly. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Proteins Proteomics* **1854**, 1113–1117 (2015).
153. Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D. R. & Rouault, T. A. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1823**, 484–492 (2012).
154. Maio, N. *et al.* Cochaperone binding to LYR motifs confers specificity of iron sulfur cluster delivery. *Cell Metab.* **19**, 445–457 (2014).
155. Sheftel, A. D. *et al.* The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1157–1166 (2012).
156. Ajioka, R. S., Phillips, J. D. & Kushner, J. P. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1763**, 723–736 (2006).
157. Bishop, D. F., Henderson, A. S. & Astrin, K. H. Human  $\delta$ -aminolevulinate synthase: Assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics* **7**, 207–214 (1990).
158. Fujiwara, T. & Harigae, H. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders. *BioMed Res. Int.* **2015**, (2015).
159. Chiabrande, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. & Tolosano, E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front. Pharmacol.* **5**, 61 (2014).
160. Krishnamurthy, P. C. *et al.* Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* **443**, 586 (2006).

161. Shaw, G. C. *et al.* Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* **440**, 96 (2006).
162. Chen, W., Dailey, H. A. & Paw, B. H. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood* **116**, 628–630 (2010).
163. Wu, C.-K. *et al.* The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 156 (2001).
164. Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198 (2001).
165. Hvidberg, V. *et al.* Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* **106**, 2572–2579 (2005).
166. Bratosin, D. *et al.* Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* **8**, 1143 (2001).
167. Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T. K. & van Bruggen, R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* **119**, 5512–5521 (2012).
168. Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N. & Takakuwa, Y. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry* **52**, 5760–5769 (2013).
169. Romero, P. J. & Hernández-Chinea, C. The Action of Red Cell Calcium Ions on Human Erythrophagocytosis in Vitro. *Front. Physiol.* **8**, 1008 (2017).
170. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. & Henson, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* **5**, 551 (1998).
171. Ensink, M. A., Brajovich, M. E. L., Borrás, S. E. G., Cotorruelo, C. M. & Biondi, C. S. Erythrocyte Senescent Markers by Flow Cytometry. *Open J. Blood Dis.* **9**, 47 (2019).
172. Nakano, T. *et al.* Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J. Biol. Chem.* **272**, 29411–29414 (1997).

173. de Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K. & Van Bruggen, R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* **5**, 9 (2014).
174. Gagnon, E. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119–131 (2002).
175. Touret, N. *et al.* Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* **123**, 157–170 (2005).
176. Braggins, P., Trakshel, G., Kutty, R. & Maines, M. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 528–533 (1986).
177. Soe-Lin, S. *et al.* Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 5960–5965 (2009).
178. Soe-Lin, S. *et al.* Both Nramp1 and DMT1 are necessary for efficient macrophage iron recycling. *Exp. Hematol.* **38**, 609–617 (2010).
179. White, C. *et al.* HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab.* **17**, 261–270 (2013).
180. Delaby, C. *et al.* Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PloS One* **7**, e42199 (2012).
181. Harris, Z., Durley, A., Man, T. & Gitlin, J. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10812 (1999).
182. Sukhbaatar, N. & Weichhart, T. Iron regulation: macrophages in control. *Pharmaceuticals* **11**, 137 (2018).
183. Osaki, S., Johnson, D. A. & Frieden, E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J. Biol. Chem.* **241**, 2746–2751 (1966).
184. De Domenico, I. *et al.* Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* **26**, 2823–2831 (2007).
185. Kono, S. *et al.* Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin-mediated internalization of ferroportin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1802**, 968–975 (2010).

186. Gladwin, M. T., Kanias, T. & Kim-Shapiro, D. B. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. *J. Clin. Invest.* **122**, 1205–1208 (2012).
187. Garby, L. & Noyes, W. D. Studies on hemoglobin metabolism. I. The kinetic properties of the plasma hemoglobin pool in normal man. *J. Clin. Invest.* **38**, 1479–1483 (1959).
188. Beaumont, C. & Delaby, C. Recycling iron in normal and pathological states. *Semin. Hematol.* **46**, 328–338 (2009).
189. D'Armiento, J., Dalal, S. S. & Chada, K. Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice. *Gene* **195**, 19–27 (1997).
190. Schaer, D. J. *et al.* CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* **107**, 373–380 (2006).
191. Heide, K., Haupt, H., Stoeriko, K. & Schultze, H. On the heme-binding capacity of hemopexin. *Clin. Chim. Acta* **10**, 460–469 (1964).
192. Tolosano, E. & Altruda, F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* **21**, 297–306 (2002).
193. Kokoris, S. I. *et al.* Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an update on clinical features, pathophysiology and treatment. *Hematology* **23**, 558–566 (2018).
194. Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. & Ganz, T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **276**, 7806–7810 (2001).
195. 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).
196. Krause, A. *et al.* LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **480**, 147–150 (2000).
197. Jordan, J. B. *et al.* Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J. Biol. Chem.* **284**, 24155–24167 (2009).
198. Nemeth, E. *et al.* The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* **107**, 328–333 (2006).

199. Theurl, I. *et al.* Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* **111**, 2392–2399 (2008).
200. Preza, G. C. *et al.* Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J. Clin. Invest.* **121**, 4880–4888 (2011).
201. Drakesmith, H. *et al.* Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* **106**, 1092–1097 (2005).
202. Fernandes, A. *et al.* The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood* **114**, 437–443 (2009).
203. Sham, R. L., Phatak, P. D., Nemeth, E. & Ganz, T. Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood* **114**, 493–494 (2009).
204. Sham, R. L. *et al.* Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features. *Blood Cells. Mol. Dis.* **34**, 157–161 (2005).
205. Ross, S. L. *et al.* Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metab.* **15**, 905–917 (2012).
206. Qiao, B. *et al.* Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab.* **15**, 918–924 (2012).
207. Brasse-Lagnel, C. *et al.* Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* **140**, 1261–1271 (2011).
208. Gao, J. *et al.* Hepatocyte-targeted HFE and TFR2 control hepcidin expression in mice. *Blood* **115**, 3374–3381 (2010).
209. Gao, J. *et al.* Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.* **9**, 217–227 (2009).
210. Ramos, E. *et al.* Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* **53**, 1333–1341 (2011).



211. Goswami, T. & Andrews, N. C. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J. Biol. Chem.* **281**, 28494–28498 (2006).
212. Schmidt, P. J., Toran, P. T., Giannetti, A. M., Bjorkman, P. J. & Andrews, N. C. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **7**, 205–214 (2008).
213. Johnson, M. B. & Enns, C. A. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* **104**, 4287–4293 (2004).
214. Poli, M. *et al.* Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* **95**, 1832–1840 (2010).
215. Wallace, D. F. *et al.* Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology* **50**, 1992–2000 (2009).
216. Ramey, G., Deschemin, J.-C. & Vaulont, S. Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica* **94**, 765–772 (2009).
217. Corradini, E. *et al.* Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology* **54**, 273–284 (2011).
218. Meynard, D. *et al.* Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.* **41**, 478 (2009).
219. Feng, Q., Migas, M. C., Waheed, A., Britton, R. S. & Fleming, R. E. Ferritin upregulates hepatic expression of bone morphogenetic protein 6 and hepcidin in mice. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G1397–G1404 (2012).
220. Babitt, J. L. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* **38**, 531 (2006).
221. Corradini, E. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology* **137**, 1489–1497 (2009).

222. Wu, X. *et al.* HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood* **124**, 1335–1343 (2014).
223. Rausa, M. *et al.* Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron overload? *PLoS One* **10**, e0122696 (2015).
224. Andriopoulos Jr, B. *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* **41**, 482 (2009).
225. Wang, R.-H. *et al.* A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **2**, 399–409 (2005).
226. Nemeth, E. *et al.* IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* **113**, 1271–1276 (2004).
227. Armitage, A. E. *et al.* Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood* **118**, 4129–4139 (2011).
228. Wrighting, D. M. & Andrews, N. C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **108**, 3204 (2006).
229. Falzacappa, M. V. V., Casanovas, G., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. U. A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells. *J. Mol. Med.* **86**, 531–540 (2008).
230. Besson-Fournier, C. *et al.* Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* **120**, 431–439 (2012).
231. Kautz, L. *et al.* Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat. Genet.* **46**, 678 (2014).
232. Pak, M., Lopez, M. A., Gabayan, V., Ganz, T. & Rivera, S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* **108**, 3730–3735 (2006).

233. Tanno, T. *et al.* High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.* **13**, 1096 (2007).
234. Tanno, T. *et al.* Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* **114**, 181–186 (2009).
235. Peyssonnaud, C. *et al.* Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin. Invest.* **117**, 1926–1932 (2007).
236. Ivan, M. *et al.* HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* **292**, 464–468 (2001).
237. Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* **292**, 468–472 (2001).
238. Mastrogiannaki, M. *et al.* Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* **97**, 827–834 (2012).
239. Zhang, A.-S. *et al.* Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood* **117**, 1687–1699 (2011).
240. Silvestri, L. *et al.* The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.* **8**, 502–511 (2008).
241. Latour, C. *et al.* Testosterone perturbs systemic iron balance through activation of epidermal growth factor receptor signaling in the liver and repression of hepcidin. *Hepatology* **59**, 683–694 (2014).
242. Lane, D. *et al.* Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1853**, 1130–1144 (2015).
243. Peyssonnaud, C., Nizet, V. & Johnson, R. S. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle* **7**, 28–32 (2008).

244. Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 5510–5514 (1995).
245. Bianchi, L., Tacchini, L. & Cairo, G. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4223–4227 (1999).
246. Yang, L., Wang, D., Wang, X., Lu, Y. & Zhu, L. The roles of hypoxia-inducible Factor-1 and iron regulatory protein 1 in iron uptake induced by acute hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **507**, 128–135 (2018).
247. Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B. & Fox, P. L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J. Biol. Chem.* **275**, 21048–21054 (2000).
248. McNEILL, L. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the  $\beta$ -carbon of asparagine-803. *Biochem. J.* **367**, 571–575 (2002).
249. Mahon, P. C., Hirota, K. & Semenza, G. L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* **15**, 2675–2686 (2001).
250. Philpott, C. C., Klausner, R. D. & 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.* **91**, 7321–7325 (1994).
251. Volbeda, A. *et al.* Cytosolic aconitase. *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.* (2011).
252. Haile, D. J. *et al.* 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.* **89**, 11735–11739 (1992).
253. Haile, D. J. *et al.* Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 7536–7540 (1992).

254. Henderson, B. & Kühn, L. Differential modulation of the RNA-binding proteins IRP-1 and IRP-2 in response to iron. IRP-2 inactivation requires translation of another protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 20509–20515 (1995).
255. Wang, J. & Pantopoulos, K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* **434**, 365–381 (2011).
256. Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y. & Leibold, E. A. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **270**, 21645–21651 (1995).
257. Iwai, K., Klausner, R. D. & Rouault, T. A. Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J.* **14**, 5350–5357 (1995).
258. Kang, D.-K. *et al.* Iron regulatory protein 2 as iron sensor Iron-dependent oxidative modification of cysteine. *J. Biol. Chem.* **278**, 14857–14864 (2003).
259. Iwai, K. *et al.* Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4924–4928 (1998).
260. Yamanaka, K. *et al.* Identification of the ubiquitin–protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat. Cell Biol.* **5**, 336 (2003).
261. Wang, J. *et al.* Iron-mediated degradation of IRP2, an unexpected pathway involving a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 954–965 (2004).
262. Zumbrennen, K. B., Wallander, M. L., Romney, S. J. & Leibold, E. A. Cysteine oxidation regulates the RNA-binding activity of iron regulatory protein 2. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2219–2229 (2009).
263. Wilkinson, N. & Pantopoulos, K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front. Pharmacol.* **5**, 176 (2014).
264. Gunshin, H. *et al.* Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett.* **509**, 309–316 (2001).
265. Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1986–1995 (1999).

266. Brissot, P., Bardou-Jacquet, E., Jouanolle, A.-M. & Loréal, O. Iron disorders of genetic origin: a changing world. *Trends Mol. Med.* **17**, 707–713 (2011).
267. Papanikolaou, G. *et al.* Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* **105**, 4103–4105 (2005).
268. Burke, W., Imperatore, G., McDonnell, S. M., Baron, R. C. & Khoury, M. J. Contribution of different HFE genotypes to iron overload disease: a pooled analysis. *Genet. Med.* **2**, 271 (2000).
269. Bridle, K. R. *et al.* Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *The Lancet* **361**, 669–673 (2003).
270. Loréal, O. *et al.* Determination of non-transferrin-bound iron in genetic hemochromatosis using a new HPLC-based method. *J. Hepatol.* **32**, 727–733 (2000).
271. Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D. & Cousins, R. J. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13612 (2006).
272. Jenkitkasemwong, S. *et al.* SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metab.* **22**, 1–13 (2015).
273. Guyader, D. *et al.* Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* **115**, 929–936 (1998).
274. Niederau, C. *et al.* Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* **110**, 1107–1119 (1996).
275. Schumacher Jr, H. R. Hemochromatosis and arthritis. *Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.* **7**, 41–50 (1964).
276. Valenti, L. *et al.* Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos. Int.* **20**, 549–555 (2009).
277. Delima, R. D. *et al.* Disruption of hemochromatosis protein and transferrin receptor 2 causes iron-induced liver injury in mice. *Hepatology* **56**, 585–593 (2012).
278. Papanikolaou, G. *et al.* Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* **36**, 77 (2004).

279. Hattori, A. *et al.* Identification of a novel mutation in the HAMP gene that causes non-detectable hepcidin molecules in a Japanese male patient with juvenile hemochromatosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* **48**, 179–182 (2012).
280. Delatycki, M. *et al.* A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis. *Clin. Genet.* **65**, 378–383 (2004).
281. De Gobbi, M. *et al.* Natural history of juvenile haemochromatosis. *Br. J. Haematol.* **117**, 973–979 (2002).
282. Matthes, T. *et al.* Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene. *Blood* **104**, 2181–2183 (2004).
283. Majore, S. *et al.* HAMP gene mutation c. 208T> C (p. C70R) identified in an Italian patient with severe hereditary hemochromatosis. *Hum. Mutat.* **23**, 400–400 (2004).
284. Le Gac, G. *et al.* The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1913–1918 (2004).
285. Pietrangelo, A. *et al.* Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. *Gastroenterology* **128**, 470–479 (2005).
286. Jacolot, S. *et al.* HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood* **103**, 2835–2840 (2004).
287. Merryweather-Clarke, A. T. *et al.* Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2241–2247 (2003).
288. Pietrangelo, A. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* **102**, 1972–1984 (2017).
289. Njajou, O. T. *et al.* A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat. Genet.* **28**, 213 (2001).
290. Montosi, G. *et al.* Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J. Clin. Invest.* **108**, 619–623 (2001).

291. Iolascon, A. *et al.* Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SCL11A2). *Blood* **107**, 349–354 (2006).
292. Beaumont, C. *et al.* Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload. *Blood* **107**, 4168–4170 (2006).
293. Bardou-Jacquet, E. *et al.* A novel N491S mutation in the human SLC11A2 gene impairs protein trafficking and in association with the G212V mutation leads to microcytic anemia and liver iron overload. *Blood Cells. Mol. Dis.* **47**, 243–248 (2011).
294. Canonne-Hergaux, F., Zhang, A.-S., Ponka, P. & Gros, P. Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood* **98**, 3823–3830 (2001).
295. Iolascon, A. *et al.* Natural history of recessive inheritance of DMT1 mutations. *J. Pediatr.* **152**, 136–139 (2008).
296. Goya, N., Miyazaki, S., Kodate, S. & Ushio, B. A family of congenital atransferrinemia. *Blood* **40**, 239–245 (1972).
297. Beutler, E. *et al.* Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood* **96**, 4071–4074 (2000).
298. Knisely, A., Gelbart, T. & Beutler, E. Molecular characterization of a third case of human atransferrinemia. *Blood* **104**, 2607–2607 (2004).
299. Beaumont-Epinette, M.-P. *et al.* Hereditary hypotransferrinemia can lead to elevated transferrin saturation and, when associated to HFE or HAMP mutations, to iron overload. *Blood Cells. Mol. Dis.* **54**, 151–154 (2015).
300. Kono, S. Aceruloplasminemia: an update. *Int. Rev. Neurobiol.* **110**, 125 (2013).
301. Kono, S. & Miyajima, H. Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia. *Biol. Res.* **39**, 15–23 (2006).
302. Kono, S. *et al.* Hepatic iron overload associated with a decreased serum ceruloplasmin level in a novel clinical type of aceruloplasminemia. *Gastroenterology* **131**, 240–245 (2006).



303. Kato, T. *et al.* Islet changes in hereditary ceruloplasmin deficiency. *Hum. Pathol.* **28**, 499–502 (1997).
304. Morita, H. *et al.* Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann. Neurol. Off. J. Am. Neurol. Assoc. Child Neurol. Soc.* **37**, 646–656 (1995).
305. Miyajima, H. Aceruloplasminemia. *Neuropathology* **1**, 83–90 (2015).
306. Patel, B. N. *et al.* Ceruloplasmin Regulates Iron Levels in the CNS and Prevents Free Radical Injury. *J. Neurosci.* **22**, 6578–6586 (2002).
307. Harris, Z. L. *et al.* Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2539–2543 (1995).
308. Loréal, O. *et al.* Aceruloplasminemia: new clinical, pathophysiological and therapeutic insights. *J. Hepatol.* **36**, 851–856 (2002).
309. Takahashi, Y. *et al.* Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 81–84 (1996).
310. Kono, S. *et al.* Cys-881 is essential for the trafficking and secretion of truncated mutant ceruloplasmin in aceruloplasminemia. *J. Hepatol.* **47**, 844–850 (2007).
311. Hellman, N. E. *et al.* Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **277**, 46632–46638 (2002).
312. Takeuchi, Y. *et al.* A case of aceruloplasminaemia: abnormal serum ceruloplasmin protein without ferroxidase activity. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **72**, 543–545 (2002).
313. Finkenstedt, A. *et al.* Hepatic but not brain iron is rapidly chelated by deferasirox in aceruloplasminemia due to a novel gene mutation. *J. Hepatol.* **53**, 1101–1107 (2010).
314. Skidmore, F. *et al.* Aceruloplasminaemia with progressive atrophy without brain iron overload: treatment with oral chelation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 467–470 (2008).
315. Meyer, L. A., Durley, A. P., Prohaska, J. R. & Harris, Z. L. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 36857–36861 (2001).

316. Cherukuri, S., Tripoulas, N. A., Nurko, S. & Fox, P. L. Anemia and impaired stress-induced erythropoiesis in aceruloplasminemic mice. *Blood Cells. Mol. Dis.* **33**, 346–355 (2004).
317. Chen, H. *et al.* Age-related changes in iron homeostasis in mouse ferroxidase mutants. *Biometals* **22**, 827 (2009).
318. Jiang, R. *et al.* Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain. *J. Nutr.* **145**, 1003 (2015).
319. Fuqua, B. K. *et al.* Severe iron metabolism defects in mice with double knockout of the multicopper ferroxidases hephaestin and ceruloplasmin. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 405–427 (2018).
320. Yamamoto, K. *et al.* Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1588**, 195 (2002).
321. Gouya, L. *et al.* Genetic study of variation in normal mouse iron homeostasis reveals ceruloplasmin as an HFE-hemochromatosis modifier gene. *Gastroenterology* **132**, 679–686 (2007).
322. Linder, M. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics* **8**, 887–905 (2016).
323. Daimon, M. *et al.* Fine structure of the human ceruloplasmin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 1028–1035 (1995).
324. Le Lan, C. *et al.* Serum ceruloplasmin and ferroxidase activity are not decreased in hepatic failure related to alcoholic cirrhosis: clinical and pathophysiological implications. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **28**, 775–779 (2004).
325. Ziakas, A. *et al.* Ceruloplasmin is a better predictor of the long-term prognosis compared with fibrinogen, CRP, and IL-6 in patients with severe unstable angina. *Angiology* **60**, 50–59 (2009).
326. Gitlin, J. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *J. Biol. Chem.* **263**, 6281–6287 (1988).
327. Conley, L., Geurs, T. L. & Levin, L. A. Transcriptional regulation of ceruloplasmin by an IL-6 response element pathway. *Mol. Brain Res.* **139**, 235–241 (2005).

328. Sidhu, A., Miller, P. J. & Hollenbach, A. D. FOXO1 stimulates ceruloplasmin promoter activity in human hepatoma cells treated with IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 963–967 (2011).
329. di Patti, M. C. B. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  up-regulates iron efflux in rat C6 glioma cells through modulation of ceruloplasmin and ferroportin-1 synthesis. *Neurosci. Lett.* **363**, 182–186 (2004).
330. Daffada, A. A. & Young, S. P. Coordinated regulation of ceruloplasmin and metallothionein mRNA by interleukin-1 and copper in HepG2 cells. *FEBS Lett.* **457**, 214–218 (1999).
331. Persichini, T. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  induces ceruloplasmin and ferroportin-1 gene expression via MAP kinases and C/EBP $\beta$ , AP-1, and NF- $\kappa$ B activation. *Neurosci. Lett.* **484**, 133–138 (2010).
332. Mazumder, B., Mukhopadhyay, C. K., Prok, A., Cathcart, M. K. & Fox, P. L. Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells. *J. Immunol.* **159**, 1938–1944 (1997).
333. Musci, G., Polticelli, F. & di Patti, M. C. B. Ceruloplasmin-ferroportin system of iron traffic in vertebrates. *World J. Biol. Chem.* **5**, 204 (2014).
334. Middleton, R. B. & Linder, M. C. Synthesis and turnover of ceruloplasmin in rats treated with 17 $\beta$ -estradiol. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 362–368 (1993).
335. Louro, M. O., Cocho, J. A. & Tutor, J. C. Assessment of copper status in pregnancy by means of determining the specific oxidase activity of ceruloplasmin. *Clin. Chim. Acta* **312**, 123–127 (2001).
336. Fattah, M. M., Ibrahim, F. K., Ramadan, M. A. & Sammour, M. B. Ceruloplasmin and copper level in maternal and cord blood and in the placenta in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **55**, 383–385 (1976).
337. Engin-Üstün, Y., Üstün, Y., Kamacı, M. & Şekeroğlu, R. Maternal serum ceruloplasmin in preeclampsia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **89**, 51–52 (2005).
338. Walsh, S. W. Progesterone and estradiol production by normal and preeclamptic placentas. *Obstet. Gynecol.* **71**, 222–226 (1988).

339. Zeisler, H., Sator, M. O. & Joura, E. Serum levels of progesterone in patients with preeclampsia. *Wien. Klin. Wochenschr.* **112**, 362–364 (2000).
340. Ani, M. & Moshtaghie, A. Comparative effects of estradiol, progesterone and testosterone on the level of rat serum ceruloplasmin. *J. Islam. Acad. Sci.* **3**, 143–145 (1990).
341. Song, S., Chen, J., He, M. & Fotherby, K. Effect of some oral contraceptives on serum concentrations of sex hormone binding globulin and ceruloplasmin. *Contraception* **39**, 385–399 (1989).
342. Mukhopadhyay, C. K., Attieh, Z. K. & Fox, P. L. Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science* **279**, 714–717 (1998).
343. Lainé, F. *et al.* Serum ceruloplasmin and ferroxidase activity are decreased in HFE C282Y homozygote male iron-overloaded patients. *J. Hepatol.* **36**, 60–65 (2002).
344. Das, D., Tapryal, N., Goswami, S. K., Fox, P. L. & Mukhopadhyay, C. K. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem. J.* **402**, 135–141 (2007).
345. Martin, F. *et al.* Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* **105**, 4613–4619 (2005).
346. Hart, B. A., Voss, G. W. & Garvey, J. S. Induction of pulmonary metallothionein following oxygen exposure. *Environ. Res.* **50**, 269–278 (1989).
347. Sedlák, E., Žoldák, G. & Wittung-Stafshede, P. Role of copper in thermal stability of human ceruloplasmin. *Biophys. J.* **94**, 1384–1391 (2008).
348. Takahashi, N., Ortel, T. L. & Putnam, F. W. Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 390–394 (1984).
349. Koschinsky, M. L., Funk, W. D., Van Oost, B. A. & MacGillivray, R. Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5086–5090 (1986).
350. Takahashi, N. *et al.* Internal triplication in the structure of human ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 115–119 (1983).

351. Kingston, I. B., Kingston, B. L. & Putnam, F. W. Chemical evidence that proteolytic cleavage causes the heterogeneity present in human ceruloplasmin preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5377–5381 (1977).
352. Dwulet, F. E. & Putnam, F. W. Internal duplication and evolution of human ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 2805–2809 (1981).
353. Ortel, T. L., Takahashi, N. & Putnam, F. W. Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and secondary structure of domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4761–4765 (1984).
354. Lindley, P. F. Ceruloplasmin. *Handb. Met.* (2006).
355. Zaitseva, I. *et al.* The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 15–23 (1996).
356. Tetaert, D., Takahashi, N. & Putnam, F. W. Purification of glycopeptides of human ceruloplasmin and immunoglobulin D by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **123**, 430–437 (1982).
357. Bento, I., Peixoto, C., Zaitsev, V. N. & Lindley, P. F. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 240–248 (2007).
358. Rydén, L. & Norder, H. Covalent chromatography as a means of isolating thiol peptides from large proteins: Application to human ceruloplasmin. *J. Chromatogr. A* **215**, 341–350 (1981).
359. Sato, M. & Gitlin, J. Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **266**, 5128–5134 (1991).
360. Holtzman, N. A. & Gaumnitz, B. M. Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma. *J. Biol. Chem.* **245**, 2354–2358 (1970).
361. Lindley, P. F. *et al.* An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 454–463 (1997).
362. Donley, S. A., Ilagan, B. J., Rim, H. & Linder, M. C. Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **283**, E667–E675 (2002).

363. Banha, J. *et al.* Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 483–492 (2008).
364. Patel, B. N. & David, S. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 20185–20190 (1997).
365. Rouault, T. A., Zhang, D.-L. & Jeong, S. Y. Brain iron homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab. Brain Dis.* **24**, 673 (2009).
366. Mittal, B., Doroudchi, M. M., Jeong, S. Y., Patel, B. N. & David, S. Expression of a membrane-bound form of the ferroxidase ceruloplasmin by leptomeningeal cells. *Glia* **41**, 337–346 (2003).
367. Patel, B. N., Dunn, R. J. & David, S. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **275**, 4305–4310 (2000).
368. Marques, L. *et al.* Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells. Mol. Dis.* **48**, 110–120 (2012).
369. Fortna, R. R., Watson, H. A. & Nyquist, S. E. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions. *Biol. Reprod.* **61**, 1042–1049 (1999).
370. Yang, F. *et al.* Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **265**, 10780–10785 (1990).
371. Eid, C., Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T. & Chahine, J.-M. E. H. Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1840**, 1771–1781 (2014).
372. Osaki, S. Kinetic studies of ferrous ion oxidation with crystalline human ferroxidase (ceruloplasmin). *J. Biol. Chem.* **241**, 5053–5059 (1966).
373. White, K. N. *et al.* The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1820**, 411–416 (2012).

374. Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, C. K., Seshadri, V., Tripoulas, N. A. & Fox, P. L. Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**, 1116–1123 (1999).
375. Wirth, P. L. & Linder, M. C. Distribution of copper among components of human serum. *J. Natl. Cancer Inst.* **75**, 277–284 (1985).
376. Lau, S.-J. & Sarkar, B. Ternary coordination complex between human serum albumin, copper (II), and L-histidine. *J Biol Chem* **246**, 5938–5943 (1971).
377. Campbell, C. H., Brown, R. & Linder, M. C. Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **678**, 27–38 (1981).
378. Hilton, M., Spenser, D., Ross, P., Ramsey, A. & McArdle, H. Characterisation of the copper uptake mechanism and isolation of the ceruloplasmin receptor/copper transporter in human placental vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1245**, 153–160 (1995).
379. Ramos, D. *et al.* Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. *PLoS One* **11**, e0149516 (2016).
380. Cartwright, G. & Wintrobe, M. Copper metabolism in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **14**, 224–232 (1964).
381. D'angelo, G. Copper deficiency mimicking myelodysplastic syndrome. *Blood Res.* **51**, 217–219 (2016).
382. Stoj, C. & Kosman, D. J. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Lett.* **554**, 422–426 (2003).
383. Shiva, S. *et al.* Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 486 (2006).
384. Lazzaro, M. *et al.* Ceruloplasmin potentiates nitric oxide synthase activity and cytokine secretion in activated microglia. *J. Neuroinflammation* **11**, 164 (2014).
385. Zhao, X.-J. *et al.* Mechanisms for cellular NO oxidation and nitrite formation in lung epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **61**, 428–437 (2013).

386. Richards, D. A. Use of high-performance liquid chromatography to study the caeruloplasmin-catalysed oxidation of biogenic amines: I. Single substrate systems. *J. Chromatogr. A* **256**, 71–79 (1983).
387. Ehrenwald, E., Chisolm, G. M. & Fox, P. L. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* **93**, 1493 (1994).
388. Goldstein, I. M., Kaplan, H. B., Edelson, H. S. & Weissmann, G. Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J. Biol. Chem.* **254**, 4040–4045 (1979).
389. Yoshida, K. *et al.* Increased lipid peroxidation in the brains of aceruloplasminemia patients. *J. Neurol. Sci.* **175**, 91–95 (2000).
390. Miyajima, H., Kono, S., Takahashi, Y. & Sugimoto, M. Increased lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in aceruloplasminemia brains. *Blood Cells. Mol. Dis.* **29**, 433–438 (2002).
391. Guo, P. *et al.* Hepcidin, an antimicrobial peptide is downregulated in ceruloplasmin-deficient mice. *Peptides* **30**, 262–266 (2009).
392. Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J. & Mogil, J. S. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat. Methods* **15**, 994 (2018).
393. Dupic, F. *et al.* Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut* **51**, 648–653 (2002).
394. Dupic, F. *et al.* Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology* **122**, 745–751 (2002).
395. Ilyin, G. *et al.* Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett.* **542**, 22–26 (2003).
396. Courselaud, B. *et al.* Strain and gender modulate hepatic hepcidin 1 and 2 mRNA expression in mice. *Blood Cells. Mol. Dis.* **32**, 283–289 (2004).
397. Pietrangelo, A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* **139**, 393–408 (2010).
398. Loréal, O. *et al.* Iron, hepcidin, and the metal connection. *Front. Pharmacol.* **5**, 128 (2014).



399. Nations, S. *et al.* Denture cream: an unusual source of excess zinc, leading to hypocupremia and neurologic disease. *Neurology* **71**, 639–643 (2008).
400. Wang, Y., Hodgkinson, V., Zhu, S., Weisman, G. A. & Petris, M. J. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Adv. Nutr.* **2**, 129–137 (2011).
401. Merle, U. *et al.* Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease. *BMC Gastroenterol.* **10**, 8 (2010).
402. El Balkhi, S. *et al.* Relative exchangeable copper: a new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson’s disease diagnosis. *Clin. Chim. Acta* **412**, 2254–2260 (2011).
403. Guillaud, O. *et al.* Relative exchangeable copper: a valuable tool for the diagnosis of Wilson disease. *Liver Int.* **38**, 350–357 (2018).
404. van den Berghe, P. V. & Klomp, L. W. Posttranslational regulation of copper transporters. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 37 (2010).
405. Balter, V. *et al.* Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation. *Metallomics* **5**, 1470–1482 (2013).

---

**Titre :** Caractérisation du phénotype hépatosplénique d'un nouveau modèle de rats acéruoplasminémiques pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'acéruoplasminémie héréditaire

**Mots clés :** Hépatocyte, Macrophage, Surcharge en fer

**Résumé :** L'acéruoplasminémie héréditaire est une pathologie génétique rare, résultant en une absence de céruoplasmine fonctionnelle dans le plasma. La pathologie entraîne des surcharges en fer, notamment au niveau hépatocytaire. Cependant, les macrophages hépatiques et spléniques des patients ne semblent pas impactés par la surcharge en fer, alors même que la céruoplasmine est décrite comme nécessaire à la sortie du fer macrophagique. Notre hypothèse était que la céruoplasmine n'est pas indispensable à la sortie du fer macrophagique, et que des mécanismes sans lien direct avec le rôle rapporté de la céruoplasmine sont à l'origine du phénotype hépatosplénique rencontré dans la pathologie. Nous avons réalisé une synthèse des cas cliniques d'acéruoplasminémie rapportés dans la littérature, confirmant la présence d'un phénotype hépatosplénique suggérant que le rôle de la céruoplasmine est incomplètement compris. Nous avons par la suite développé et caractérisé un modèle original de rats acéruoplasminémiques, reproduisant le phénotype hépatosplénique humain. Les données récoltées dans ce modèle suggèrent que la céruoplasmine n'est pas nécessaire à la sortie du fer macrophagique. D'autres résultats ont par ailleurs mis en évidence des anomalies du métabolisme des métaux non-ferreux, en lien avec la pathologie.

---

**Title :** Characterization of the hepatosplenic phenotype from a new aceruloplasminemic rat model for a better understanding of hereditary aceruloplasminemia pathophysiological mechanisms

**Keywords :** Hepatocyte, Macrophage, Iron overload

**Abstract :** Hereditary aceruloplasminemia is a rare genetic disease, resulting in a lack of functional ceruloplasmin in plasma. This pathology leads to iron overload, especially in hepatocytes. However, liver and spleen macrophages are not iron overloaded, despite the reported important role of ceruloplasmin in iron egress from macrophages. Our hypothesis was that ceruloplasmin is not essential for iron egress from macrophages, and that some mechanisms, not in direct link with the ceruloplasmin reported role, are the cause of the hepatosplenic phenotype observed in the disease. We performed a synthesis of aceruloplasminemia clinical cases reported in the literature, confirming by this way the presence of an hépatosplenic phenotype that suggest an imperfect undersanding of ceruloplasmin role. We then performed and characterized a new rat model of aceruloplasminemia, reproducing the human hepatosplenic phenotype. The data obtained in this model suggested that ceruloplasmin is not essential for macrophage iron egress. Otherwise, some other results highlighted abnormalities regarding to non-iron metals metabolism, in link with aceruloplasminemia.