



HAL
open science

Identification et caractérisation de formes rares de surcharge en fer : analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine et étude de la régulation à distance du gène SLC40A1

Kevin Uguen

► To cite this version:

Kevin Uguen. Identification et caractérisation de formes rares de surcharge en fer : analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine et étude de la régulation à distance du gène SLC40A1. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0106 . tel-04073451

HAL Id: tel-04073451

<https://theses.hal.science/tel-04073451v1>

Submitted on 18 Apr 2023

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Génétique, Génomique, Bioinformatique

Par

Kevin UGUEN

Identification et caractérisation de formes rares de surcharge en fer : analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine et étude de la régulation à distance du gène *SLC40A1*.

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 15 décembre 2022

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

Rapporteurs avant soutenance :

Delphine MEYNARD CR1, IRSD, Université Paul Sabatier – Toulouse 3

Amélie PITON MCU-PH, IGBMC, Université de Strasbourg

Composition du Jury :

Delphine MEYNARD CR1, IRSD, Université Paul Sabatier – Toulouse 3

Amélie PITON MCU-PH, IGBMC, Université de Strasbourg

Laurent GOUYA PU-PH, CRI, Université Paris Diderot – Paris 7

Isabelle CALLEBAUT DR, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6

Eric SOLER DR2, IGMM, Université de Montpellier

Président du jury
Claude FEREC PU, Université de Bretagne Occidentale

Directeur de thèse
Gérald LE GAC PU-PH, Université de Bretagne Occidentale

Table des matières

Remerciements	5
Liste des figures et tableaux	8
Liste des abréviations	11
Liste des publications et communications	14
Liste des publications acceptées	14
Liste des communications orales	14
Liste des communications affichées	15
Avant-propos	16
CHAPITRE 1 : Variations faux-sens du gène SLC40A1 : interprétation structurale et fonctionnelle, corrélations génotypes-phénotypes, base de données locus spécifique	22
Introduction	22
1. Le métabolisme du fer	22
1.1. Généralités	22
1.2. Absorption intestinale de fer	25
1.3. Utilisation du fer par les cellules érythroïdes	26
1.4. Recyclage du fer par les macrophages	28
1.5. Stockage du fer par l'hépatocyte: le rôle de la ferritine	30
2. La régulation systémique de l'homéostasie du fer par l'axe hepcidine-ferroportine	33
2.1. La ferroportine	34
2.2. Structure de FPN1	35
2.2.1. Appartenance de la ferroportine à la famille des facilitateurs majeurs	35
2.2.2. La structure tridimensionnelle de FPN1 pour expliquer le mécanisme de transport du fer.	40
2.3. Régulation de l'expression de FPN1	49
2.3.1. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle par le fer	49
2.3.2. Régulation liée à l'inflammation	50
2.3.3. Particularité de la régulation dans les entérocytes et les érythrocytes	51
2.3.4. Régulation de l'expression de FPN1 par des micro-ARNs	52
2.4. Le deuxième acteur de la régulation systémique du fer : l'hepcidine	54
2.4.1. Le gène <i>HAMP</i> et la structure de l'hepcidine	54

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

2.4.2. L'hepcidine, régulateur de la ferroportine	55
2.4.3. La régulation de la synthèse hépatique d'hepcidine	60
3. Les hyperferritinémies et les surcharges en fer	64
3.1. La ferritine sanguine et ses variations	64
3.2. Hyperferritinémies sans surcharge en fer	66
3.2.1. Hyperferritinémies secondaires	66
3.2.2. Hyperferritinémies primaires sans surcharge en fer	67
3.3. Les formes secondaires d'hyperferritinémie avec surcharge en fer	68
3.4. Les formes primaires de surcharge en fer	70
3.4.1. L'hémochromatose de type 1 (HC1)	71
3.4.2. Les hémochromatoses de type 2A, 2B et 3	75
3.4.3. Les autres formes héréditaires de surcharge en fer	76
3.4.4. La maladie de la ferroportine et l'hémochromatose de type 4	78
3.4.5. La problématique des mutations du gène <i>SLC40A1</i> : l'apport des analyses structurales et fonctionnelles à l'interprétation des variations faux-sens	82
Problématique et objectifs de ma thèse	85
Article 1 : The spectra of disease-causing mutations in the ferroportin 1 (SLC40A1) encoding gene and related iron overload phenotypes (hemochromatosis type 4, ferroportin disease)	90
Article 2 : The dual loss and gain of function of the SLC40A1 iron exporter results in the classic Ferroportin Disease phenotype	148
Article 3 : Ferroportin-1 structure and function: description of a new ambivalent variation highlighting the role of the Ala350 residue in conformational switching.	176
Discussion	205
La problématique de l'interprétation des variations faux-sens dans le domaine des maladies rares: des outils disponibles à l'expertise structurale et fonctionnelle	205
CHAPITRE 2 : Etude de la régulation à distance du gène <i>SLC40A1</i>	219
1. La régulation à distance des gènes	219
1.1 Structure tridimensionnelle du génome	219
1.1.1 Le rôle structurel de la condensation de l'ADN : les nucléosomes	219
1.1.2 La condensation de la chromatine	222
1.1.3 Les territoires chromosomiques	223

1.1.4 Les compartiments épigénomiques	224
1.1.5 Les domaines topologiquement associés (ou TAD, “Topologically Associated Domains”)	224
1.1.6 Méthodes d’étude des TADs : capture de la chromatine	228
1.2. Régulation de la transcription des gènes	232
1.2.1. La régulation proximale : le promoteur	232
1.2.2. La régulation à distance : les enhancers et silencers	234
1.2.3. Importance de la régulation à distance en contexte pathologique : les enhancéropathies	236
2. Mise en place d’une stratégie d’étude de la régulation à distance du gène <i>SLC40A1</i>	243
2.1. Méthodes	243
2.1.1. Analyse des bases de données expérimentales et choix du modèle cellulaire	243
2.1.2. Tests luciférase	245
2.1.3. Edition génique : CRISPR/Cas9	246
2.1.4. Séquençage des régions candidates sur la cohorte EMSAI	250
2.2. Résultats	253
2.2.1 Sélection des régions candidates à partir des bases de données expérimentales	253
2.2.2 Analyse de l’effet des régions candidates sur le promoteur de <i>SLC40A1</i> par tests luciférases	255
2.2.3 Délétion des régions de régulation par technologie CRISPR/cas9	260
2.2.4 Séquençage des régions de régulation	263
2.3. Discussion	265
2.3.1. Etablissement d’une stratégie d’étude de la régulation à distance du gène <i>SLC40A1</i>	265
2.3.2. Recherche de variants de régulation	274
2.3.3. Les silencers	275
2.3.4. La problématique du type cellulaire	275
Conclusion générale et perspectives	281
Annexes	282
Références	293

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse.

Merci au Dr. Delphine Ménard et au Dr. Amélie Piton d'avoir accepté de rapporter ce travail. Merci pour le temps consacré à la relecture de ce manuscrit.

Je remercie le Pr. Laurent Gouya et le Dr. Éric Soler d'avoir accepté d'être examinateurs pour cette soutenance, et surtout d'avoir été membres de mon comité de suivi individuel. Merci pour le temps que vous y avez consacré, et pour les conseils avisés tout au long de ces quatre années de thèse.

Un grand merci au Dr. Isabelle Callebaut de faire partie de ce jury en tant qu'examinatrice, et pour votre contribution à ce travail. La structure des protéines était une boîte noire pour moi, vous m'avez fait découvrir l'importance de l'apport de l'étude structurale. Merci pour vos corrections à ce manuscrit.

Merci au Pr. Claude Ferec de me faire l'honneur d'être examinateur dans ce jury. Merci de m'avoir fait confiance il y a près de dix ans maintenant, et de m'avoir soutenu dans mon désir de poursuivre une carrière hospitalo-universitaire dans cette merveilleuse discipline qu'est la génétique.

Un grand merci au Dr. Emmanuelle Génin de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'unité Inserm UMR1078.

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

A nouveau merci au Dr. Éric Soler, et au Dr. Charlotte Andrieux-Soler, pour votre aide sur l'analyse de la capture de la chromatine.

Merci aux médecins qui ont adressé les prélèvements des patients et qui ont fourni les données cliniques, en particulier le Dr. Dimitri Tchernitchko. Merci également aux patients et familles qui nous ont aidé à l'étude phénotypique.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, le Pr. Gérald Le Gac. Depuis les premières discussions sur les cours de master 1 sur le chemin du Croisic il y a plusieurs années déjà, tu m'as fait confiance, d'abord en master 2, pour ma thèse d'exercice, et maintenant pour cette thèse. Tu m'as appris la rigueur, l'esprit de synthèse, la curiosité, et fait de moi le scientifique que je suis aujourd'hui. Merci pour tes encouragements, pour ton soutien quand j'en avais besoin, et pour ton aide dans la réalisation de ce manuscrit. Merci pour tout.

Merci au Dr. Yann Fichou pour ton écoute et tes conseils avisés, notamment lors de la préparation des présentations orales!

Merci au Dr. Chandran Ka pour ton aide depuis le début, tes conseils avisés et ta disponibilité. Tu m'as tout appris, de la culture cellulaire au Western Blot en passant par la radioactivité, et tu as tou-

jours répondu à mes multiples questions dans la bonne humeur. Sans toi le labo tournerait beaucoup moins bien! Merci pour tes relectures et corrections des différents manuscrits et présentations. Je vais tâcher de ranger mon tiroir avant de partir.

Merci à Isabelle, pour ton aide technique et toutes les discussions sur les déboires du Western Blot! Merci Caro pour ton aide sur la capture de la chromatine. Merci aussi pour ces années de travail ensemble au sein de la team CGH au CHU, et pour ton écoute dans les moments difficiles. Merci Sandrine pour ta gentillesse et ta bonne humeur. C'était un plaisir de travailler avec vous trois, les "drôles de dames"! Je compte sur vous pour faire une décoration de Noël qui dépasse toutes les autres!

Merci à Rim, pour ces échanges, nos discussions dans le bureau et ta bonne humeur. Bon courage pour la fin de la thèse, tu vas y arriver! Je te laisse avec plaisir ma place dans le bureau, tu vas voir on y est bien.

Merci à tous ceux qui sont passés dans l'équipe IMRC durant ma thèse. Merci à Julie, pour ton aide durant le master 2 et pour la base UMD. Merci à Loann, pour ton aide et tes conseils avisés. Merci aux étudiants que j'ai pu avoir l'occasion d'encadrer: Aminati, Dana, Emma, Gauthier. Merci à Cynthia pour les quelques mois de partage de bureau, j'espère que ta nouvelle voie te plaît.

Marlène, un grand merci à toi pour toute ton aide technique, pour ce que tu m'as appris lors de mon master 2 et mon début de thèse, et pour tes conseils quand ça n'allait pas. Merci pour tes relectures avisées, j'espère que tu t'épanouis bien dans ton post-doc!

Merci aux membres de l'unité Inserm U1078 pour votre accueil. Merci à l'équipe du Dr. Laurent Corcos, en particulier Danielle, pour m'avoir permis d'utiliser le cytomètre en flux et surtout m'avoir appris à m'en servir! Merci à Stéphanie et l'équipe CRED (Mégane, Anaïs, Clara) pour l'aide sur la capture de la chromatine. Merci à Hugo pour les conseils sur le CRISPR/Cas9. Merci à Nathalie, Pascal, Salomé, Chloé, Marie-Sophie, Thomas, Carine, Virginie. Merci au Dr. Jian-Min Chen pour ces discussions sur les mécanismes mutationnels et pour l'aide sur mon projet de mobilité.

Merci au Dr. Jean-Pierre Pennec de m'avoir épaulé dans la réalisation du patch-clamp. Ce furent beaucoup d'heures passées à essayer d'agripper les cellules!

Merci à Pierre Pochard et Nadège Marec de la plateforme Hyperion pour leur aide dans l'isolement des cellules pour les expériences de CRISPR/Cas9.

Un grand merci à Sophie Podeur, pour ton aide depuis toutes ces années, ta disponibilité, ta bonne humeur! Merci pour toute l'organisation au quotidien, et en particulier pour toute l'organisation de ma soutenance.

Merci à l'école doctorale Biologie-Santé pour les formations proposées durant cette thèse. Je remercie Michèle Kerleroux pour son aide précieuse sur les documents administratifs!

Merci à toute l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité du CHU de

Brest. J'ai démarré ma formation de génétique dans ce labo en tant qu'externe, c'est toujours autant un plaisir d'y travailler dix ans après. Merci à Mathilde, Sacha, Marie-Pierre, Emmanuelle, Virginie, Bernard, et tous les techniciens et secrétaires. Un merci particulier à la team CGH, Sylvia, Marine, Karine et Bruno. Merci à Karen pour toute l'aide que tu apportes sur les exomes depuis plus de deux ans. Merci Marine pour m'avoir formé à la PCR digitale, et merci Aline pour le séquençage Fluidigm.

Un grand merci à Sylvia. C'est un réel plaisir de travailler avec toi depuis plusieurs années maintenant. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta compréhension devant mes difficultés à me dédoubler entre ma thèse et le CHU. Merci pour tes conseils et ton écoute quand j'en avais besoin.

Merci au Pr. Cédric Le Maréchal pour ton soutien et pour la confiance que tu m'accordes au sein du laboratoire de génétique moléculaire.

Merci à Nathalie, Audrey, Frédéric, Marie-Bérangère, Séverine, Marc et aux équipes du laboratoire de génétique chromosomique et de l'unité de génétique clinique. Les interactions que nous avons ensemble sont primordiales dans notre travail. Merci pour vos conseils et votre disponibilité.

Merci aux internes qui sont passés dans le laboratoire, en particulier Antoine, Loïc, Ariane, Clelia, pour votre aide dans le service de génétique et pour ces discussions parfois philosophiques sur l'avenir de la génétique en France.

Merci à mes amis pour leur soutien. Aux amis des bancs de la fac (Pierre, Myriam, Mai, Flav, Pauline, Eric, Tiphaine, Léna, Maël, Fab, Romain, Damien, Greta, Aline) même si on s'est perdus de vue ces derniers temps, par ma faute j'en conviens.

Merci à mes amis du lycée, Ludo, Emma, Clément, Soizig, Mika, Pauline, Adrien, Manon, que j'ai trop peu vus pendant cette période...

Merci à Sophie, Benj, Ana et Seb pour votre soutien et pour ces moments de détente en WE ou en vacances. Merci à Tutu, Nico, Aude et Julien pour tous ces moments et nos WE d'octobre.

Merci aux Marins d'Iroise, véritable bol d'air amical et musical qui m'a aidé à tenir bon pendant ces quatre années, bien que le COVID nous ait séparé plusieurs mois...

Merci à ma famille. Papa et maman, merci pour tout ce que vous avez sacrifié pour vos enfants. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Je vous aime. Merci à mes frères qui m'ont supporté pendant mes coups de stress! A ton tour Gwendal, bonne chance! Merci Papi pour ces moments de détente à Kerlouan. Merci à mes beaux-parents et ma belle-famille, pour ces moments passés hors du temps à Quiberon et pour votre soutien.

Lara, merci pour tout ton amour et ton soutien qui m'ont tant aidé. Merci d'être à mes côtés, et de m'avoir appris à relativiser. Grâce à toi ces dernières années auront vu naître les quatre plus beaux yeux du monde. Il me tarde de partir à l'aventure en famille de l'autre côté de l'Atlantique! Vous êtes ma vie, je vous aime.

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique du métabolisme systémique du fer chez l'homme	24
Figure 2 : Import intestinal de fer par l'entérocyte	26
Figure 3 : Utilisation du fer par l'érythroblaste	28
Figure 4 : Recyclage du fer par le macrophage	30
Figure 5 : Stockage du fer par l'hépatocyte	32
Figure 6 : Régulation de la traduction des sous-unités lourdes et légères de la ferritine par le fer	33
Figure 7 : Représentation schématique de la topologie des protéines de la famille MFS	37
Figure 8 : Représentation des modèles d'accès alternatifs proposés pour les protéines MFS	39
Figure 9 : Représentation tridimensionnelle de FPN1 selon Le Gac et al. 2013	41
Figure 10 : Représentation tridimensionnelle de FPN1 selon Bonaccorsi et al. 2014	43
Figure 11 : Modèle du mécanisme d'export du fer de la ferroportine, sur la base des premiers éléments proposés par Deshpande et al. en 2018	44
Figure 12 : Représentation tridimensionnelle de FPN1 d'après Billesbølle et al., 2020 (PDB 6WBV) et des deux sites de liaison au fer	46
Figure 13 : Proposition de modèle de transport de fer de BbFPN par Taniguchi, 2015	48
Figure 14 : Modélisation de la "gate" intracellulaire de la ferroportine humaine, à partir du modèle proposé par le Docteur Isabelle Callebaut, avant (A) et après (B) (100 ns) de dynamique moléculaire	49
Figure 15 : Régulation transcriptionnelle et traductionnelle de la ferroportine dans les macrophages	51
Figure 16 : Alignement et structure tridimensionnelle de l'hepcidine	55
Figure 17 : Représentation tridimensionnelle de FPN1 en présence d'hepcidine et résidus impliqués dans la liaison hepcidine-FPN1 selon Aschemeyer et al., sur le modèle structural proposé par Billesbølle et al. 2020 (PDB 6WBV)	57
Figure 18 : Mécanismes d'action de l'hepcidine sur la fonction et la dégradation de la ferroportine	59
Figure 19 : Régulation de la synthèse d'hepcidine au sein de l'hépatocyte	63

Figure 20 : Représentation des différentes voies touchées dans les formes d'HC liées à un défaut de production d'hepcidine par l'hépatocyte	71
Figure 21 : Représentation des différents stades de l'HC1, selon Brissot et al. 2018	73
Figure 22 : Hétérogénéité phénotypique et génétique de l'hémochromatose	76
Figure 23 : Arbre décisionnel devant une suspicion d'hémochromatose	78
Figure 24 : Dichotomie génétique et clinique des mutations du gène <i>SLC40A1</i> . CST= coefficient de saturation de la transferrine	80
Figure 25 : Superposition des structures expérimentale et prédite de FPN1	208
Figure 26 : Focus sur la structure 3D prédite par AlphaFold2	209
Figure 27 : Représentation de l'entonnoir de repliement des protéines	210
Figure 28 : Organisation structurale de l'ADN et des histones au sein du chromosome	218
Figure 29 : Modèle d'organisation de la chromatine d'après les données de ChromEMT	218
Figure 30 : Organisation de la chromatine en territoires chromosomiques visualisés grâce à la technique FISH-3D	220
Figure 31 : L'organisation de la chromatine en TADs	222
Figure 32 : Formation de l'anneau de cohésine et liaison à la protéine CTCF	224
Figure 33 : Modèle d'extrusion en boucle	225
Figure 34 : Schéma général de la technique 3C	226
Figure 35 : Résumé des différentes techniques de 3C et dérivées	228
Figure 36 : Mise en place du complexe d'initiation de la transcription sur un promoteur de type concentré	230
Figure 37 : Principe d'interaction entre les enhancers et le promoteur	232
Figure 38 : Mode d'action de la protéine insulatrice CTCF	233
Figure 39 : Différents mécanismes de perturbation d'un TAD	236
Figure 40 : Principe du système CRISPR-Cas9 et utilisation pour l'étude de la régulation d'un gène	239
Figure 41 : Protocole de délétion des éléments de régulation par stratégie CRISPR	245
Figure 42 : Séquençage des régions de régulation sur la cohorte EMSA	249

Figure 43 : Représentation du TAD comprenant le gène <i>SLC40A1</i> et des données utilisées pour la détermination des séquence candidates	251
Figure 44 : Résultats des tests luciférase comparant les différentes régions candidates	253
Figure 45 : Résultats des tests luciférase comparant les enhancers potentiels, avec une orientation inversée dans la construction plasmidique	254
Figure 46 : La combinaison des enhancers potentiels entraîne un effet coopératif	255
Figure 47 : Les régions de régulation montrant un effet enhancer ou silencer dans les cellules HepG2 n'ont pas d'effet drastique dans les cellules Huh7	256
Figure 48 : Etude par PCR digitale du nombre de copies de la région de régulation cible dans les cellules HepG2	258
Figure 49: Quantification de l'ARN du gène <i>SLC40A1</i> par ddPCR dans les cellules HepG2	259
Figure 50 : Quantification du nombre de copies de notre région de régulation par ddPCR dans les cellules HepG2	260
Figure 51 : Visualisation des deux variants d'intérêt localisés dans la région 8	262
Figure 52 : Visualisation des profils d'acétylation des histones dans les cellules HepG2 au niveau des différentes régions de régulation	264
Figure 53 : Visualisation des profils de fixation de différents facteurs de transcription au niveau des régions 3 et 8 dans les cellules HepG2	266
Figure 54 : Profils de 4C-seq sur cellules HepG2 avec comme "viewpoint" le promoteur du gène <i>SLC40A1</i>	268
Figure 55 : Profils de 4C-seq sur cellules HepG2 avec comme "viewpoint" la région candidate 3	269
Figure 56 : Observation par microscopie (x400) de la capacité de monocytes primaires humains différenciés et polarisés en macrophages de type M2 à endocyter des érythrocytes sénescents	274
Tableau 1 : Mécanismes de régulation de la ferroportine (FPN), indépendants de l'hepcidine	53
Tableau 2 : Principales causes d'hyperferritinémie	65
Tableau 3 : Valeurs de $\Delta\Delta G$ de différents algorithmes pour les variations p.Ala77Asp et p.Ser47Phe	211
Tableau 4 : Coordonnées des différentes régions de régulation candidates du gène <i>SLC40A1</i>	252

Liste des abréviations

3C	Chromosome Conformation Capture
3D	Tridimensionnel
4C	Circular Chromosome Conformation Capture
5C	Chromosome Conformation Capture Carbon Copy
ABCB10	ATP-Binding Cassette subfamily B member 10
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARE	Antioxidant Response Elements
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
BbFPN	Bdellovibrio bacteriovorus ferroportin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMP-RE	Bone Morphogenetic Protein-Responsive Elements
cCRE	candidate <i>Cis</i> Regulatory Element
CD	Cluster of Differentiation
ChIA-PET	Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CST	Coefficient de saturation de la transferrine
CRAC	Cholesterol Recognition Amino acid Consensus sequence
CTCF	CCCTC-binding factor
DCYTB	Duodenal CYTochrome B
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
EPO	Erythropoïétine
ERFE	Erythroferrone
Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	Fer ferrique
FECH	Ferrochelatase

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
FLVCR	Feline Leukemia Virus subgroup C cellular Receptor
FPN/FPN1	Ferroportine 1
FT	Facteur de Transcription
GFP	Green Fluorescent Protein
GTEx	Genotype-Tissue Expression
HC	Hémochromatose
HCP-1	Heme Carrier Protein 1
HDR	Homology-Directed-Repair
HEPH	Héphaestine
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
Hi-C	High Throughput 3C
HJV	Hémojuvéline
HO-1	Hème oxygénase-1
HRE	HIF Response Elements
HRG1	Heme-Responsive Gene-1
IL	Interleukine
IRE	Iron Responsive Element
IREG1	Iron-REGulated Gene 1
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRP	Iron Regulatory Protein
I-TASSER	Iterative Threading ASSEMBly Refinement
KO	KnockOut
MARE	Maf Recognition Element
MFS	Major Facilitator Superfamily
miR	microRNA
MTP1	Metal Transporter Protein 1

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

NCOA4	Nuclear receptor CO-Activator 4
NHEJ	Non-Homologous-End-Joining
NTBI	Non-Transferrin-Bound Iron
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBPs	Poly(rC)-Binding Proteins
PDB	Protein Data Base
PHD	Prolyl-Hydroxylases
Phyre	Protein Homology/analogy Recognition Engine
ROS	Reactive Oxygen Species
SLC40A1	Solute Carrier Family 40 member 1
SMAD	(Small) Mothers Against Decapentaplegic
SMC	Structural Maintenance of Chromosome
smFRET	single-molecule Förster Resonance Energy Transfer
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STEAP3	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAD	Topologically Associated Domain
Tf	Transferrine
TfR1	Transferrin Receptor 1
TfR2	Transferrin Receptor 2
TLR	Toll Like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
TM	Hélice transmembranaire
TSS	Transcription Start Site
UTR	UnTranslated Region
WT	Wild-Type
ZIP14	ZRT/IRT-like Protein 14

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

Liste des publications et communications

Liste des publications acceptées

Guellec J, Elbahnsi A, Tertre ML, **Uguen K**, Gourlaouen I, Férec C, Ka C, Callebaut I, Gac GL. *Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A*. FASEB J. 2019 Dec;33(12):14625-14635. doi: 10.1096/fj.201901857R. Epub 2019 Nov 5. PMID: 31690120.

Le Tertre M, Ka C, Raud L, Berlivet I, Gourlaouen I, Richard G, **Uguen K**, Chen JM, Férec C, Fichou Y, Le Gac G. *Splicing analysis of SLC40A1 missense variations and contribution to hemochromatosis type 4 phenotypes*. Blood Cells Mol Dis. 2021 Mar;87:102527. doi: 10.1016/j.bcmd.2020.102527. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33341511.

Liste des communications orales

Hémochromatose de type 4 : base de données de mutations, interprétation des variants rares et corrélations génotype-phénotype.

Kévin UGUEN, Julie GUELLEC, Chandran KA, Isabelle GOURLAOUEN, David SALGADO, Christophe BEROUD, Claude FEREC, Gérald LE GAC. Séminaire des généticiens de l'Ouest, Le Croisic, 29 juin 2018

Apport des analyses structure/fonction dans l'identification des bases moléculaires de l'hémochromatose de type 4 et la compréhension du mécanisme d'export du fer chez l'homme.

Kévin Uguen, Ahmad Elbahnsi, Marlène Le Tertre, Isabelle Gourlaouen, Claude Férec, Cécile Ged, Chandran Ka, Isabelle Callebaut, Gérald Le Gac.

Journée scientifique de la filière G2M, 25 septembre 2020 (visio).

Apport des analyses structure/fonction au diagnostic des maladies rares et à la description de nouveaux mécanismes physiopathologiques: exemple de l'hémochromatose de type 4.

Kévin Uguen, Ahmad Elbahnsi, Marlène Le Tertre, Isabelle Gourlaouen, Claude Férec, Cécile Ged, Chandran Ka, Isabelle Callebaut, Gérald Le Gac.

Colloque IBSAM, Brest, 08 juin 2021. *Prix de la meilleure communication orale*

Identification d'éléments cis-modulateurs de la régulation à distance du gène SLC40A1 : une opportunité pour réduire l'impasse diagnostique dans le contexte des hyperferritinémies avec surcharge en fer ?

Kevin UGUEN, Chandran KA, Caroline BENECH, Isabelle GOURLAOUEN, Caroline L'HOSTIS, Eric SOLER, Charlotte ANDRIEUX-SOLER, Virginie SCOTET, Claude FEREC, Gérald LE GAC.

Congrès du Club du Globule Rouge et du Fer, Presqu'île de Giens, 30 septembre 2022.

Liste des communications affichées

UMD-SLC40A1 : une base de données dédiée à l'étude et à l'interprétation clinique des variants rares du gène associé à l'hémochromatose de type 4, ou maladie de la ferroportine.

Kévin Uguen, Julie Guellec, Chandran Ka, Isabelle Gourlaouen, David Salgado, Christophe Bérout, Claude Férec, Gérald Le Gac.

9èmes Assises de génétique humaine et médicale, Nantes, janvier 2018. 3^è prix du meilleur poster par la SIGF (Société des Internes en Génétique de France)

Haemochromatosis type 4: structure/function analysis of the newly identified p.Ser47Phe missense mutation provides new insights about the ferroportin biology and mechanisms of disease.

Uguen K, Le Tertre M, Ka C, Gourlaouen I, Elbahnsi A, Ferec C, Callebaut I, Le Gac G.

53rd European Human Genetics Conference, Suède, Gothenburg, juin 2019

The structure-function analysis of ferroportin 1 (FPN1) gating residues sheds new light on the pathogenic mechanisms involved in haemochromatosis type 4 (HC 4).

Marlène Le Tertre, Cécile Ged, Ahmad Elbahnsi, Chandran Ka, **Kévin Uguen**, Julie Guellec, Isabelle Gourlaouen, Claude Férec, Isabelle Callebaut and Gérald Le Gac.

Congrès du globule rouge et du fer, Lyon, octobre 2019

Haemochromatosis type 4: structure/function analysis of the newly identified p.Ser47Phe missense mutation provides new insights about the ferroportin biology and mechanisms of disease.

Uguen K, Le Tertre M, Ka C, Gourlaouen I, Elbahnsi A, Ferec C, Callebaut I, Le Gac G.

Congrès du globule rouge et du fer, Lyon, octobre 2019

Importance des analyses structure-fonction pour l'interprétation clinique des variants faux-sens rares et la mise en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques : exemple de l'hémochromatose de type 4.

Kévin Uguen, Marlène Le Tertre, Chandran Ka, Ahmad Elbahnsi, Isabelle Gourlaouen, Christophe Bérout, David Salgado, Claude Férec, Isabelle Callebaut, Gérald Le Gac.

10^{ème} édition des Assises de Génétique Humaine et Médicale, Tours, janvier 2020. Prix ANPGM (Association Nationale des Praticiens en Génétique Moléculaire) du meilleur poster présenté

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée dans l'unité Inserm U1078 Génétique, Génomique et Biotechnologies de Brest, au sein de l'équipe IMRC ("Iron Metabolism and Red blood Cells"), sous la direction du Professeur Gérard Le Gac. Elle porte sur les pathologies innées du métabolisme du fer, plus précisément sur les pathologies liées aux mutations du gène *SLC40A1*, codant la ferroportine. Cette thématique est ancrée dans le laboratoire depuis plusieurs années, et des collaborations, notamment avec le Docteur Isabelle Callebaut, spécialisée en biochimie structurale, ont permis le développement d'analyses structure-fonction qui, en plus de permettre une interprétation des variations rares du gène *SLC40A1*, a aidé à mieux comprendre la biologie de la protéine et décrire un mécanisme mutationnel impliqué dans près de la moitié des variations perte de fonction du gène (Létocart et al., 2009; Le Gac et al., 2013; Callebaut et al., 2014; Ka et al., 2018; Guellec et al., 2019; Le Tertre et al., 2021a).

C'est dans cet environnement que j'ai, à la suite de mon master 2, démarré ma thèse d'université en janvier 2019. Mon travail avait pour but une meilleure interprétation des variations faux-sens du gène *SLC40A1*, une meilleure compréhension de la fonction de la ferroportine, sa régulation transcriptionnelle et son lien avec son régulateur post traductionnel principal, l'hepcidine.

Ce manuscrit se divisera en deux grands chapitres. Le premier sera dédié à l'interprétation des variations faux-sens du gène *SLC40A1*. Après une introduction générale, les résultats seront présentés sous la forme de trois articles, dont le premier sera soumis à la revue *Human Mutation* dès que la base de données UMD, décrite dans l'article, sera disponible en ligne. Le second chapitre traitera de la stratégie que j'ai mise au point pour l'étude de la régulation à distance du gène *SLC40A1*.

Dans ce manuscrit, les termes "ferroportine", "ferroportine-1" et "FPN1" seront utilisés pour parler de la ferroportine. Tous ces termes sont équivalents.

Chapitre I

**Variations faux-sens du gène *SLC40A1*:
interprétation structurale et fonctionnelle,
corrélations génotypes-phénotypes, base de
données locus spécifique**

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Variations faux-sens du gène SLC40A1 : interprétation structurale et fonctionnelle, corrélations génotypes-phénotypes, base de données locus spécifique

Introduction

1. Le métabolisme du fer

1.1. Généralités

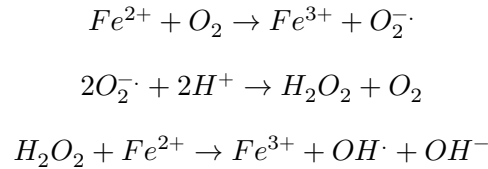
Le fer a un rôle essentiel dans l'organisme ; en dehors de quelques souches de lactobacillus, toutes les formes de vie ont besoin de fer (Harrison and Arosio, 1996). Il est impliqué dans un grand nombre de processus physiologiques, dans lesquels on le retrouve sous deux principales formes : héminique et non-héminique.

Le fer héminique est constitué d'un ion Fe^{2+} auquel est associé la protoporphyrine IX. La protoporphyrine IX est synthétisée à partir de glycine et de succinyl-CoA au travers de plusieurs réactions se déroulant dans le cytoplasme et la mitochondrie (Ryter and Tyrrell, 2000). La dernière étape est l'insertion d'un ion Fe^{2+} au sein de la protoporphyrine IX, par une ferrocyclase, dans la mitochondrie. L'hème est exporté de la mitochondrie pour être incorporée aux hémoprotéines. Les deux hémoprotéines les plus importantes sont l'hémoglobine, qui sert au transport d'oxygène à travers les globules rouges (érythrocytes), et la myoglobine, qui permet le stockage et l'utilisation d'oxygène par le muscle. Parmi les autres protéines hémiques, on retrouve divers cytochromes et enzymes, telles que des oxygénases ou la guanylate cyclase (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005).

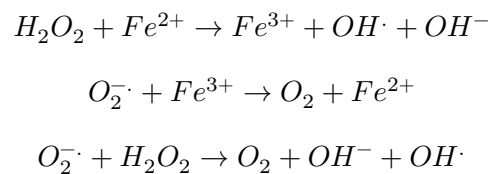
Le fer est également utilisable sous une forme non-héminique. C'est par exemple le cas des "clusters fer-soufre", où il est utilisé dans diverses réactions d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire mitochondriale, la synthèse d'ADN, la régulation transcriptionnelle (Geissler and Singh, 2011; Ganz, 2013).

Les capacités d'oxydoréduction du fer lui confèrent une importance physiologique majeure, mais elle est également la cause de sa toxicité. En effet, en conditions aérobies (en présence d'oxygène), le fer libre est capable de catalyser la production de radicaux toxiques. Cette toxicité est principalement due aux réactions de Fenton et Haber-Weiss, menant à la production de radicaux hydroxyles $OH\cdot$, une espèce réactive de l'oxygène (reactive oxygen species « ROS »).

-
- Réaction de Fenton



- Réaction d'Haber-Weiss



Les ROS sont responsables de divers dommages par l'oxydation des protéines, la peroxydation des membranes lipidiques ou encore la modification des acides nucléiques (mutagenèse, formation d'adduits d'ADN) (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005; Valko et al., 2016).

Afin de permettre une biodisponibilité suffisante du fer dans l'organisme sans pour autant subir les conséquences de sa toxicité, son métabolisme doit être finement régulé. Le corps humain est constitué de 3 à 4 g de fer, dont la majeure partie est contenue dans l'hémoglobine (2-3 g) (Ganz, 2013). L'homéostasie systémique du fer fonctionne presque exclusivement en circuit fermé (Figure 1), dont la seule porte d'entrée exogène est l'absorption intestinale par les entérocytes. Cette absorption représente 1 à 2 mg de fer par jour, et permet de compenser les pertes par desquamation épithéliale et saignements, qui sont en proportions équivalentes (Green et al., 1968). La grande majorité du fer se retrouvant dans les érythrocytes, le flux principal de fer est représenté par le recyclage des érythrocytes sénescents. Ce recyclage est assuré par les macrophages contenus dans le foie et la rate. Étant donnée la durée de vie du globule rouge (120 jours en moyenne), environ 0,8% sont recyclés chaque jour soit 20 à 25 mg. La dernière source de fer utilisable est stockée dans le foie par l'hépatocyte. Cette réserve représente 20 à 30% du fer total de l'organisme (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005).

On retient donc, chez l'adulte, 4 types cellulaires impliqués dans le métabolisme systémique du fer (Figure 1) :

- L'entérocyte, qui absorbe le fer
- L'érythroblaste, qui utilise le fer pour la synthèse de l'hémoglobine
- Le macrophage, qui recycle le fer
- L'hépatocyte, qui stocke le fer dans le foie

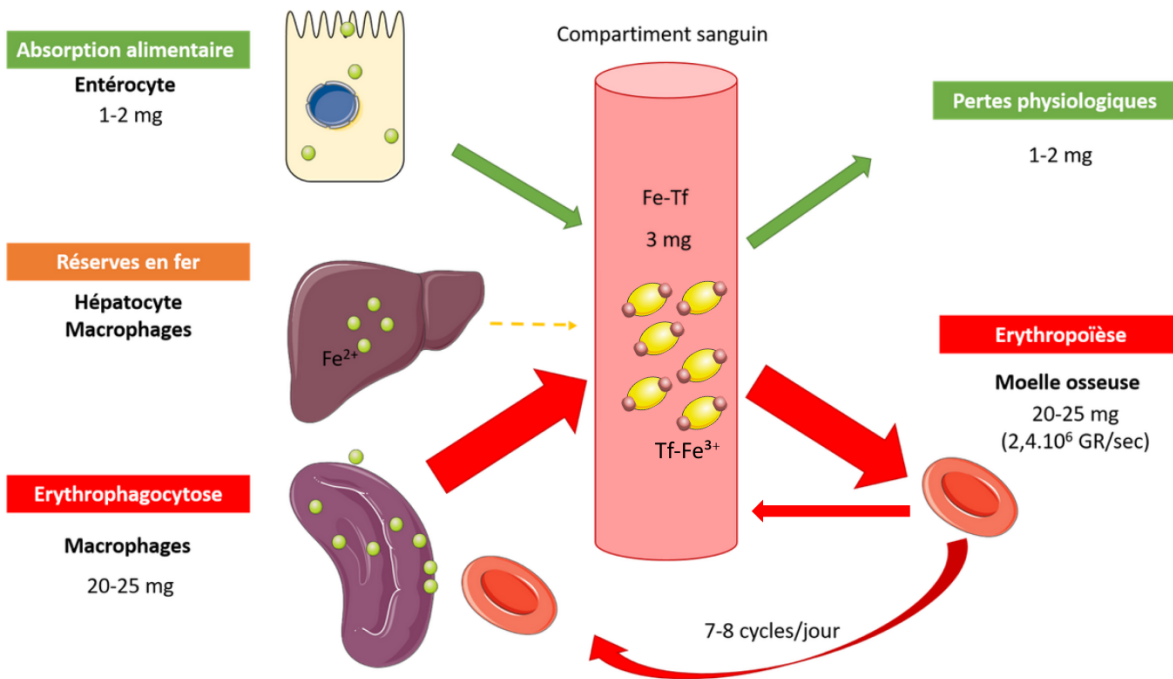


Figure 1: Représentation schématique du métabolisme systémique du fer chez l'homme. Les principales cellules impliquées dans le métabolisme systémique du fer sont l'entérocyte (import exogène), l'hépatocyte (stockage) et le macrophage (recyclage à partir des érythrocytes sénescents). Le fer circule dans le sang lié à la transferrine (Tf), et sert pour la majeure partie à la constitution de nouveaux érythrocytes dans la moelle osseuse. A noter que les cellules érythroïdes exportent du fer lors de leur processus de maturation.

A noter qu'une étude récente a suggéré que le rein jouait également un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du fer, par la réabsorption du fer au niveau tubulaire (Mohammad et al., 2021).

Les échanges de fer entre les différents organes se font au travers de la circulation sanguine grâce à une protéine, la transferrine.

Dans le compartiment sanguin, la transferrine prend en charge le fer, évitant ainsi la présence de fer libre toxique. Cette protéine de 76kDa synthétisée par le foie est constituée de deux lobes N et C-terminaux, chacun ayant la capacité de lier un ion Fe^{3+} , et a une demi-vie d'environ 8 jours dans le sang (Messori and Kratz, 1994), qui en contient 200-300 mg/dL. La transferrine (apotransferrine) fixe le fer ferrique Fe^{3+} lorsque le pH du milieu environnant est à 7,4. Le complexe apotransferrine et fer, appelé holotransferrine, se dissocie à pH acide (Princiotta and Zapolski, 1976) dans l'endosome lorsqu'il est capté par une cellule *via* le récepteur à la transferrine TfR1. La majeure partie du fer circulant étant fixée à la transferrine, il est possible d'évaluer le statut martial d'une personne par calcul du coefficient

de saturation de la transferrine (CST). Il est le résultat du rapport entre la concentration sérique en fer sur la capacité totale de fixation de fer. Un CST inférieur à 20% témoigne d'une carence en fer, tandis qu'à partir de 45% de CST, une partie du fer ne peut plus se fixer et se retrouve sous forme libre, et donc potentiellement toxique, dans le sang et le parenchyme (principalement hépatique)(Brissot et al., 2012; Kawabata, 2019).

Les paragraphes suivants vont traiter des principales voies d'import, d'utilisation et de stockage du fer en prenant pour exemple le type cellulaire majoritairement impliqué dans ces voies. Ainsi, nous traiterons de l'import du fer dans les entérocytes, de son utilisation par les érythrocytes, de son recyclage par les macrophages et de son stockage par les hépatocytes.

1.2. Absorption intestinale de fer

L'entérocyte duodénal, et dans une moindre mesure celui du segment proximal du jéjunum, est la seule cellule capable d'importer le fer provenant de l'alimentation. La portion de fer quotidienne dans un régime alimentaire adulte est d'environ 15 mg, mais seuls 1 à 2 mg sont réellement absorbés. Comme dans le corps humain, le fer alimentaire se trouve sous deux formes : héminique, issu principalement de la viande rouge qui représente environ les 2/3 du fer absorbé, et non héminique, ou inorganique, issu en majorité des céréales et légumes (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005; Fuqua et al., 2012). A la surface apicale des entérocytes se trouve le transporteur de fer DMT1 ("divalent metal transporter-1", encore appelé NRAMP2 ou SLC11A2), qui permet l'import de fer sous la forme ferreuse (Fe^{2+}) (Andrews, 1999). Le pH faible du bol alimentaire sortant de l'estomac facilite la dissolution du fer inorganique et la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) par la ferrereductase DCYTB (McKie et al., 2001) (Figure 2).

Le mécanisme d'absorption du fer héminique par l'entérocyte est encore mal connu. L'hypothèse du rôle d'HCP-1 ("heme carrier protein 1") dans l'absorption de l'hème a été soulevée (Shayeghi et al., 2005), mais des études ont montré que ce transporteur avait une affinité plus grande pour le folate et était impliqué dans des anomalies de l'absorption des folates (Qiu et al., 2006). Une autre piste serait l'utilisation d'HRG1 ("heme regulatory gene 1") (Rajagopal et al., 2008). Une fois absorbé, le fer est libéré de l'hème par l'action de l'Hème Oxygénase 1 (HO-1) (Ferris et al., 1999).

Le fer inorganique et celui issu de l'hème peut être soit stocké dans la ferritine, soit être utilisé pour le métabolisme de la cellule, soit être exporté dans le compartiment sanguin par la ferroportine 1 (encore appelée FPN1, ou ferroportine) pour y être pris en charge par la transferrine (Donovan et al., 2005). Ce transport sera couplé à l'oxydation du fer ferreux Fe^{2+} en fer ferrique Fe^{3+} par l'héphaestine (HEPH), ferroxidase exprimée à la membrane basale des entérocytes. L'observation d'une accumulation de fer dans les entérocytes de souris possédant une délétion dans le gène codant l'héphaestine souligne la nécessité de cette dernière étape pour l'export du fer dans le compartiment sanguin (Vulpe et al., 1999).

A noter qu'une dernière forme de fer, inclus dans la ferritine, serait absorbée au niveau apical par endocytose (San Martin et al., 2008).

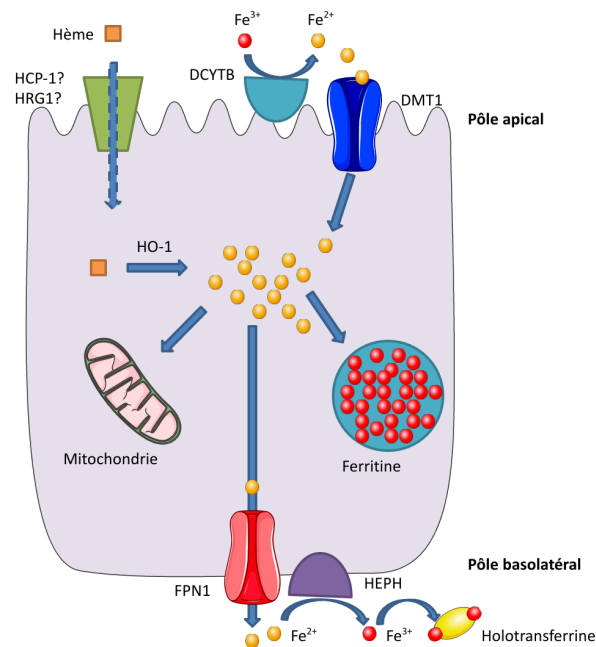


Figure 2: Absorption intestinale de fer au niveau de l'entérocyte. Le fer libre alimentaire est importé sous forme Fe^{2+} à partir de la surface apicale de l'entérocyte par DMT1. Le fer hémique serait quant à lui importé *via* HCP-1 ou HRG1 avant d'être libéré par HO-1. Une fois dans la cellule, le fer peut être pris en charge dans la ferritine (voir le paragraphe 1.5), utilisé par la mitochondrie (voir le paragraphe 1.3) ou exporté dans le sang par la ferroportine (FPN1).

1.3. Utilisation du fer par les cellules érythroïdes

La grande majorité du fer du corps humain est dévolue à la synthèse d'hémoglobine par les cellules érythroïdes afin d'assurer le transport d'oxygène. La formation des globules rouges, appelée érythropoïèse, est une succession d'étapes de modification des progéniteurs, les érythroblastes, jusqu'à l'érythrocyte mature (Valent et al., 2018). Un érythrocyte peut contenir jusqu'à 280 millions de molécules d'hémoglobine, équivalant à environ 1 milliard d'atomes de fer par globule rouge (Vogt et al., 2021). Ainsi la biosynthèse de l'hème dans la moelle osseuse consomme 0,8 à 1 mg/h de fer. Ce fer, issu du compartiment sanguin et lié à la transferrine, pénètre dans le précurseur du globule rouge par l'intermédiaire du récepteur à la transferrine de type 1 (TfR1) (Figure 3). L'holotransferrine se fixe sur TfR1 (Lawrence et al., 1999; Cheng et al., 2004), entraînant son endocytose par un mécanisme clathrine dépendant (Kleven et al., 2018). La libération du fer de la transferrine se fait grâce à l'acidification du milieu par des pompes à protons. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est alors réduit en fer

ferreux (Fe^{2+}) par une ferrireductase, STEAP3 (« Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3 ») (Ohgami et al., 2005), et libéré dans le cytosol *via* le transporteur DMT1 (Andrews, 1999; Tabuchi et al., 2000). L'apotransferrine est quant à elle recyclée avec TfR1 grâce à un endosome de recyclage à la membrane plasmique (Kawabata, 2019), où ils se dissocient afin de rendre le récepteur disponible pour fixer à nouveau une holotransferrine circulante. Une fois disponible dans le cytosol, la majeure partie du fer entre dans la mitochondrie par le biais de la mitoferrine, située à la membrane interne de la mitochondrie (Paradkar et al., 2009), stabilisée par la protéine ABCB10 (Chen et al., 2009). De là, le fer est inséré à la protoporphyrine IX par une ferrochelatase (FECH), puis l'hème est exporté dans le cytosol *via* l'isoforme 1b de FLVCR (« Feline Leukemia Virus subgroup C cellular Receptor »), où il sera intégré à la globine pour former l'hémoglobine (Chiabrando et al., 2012).

Récemment, Zhang et al. ont suggéré que les érythroblastes et les érythrocytes ont la capacité de relarguer du fer par la ferroportine. Cette observation, d'abord surprenante venant de cellules ayant des besoins importants en fer, s'expliquerait par un besoin de réguler la quantité de fer circulante dans le sang et protéger les cellules érythroïdes du stress oxydatif (Ganz, 2018; Zhang et al., 2018a).

Enfin, l'hypothèse d'une voie d'entrée différente de fer, libre cette fois-ci, est soulevée depuis plusieurs années déjà (Morgan, 2001), et ce pourrait être grâce au "cluster de différenciation" CD44. Cette protéine est exprimée à la surface des cellules érythroïdes, et une étude récente a suggéré le rôle de CD44 dans l'acquisition du fer lié au hyaluronate dans les cellules cancéreuses (Müller et al., 2020). Des travaux en cours pourraient permettre de confirmer cette hypothèse.

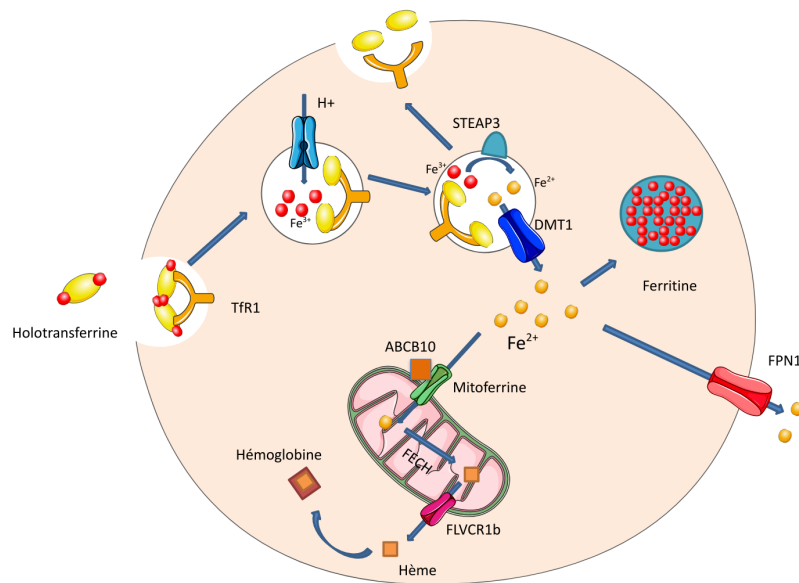


Figure 3: Utilisation du fer par l'érythroblaste. La voie d'entrée principale du fer dans la cellule érythroïde est le récepteur à la transferrine Tfr1. Une fois endocyté, le fer se dissocie de la transferrine du fait de l'acidification de l'endosome. Le fer Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} par STEAP3, avant de retrouver le cytoplasme grâce à DMT1, où il va pouvoir être stocké par la ferritine, exporté par FPN1 ou utilisé par la mitochondrie. Il y entre alors grâce à la mitoferrine aidée d'ABCB10, pour y être couplé à la protoporphyrine IX par FECH, permettant la formation de l'hème qui sera exporté par FLVCR1b dans le cytosol pour y intégrer la globine et ainsi constituer l'hémoglobine.

1.4. Recyclage du fer par les macrophages

L'absorption intestinale de fer ne représente qu'une faible proportion du fer réellement utilisé par l'organisme, la majeure partie du fer disponible provenant du recyclage des érythrocytes sénescents. Les érythrocytes ont une durée de vie de 120 jours environ, et au cours de leur vieillissement leur surface subit des modifications permettant leur reconnaissance par le macrophage afin d'y être recyclés (Klei et al., 2017). Ils deviennent notamment moins déformables, donc moins capables de passer dans des capillaires sanguins de diamètre inférieur au leur. Cette perte d'élasticité est responsable de leur rétention au niveau de la pulpe rouge de la rate, où se trouvent les macrophages qui les phagocytent (Mebius and Kraal, 2005). Les macrophages du foie (cellules de Kupffer) ainsi que ceux présents au niveau de la moelle osseuse sont également capables de phagocyter les érythrocytes (Nairz et al., 2017).

La perte d'élasticité n'est pas le seul signal entraînant la phagocytose des érythrocytes par le macrophage. D'autres signaux membranaires apparaissent avec le temps, notamment la modifica-

tion de la glycoprotéine membranaire “Band 3” (Lutz, 2004; Arese et al., 2005) qui, par son agrégation, active le complément et facilite la reconnaissance par les macrophages. Un autre mécanisme mis en évidence implique la phosphatidylsérine. Ce composant de la membrane plasmique des cellules est en temps normal situé sur la face interne de la bicouche lipidique. Son externalisation, déclenchée par diverses sources de stress cellulaire (Klei et al., 2017), constitue un signal pour sa reconnaissance et sa phagocytose par le macrophage (Schroit et al., 1985). Enfin, un dernier mécanisme a été décrit, mettant en jeu CD47. En temps normal, ce marqueur cellulaire est lié à SIRPα (“signal-regulatory protein alpha”) et joue un rôle protecteur, empêchant la phagocytose. Les changements conformationnels de CD47 induits par le vieillissement du globule rouge modifient son rôle, facilitant sa reconnaissance par le macrophage (Burger et al., 2012).

Les globules rouges sont ensuite internalisés dans des phagosomes qui fusionneront avec les vésicules lysosomales pour former les phagolysosomes (Figure 4). L'érythrocyte va être digéré sous l'action d'espèces réactives et d'enzymes diverses (hydrolases), libérant l'hémoglobine et l'hème (Ganz, 2016). Ce dernier va être transporté vers le cytosol par le transporteur d'hème HRG1 (« Heme-Responsive Gene-1 ») où le fer va finalement être libéré sous l'action de l'hème oxygénase (HO-1) (Poss and Tonegawa, 1997; Kovtunovych et al., 2010; White et al., 2013). Le fer libre dans le cytosol va pouvoir être soit stocké dans la ferritine, soit utilisé par la mitochondrie, soit exporté dans le sang par la ferroportine, où il sera oxydé grâce à la céruloplasmine afin de pouvoir être pris en charge par la transferrine (Harris et al., 1999).

D'autres voies minoritaires permettent l'entrée de fer dans le macrophage. L'hémoglobine peut être présente directement dans le compartiment sanguin, notamment lors du processus d'hémolyse (lyse des érythrocytes). Elle y est complexée à l'haptoglobine et peut ainsi être endocytée *via* le récepteur CD163 (Kristiansen et al., 2001). L'hémoglobine peut également subir des phénomènes d'oxydation dans le compartiment sanguin, et ainsi libérer l'hème, qui sera fixé à l'hémopexine. Ce complexe hème-hémopexine est ensuite reconnu par le macrophage *via* le récepteur CD91 (Hvidberg et al., 2005). Enfin, le fer lié à la transferrine peut également être capté par TfR1.

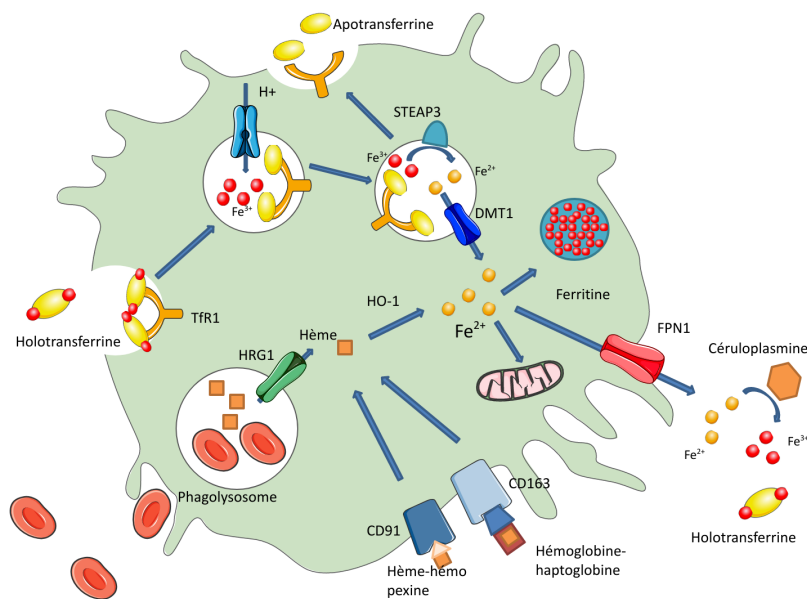


Figure 4: Recyclage du fer par le macrophage. Le macrophage phagocyte les érythrocytes sénescents, qui seront digérés au sein des phagolysosomes, afin de libérer l'hème. Une fois entré dans le cytosol *via* HRG-1, l'hème va libérer le fer grâce à l'action de l'hème oxygénase (HO-1). De là, le fer peut être stocké dans la ferritine, utilisé par la mitochondrie, ou relargué dans le sang par la ferroportine.

1.5. Stockage du fer par l'hépatocyte: le rôle de la ferritine

Sur les 4g de fer en moyenne présents dans le corps humain, environ 1g est qualifié de fer de stockage, dont 40% (400 mg) se trouvent stockés par le foie, principalement dans les hépatocytes. L'hépatocyte est le type cellulaire majoritaire constituant le foie, représentant 80% de la masse hépatique (Anderson and Frazer, 2005) et son rôle dans le métabolisme du fer est primordial. En plus de stocker une grande partie du fer non utilisé, il est le lieu principal de production de la transferrine (Ponka et al., 1998) et d'autres protéines du métabolisme du fer telle que la céruloplasmine (Hellman and Gitlin, 2002), l'haptoglobine (Wassell, 2000), l'hémopexine (Tolosano and Altruda, 2002) et l'hepcidine (Krause et al., 2000).

En conditions physiologiques, le fer pénètre dans l'hépatocyte majoritairement lié à la transferrine *via* TfR1. En exprimant le marqueur CD91 il peut également internaliser l'hème associé à l'hémopexine (Hvidberg et al., 2005). Enfin, il existe une voie d'entrée du fer libre dans l'hépatocyte, qui semble être la voie principale d'import lors de surcharge sanguine en fer. Lorsque la transferrine est saturée à plus de 45%, une certaine quantité de fer se retrouve non lié à la transferrine (NTBI "Non Transferrin Bound Iron") (Brissot et al., 2012).

L'hépatocyte a un rôle primordial dans la clairance rapide de ce fer libre (Brissot et al., 1985). Plusieurs voies d'entrée de ce fer ont été proposées, tout d'abord *via* le transporteur ZIP14 (Zinc transporter)(Liuzzi et al., 2006). Le récepteur à la transferrine de type 2 (TfR2) a également été suggéré comme étant impliqué dans l'import de fer libre, en plus de son rôle dans l'internalisation de la transferrine, bien que les mécanismes à l'origine de l'import de fer libre restent à élucider (Graham et al., 2008).

Une fois dans la cellule, le fer constitue le pool labile de fer (labile iron pool ; LIP). Ce pool, retrouvé dans tous les types cellulaires, va être stocké dans la ferritine s'il n'est pas utilisé par la mitochondrie ou exporté. La ferritine est un hétéropolymère pouvant stocker jusqu'à 4000 atomes de fer (Harrison and Arosio, 1996). Elle est constituée de 24 sous-unités de chaînes lourdes ("Heavy") et de chaînes légères ("Light"), codées respectivement par les gènes *FTH* et *FTL*. Le fer ferreux Fe^{2+} issu du pool labile de fer est acheminé jusqu'à la ferritine grâce aux protéines chaperonnes PCBP1 et PCBP2 (Shi et al., 2008). De là, les chaînes lourdes de la ferritine oxydent le fer ferreux en fer ferrique Fe^{3+} , puis les chaînes légères forment un noyau d'hydroxy-phosphate ferrique. Ce fer n'est pas stocké dans la ferritine de façon irréversible. Il peut notamment être mobilisable en cas de déficit en fer grâce à un processus, la ferritinophagie, où la ferritine est dégradée *via* les autophagosomes. La protéine cargo NCOA4 ("Nuclear receptor CO-activator 4"), en cas de faible concentration de fer, va s'accumuler dans la cellule et se lier aux chaînes lourdes de la ferritine. Cette liaison va entraîner le transport de la ferritine vers l'autophagosome puis le lysosome pour être dégradée et ainsi libérer le fer qu'elle contient (Dowdle et al., 2014; Mancias et al., 2014; Mancias et al., 2015) (Figure 5).

Le fer joue un rôle dans la régulation de la synthèse de ferritine. Cette régulation passe par la présence, sur l'ARN messager des chaînes lourdes et légères, d'un élément de réponse au fer, l'élément IRE ("Iron Responsive Element"). Cette séquence d'ARN, capable d'adopter une structure en tige-boucle spécifique, est commune à plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du fer (Cairo and Pietrangelo, 2000), et permet la fixation de protéines de la famille des aconitases, les protéines IRP ("Iron Regulatory Protein"). La fixation de la protéine IRP a un impact différent en fonction de la localisation de la séquence IRE : si celle-ci est localisée dans le 5'UTR ("Untranslated Transcribed Region"), la fixation de la protéine IRP est responsable d'une répression de la traduction (Muckenthaler et al., 1998), alors que si les séquences IRE sont situées dans le 3'UTR, les protéines IRP ont un rôle dans la stabilisation de l'ARN messager, comme c'est le cas pour TfR1 (Hentze and Kühn, 1996). Dans le cadre de la ferritine, la présence de cette séquence dans le 5'UTR entraîne une régulation positive par le fer. Lors d'une faible concentration en fer, la protéine IRP est fixée à l'élément IRE, empêchant la fixation de la petite sous-unité du ribosome et réprimant donc la traduction. A l'inverse, en cas de forte concentration en fer intracellulaire, ce dernier séquestre la protéine IRP, laissant libre l'élément IRE et permettant la fixation du ribosome, la traduction de la ferritine et le stockage du fer (Hentze et al., 1987; Hentze and Kühn, 1996) (Figure 6).

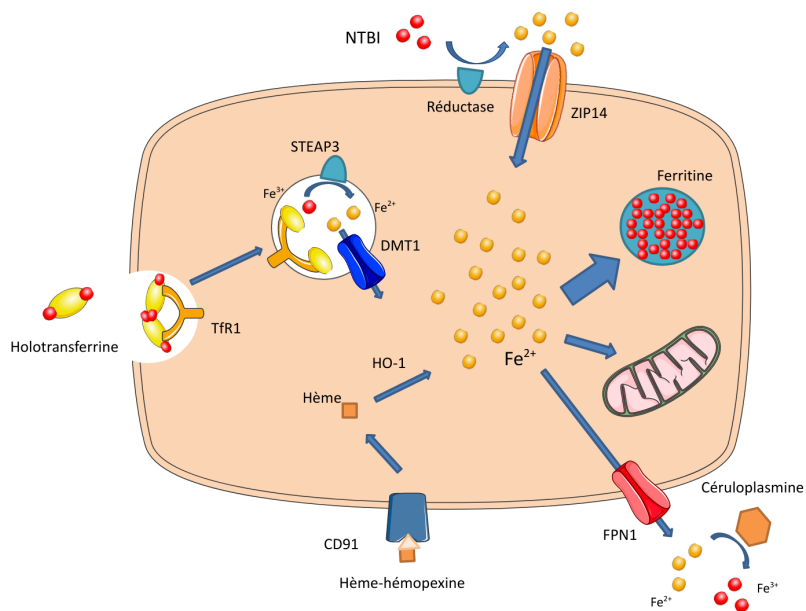


Figure 5: Stockage du fer par l'hépatocyte. Le fer entre dans l'hépatocyte par le récepteur TfR1, à partir de l'hème par le récepteur CD91, ou sous forme libre grâce au transporteur ZIP14. Le rôle principal de l'hépatocyte est de stocker le fer dans la ferritine, hétéropolymère capable de stocker jusqu'à 4000 atomes de fer.

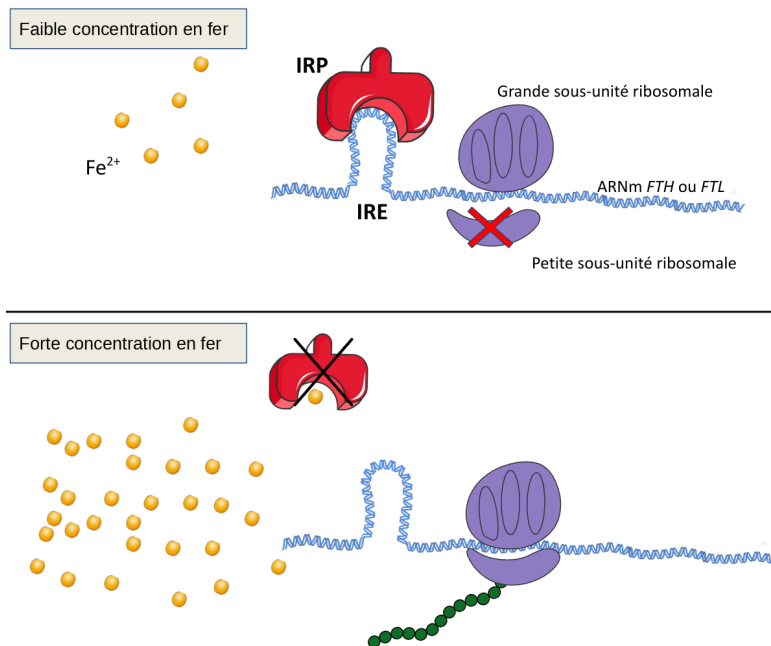


Figure 6: Régulation de la traduction des sous-unités lourdes et légères de la ferritine par le fer.

Lors d'une faible concentration intracellulaire en fer, la protéine IRP se fixe à l'élément IRE de l'ARNm. Cette fixation bloque l'action de la petite sous-unité du ribosome, réprimant la traduction de la ferritine. A l'inverse, lors d'une forte concentration en fer, l'IRP est séquestrée, permettant la traduction de la ferritine pour le stockage du fer. IRE= "Iron responsive element", IRP="Iron responsive protein".

2. La régulation systémique de l'homéostasie du fer par l'axe hepcidine-ferroportine

Comme dit plus haut, le fer, bien qu'essentiel, doit être finement régulé afin d'éviter la production de ROS. Nous avons vu qu'il existe plusieurs voies d'entrée du fer dans la cellule. Pour ce qui est de son export dans le compartiment sanguin, les cellules partagent une voie commune et unique : la ferroportine. Elle compose, avec son régulateur principal l'hepcidine, l'axe hepcidine-ferroportine, garant du maintien d'une concentration sanguine en fer suffisante mais non toxique au niveau de l'organisme.

2.1. La ferroportine

L'an 2000 a marqué un tournant dans la compréhension de l'homéostasie du fer, avec la description par trois équipes différentes d'un transporteur de fer, la ferroportine (Uniprot Q9NP59), encore appelée ferroportine-1 (FPN1), SLC40A1 ("Solute Carrier Family 40 member 1"), IREG1 ("Iron-REgulated Gene 1") ou MTP1 ("Metal Transporter Protein 1"), permettant de lever le voile sur les mécanismes d'export du fer par les cellules. Donovan et al. ont cloné le gène codant la ferroportine à partir de zebrafish mutants "weissherbst" (Donovan et al., 2000). McKie et al. ont quant à eux utilisé des lignées de souris hypotransferrinémiques. A partir d'une comparaison de l'expression génique entre des souris hétérozygotes et homozygotes, ils ont identifié le gène codant la ferroportine, qui se trouvait différentiellement exprimé entre les deux groupes de souris (McKie et al., 2000). Enfin, Abboud et Haile ont identifié le gène grâce à la présence dans la séquence de son ARN messenger d'un motif IRE ("Iron Responsive Element")(Abboud et al., 2000). Ces mêmes équipes ont montré le rôle de la ferroportine dans l'export du fer utilisant des isotopes radioactifs de fer dans des oocytes de *Xenopus laevis* ou la lignée cellulaire humaine de rein (HEK293T) surexprimant le transporteur (Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000).

Les travaux suivants de Donovan et al. ont mis en évidence l'importance de la ferroportine *in vivo* chez des souris transgéniques. Les souris pour lesquelles le gène *Fpn* était inactivé sur les deux allèles ("knockout", KO) ne survivaient pas au stade embryonnaire, par défaut de transfert de fer de la mère à l'embryon *via* l'endoderme viscéral extraembryonnaire. Les souris hétérozygotes présentaient quant à elles un défaut modéré d'homéostasie du fer. Une stratégie de KO conditionnel a montré que les souris pour lesquelles la ferroportine était inactivée dans tous les tissus excepté le placenta et l'endoderme viscéral extra-embryonnaire survivaient mais présentaient une anémie associée à un dépôt de fer dans les entérocytes, hépatocytes et macrophages (Donovan et al., 2005). Ces travaux mettent en évidence l'importance de la ferroportine dans les échanges de fer entre la mère et le fœtus, hypothèse corroborée par d'autres équipes qui ont mis en évidence la présence de la ferroportine à la surface basale des cellules du syncytiotrophoblaste (Bradley et al., 2004; Bastin et al., 2006). En comparant l'expression de la ferroportine dans le placenta de femmes présentant ou non un déficit en fer, différentes équipes ont montré des effets surprenants. Il a, en effet, été observé une diminution de l'expression de la ferroportine en cas de déficit en fer, alors que l'import de fer est accru dans les cellules du syncytiotrophoblaste (Sangkhae et al., 2020; Cao et al., 2021). Ces résultats pourraient s'expliquer par un besoin de protéger l'intégrité du placenta pour permettre la survie du fœtus, entraînant en revanche un risque d'anémie fœtale (O'Brien, 2021).

En plus de son rôle au niveau systémique, la ferroportine semble tenir une place importante dans l'homéostasie locale du fer, et ce dans divers organes. Par des expériences de KO conditionnel de la ferroportine dans les cardiomyocytes, Lakhal-Littleton et al. ont montré l'importance du transporteur dans le maintien de la fonction cardiaque et la survie des souris (Lakhal-Littleton et al., 2015). Le

cerveau est un autre organe particulièrement dépendant du fer. Il est décrit que l'accumulation de fer joue un rôle important dans la sénescence cérébrale et les pathologies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, et que la ferroportine jouerait un rôle dans cette accumulation (Ward et al., 2014; Raha et al., 2022).

Enfin, la ferroportine a été décrite comme impliquée dans un nouveau mécanisme de mort cellulaire programmée : la ferroptose. Ce mécanisme, de description récente et qui est classé parmi les morts cellulaires dites non-apoptotiques, présente des caractéristiques propres (Dixon et al., 2012b). Sa découverte fait suite à l'identification de composés induisant une mort cellulaire, dont l'érastine (Dolma et al., 2003; Dixon et al., 2012b). La ferroptose met en jeu une accumulation de fer intracellulaire et de ROS, et est impliquée dans de nombreux processus pathologiques telles que la neurodégénérescence ou l'inflammation (Tang et al., 2021a). Le fer étant un élément clé dans cette mort cellulaire, le rôle de la ferroportine dans ce processus a été évoqué. Dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y, le traitement par érastine entraîne une diminution de l'expression de la ferroportine, et un "knockdown" de la ferroportine accélère la ferroptose (Geng et al., 2018). De la même manière, une suppression de la ferroportine dans les cellules de Sertoli favorise la ferroptose liée à des lésions d'ischémie-reperfusion, alors que la surexpression de la ferroportine permet d'inhiber le processus en diminuant le taux de fer intracellulaire (Li et al., 2018a). Tous ces éléments mettent en lumière l'importance de la ferroportine dans ce processus de mort cellulaire.

2.2. Structure de FPN1

2.2.1. Appartenance de la ferroportine à la famille des facilitateurs majeurs

La ferroportine est un transporteur de type SLC ("Solute Carrier"), qui regroupe un grand nombre de protéines membranaires assurant le transport de divers substrats à travers la membrane plasmique (Liu, 2019). Elle fait partie de la famille des transporteurs MFS ("Major Facilitator Superfamily"), la plus large, la plus ancienne et la plus diverse famille de transporteurs actifs secondaires retrouvée de façon ubiquitaire chez tous les organismes vivants (Pao et al., 1998). Chez l'homme, plus de 100 protéines MFS ont été identifiées selon la base HGNC ("HUGO Gene Nomenclature Committee") (Gray et al., 2015). Ces protéines ont une fonction de transport, permettant l'export ou l'import de divers nutriments, la clairance de composés toxiques ou encore la signalisation inter-cellulaire (Quistgaard et al., 2016). L'importance de cette famille de protéines a poussé plusieurs équipes à tenter de mieux caractériser la structure et la fonction de ces transporteurs. Le premier transporteur étudié fut la lactose perméase bactérienne LacY, provenant de la bactérie *Escherichia Coli* (E.Coli) qui a servi de modèle au mécanisme de transport des protéines MFS (Smirnova et al., 2011). Chez l'homme, les transporteurs de glucose (GLUTs) ont été les plus étudiés, probablement du fait de leur rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du glucose et leur implication dans le diabète de type 2 (Augustin, 2010).

Les transporteurs MFS peuvent être divisés en trois catégories, en fonction de leur mécanisme de transport (Forrest et al., 2011; Quistgaard et al., 2016) :

- les uniporteurs, qui ne transportent qu'un substrat,
- les symporteurs qui transportent un substrat couplé à un ion, en général un proton,
- et les antiporteurs, qui transportent un substrat et un co-substrat en direction opposée.

Dans tous les cas, les protéines MFS partagent une structure commune, constituée de 12 hélices transmembranaires (TM1 à TM12), organisées en deux lobes symétriques : un lobe N-terminal (TM1 à TM6) et un lobe C-terminal (TM7 à TM12) (Hirai et al., 2002), connectés par une large boucle intracellulaire. De façon plus précise, chaque lobe peut être lui-même divisé en deux répétitions inversées de trois hélices, nommées respectivement A (TM1, TM4, TM7 et TM10), B (TM2, TM5, TM8 et TM11) et C (TM3, TM6, TM9, TM12) (Radestock and Forrest, 2011) (Figure 7). La description des premières structures cristallisées du transporteur LacY et de l'antiporteur bactérien GlpT ont confirmé cette organisation, proposant un site de fixation du substrat à l'interface des deux lobes, dans une cavité centrale (Abramson et al., 2003; Huang et al., 2003).

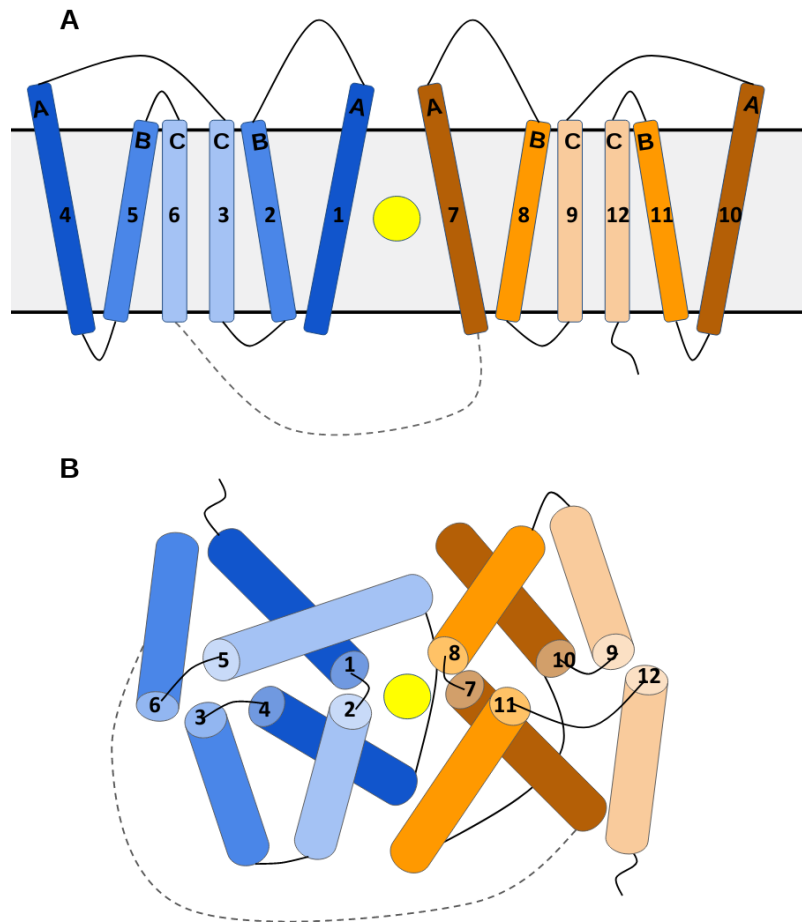


Figure 7: Représentation schématique de la topologie des protéines de la famille MFS (d’après Drew et al., 2021). **A** Les deux lobes N (en bleu) et C (en orange) terminaux sont connectés par une large boucle intracellulaire entre les hélices 6 et 7. Chaque lobe est constitué de deux répétitions inversées de trois hélices (A, B et C). **B** Vue du dessus montrant l’orientation des hélices au sein de chaque lobe. Les hélices A de chaque répétition (TM1, TM4, TM7 et TM10) forment la cavité centrale, subissant les changements locaux afin de fixer et libérer le substrat (cercle jaune).

Le premier modèle de transport de substrats au travers des protéines MFS a été proposé en 1966 par Jardesky (Jardetzky, 1966). Ce modèle, dit d’“alternative access”, suppose que le transport du substrat implique une modification de la structure tridimensionnelle du transporteur, créant alternativement un accès à la face intracellulaire et au milieu extracellulaire. Ainsi, lors de la fixation du substrat d’un côté de la membrane plasmique, la protéine MFS subit des changements conformationnels permettant le relargage du substrats de l’autre côté de la membrane. Le transporteur existe sous deux conformations extrêmes: ouverte vers l’intérieur de la cellule (“inward-facing”) ou vers l’extérieur (“outward-facing”). Plusieurs travaux sont venus étayer cette hypothèse.

D'une part des travaux de cristallographie ont montré l'existence de ces deux conformations pour certaines protéines MFS, comme les transporteurs bactériens LacY, Xyle ou encore l'homologue bactérien de FPN1 BbFPN (Quistgaard et al., 2013; Kumar et al., 2015; Taniguchi et al., 2015) et GLUT5 chez les mammifères (Nomura et al., 2015). D'autre part, des expériences de smFRET ("single-molecule Förster resonance energy transfer") ont montré les changements conformationnels entre les deux lobes du transporteur LacY déclenchés par la liaison au substrat (Majumdar et al., 2007).

Puisque le transporteur existe sous deux conformations extrêmes, comment passe-t-il de l'une à l'autre? Un premier modèle a été proposé par Huang et al. en 2003, le modèle "rocker-switch". Selon cette hypothèse une rotation entre les deux lobes N et C autour d'un axe de rotation passant par le site de liaison central au substrat serait à l'origine du basculement entre les deux conformations (Huang et al., 2003), qui sont maintenues à l'aides de liaisons de type ponts salins (Huang et al., 2003; Law et al., 2008).

La description de structures de certaines protéines MFS dans un état intermédiaire, nommé "occluded", remet en question l'hypothèse d'un simple modèle "rocker-switch" de basculement d'un état extrême à l'autre (Quistgaard et al., 2016). Ainsi, un autre modèle a été proposé, celui du "clamp-and-switch" (Quistgaard et al., 2016), où, lors du passage d'un état extrême à un autre, la protéine passerait par des états intermédiaires, "inward-facing occluded" ou "outward-facing occluded". Dans l'état "inward-facing occluded", par exemple, la plupart des hélices gardent la même conformation, mais il existe une occlusion du site de fixation par l'interaction entre les extrémités cytoplasmiques de plusieurs hélices, notamment TM4 et TM10. Il en est de même avec les extrémités extracellulaires des hélices TM1 et TM7 dans l'état "outward-facing occluded". Cette première étape de "clamping" précéderait le passage vers l'autre conformation extrême (Figure 8).

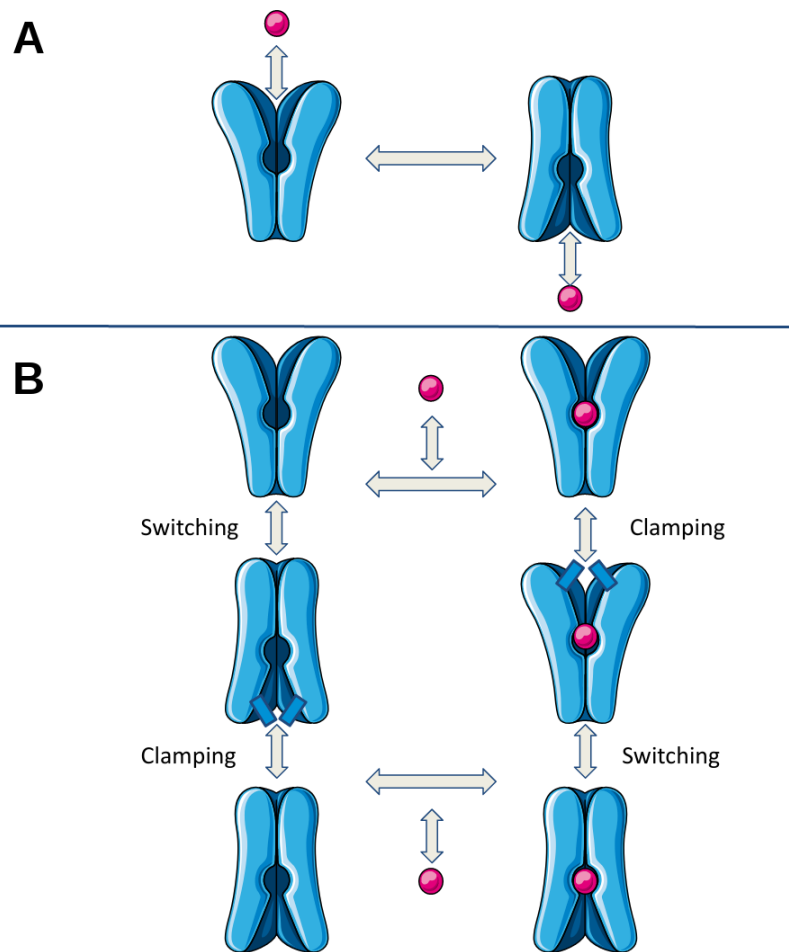


Figure 8: Représentation des modèles d'accès alternatifs proposés pour les protéines MFS (d'après Quistgaard et al. 2016). **A** Modèle du “rocker-switch”, avec basculement des hélices pour passer d’une conformation “outward-facing” (à gauche) à “inward-facing” (à droite). **B** Modèle du “clamp-and-switch”, où les étapes de “switching” sont précédées par un “clamping” à l’extrémité intra ou extracellulaire.

Pour expliquer ce modèle, il faut également comprendre comment ces structures peuvent passer et être maintenues dans une ou l’autre des conformations, et cela met en lumière certains résidus essentiels, dits “gating residues”. Ces résidus ont pour rôle de médier et stabiliser les interactions entre les lobes N et C-terminaux du transporteur, en enchaînant des cycles de formation/séparation de liaisons non covalentes (ponts salins, liaisons hydrogène ou interactions hydrophobes) (Solcan et al., 2012). Parmi ces résidus, un motif est extrêmement conservé entre toutes les protéines MFS. Ce motif appelé motif A contient la séquence consensus suivante : $Gxxx(D/E)(R/K)xG(R/K)(R/K)$ et est situé entre les hélices transmembranaires 2 et 3 du lobe N-terminal et/ou les hélices 8 et 9 du lobe C-terminal (Griffith et al., 1992; Jessen-Marshall et al., 1995). Les acides aminés de ce motif participeraient notam-

ment, comme montré sur le modèle bactérien YajR, à la stabilisation de la protéine dans une conformation ainsi qu'un relais de charges provoqué par la liaison du substrat déclenchant les changements conformationnels (Jiang et al., 2013).

La ferroportine fait partie de cette grande famille de protéines MFS, et la détermination de sa structure et de son mécanisme de fonctionnement occupe les chercheurs depuis près de 20 ans.

2.2.2. La structure tridimensionnelle de FPN1 pour expliquer le mécanisme de transport du fer.

La détermination de la structure d'une protéine est d'importance majeure pour la compréhension de sa fonction. La particularité des protéines MFS est leur localisation transmembranaire, rendant leur cristallographie difficile (Birch et al., 2018). Plusieurs équipes ont tenté d'abord de prédire, puis de déterminer la structure de FPN1.

Au début des années 2000, les équipes ayant décrit FPN1 ont tenté de prédire sa structure à partir d'algorithmes (Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000; Devalia et al., 2002), avec des résultats divergents. C'est en 2005 que le premier modèle topologique, basé sur des analyses *in silico* et une approche expérimentale, permet de décrire une structure secondaire des hélices ainsi que la position intracellulaire des extrémités N et C terminales (Liu et al., 2005b).

L'hypothèse de l'appartenance de FPN1 à la famille des MFS a été soulevée pour la première fois par l'équipe de Wallace en 2010. A partir du modèle topologique décrit par Liu et al., ils ont modélisé le repliement physique des hélices et comparé cette structure à celles déjà disponibles sur la "protein data bank" (PDB). Une analyse visuelle de cette base de données a révélé une conformité entre la modélisation de FPN1 et la structure de six protéines appartenant à la famille MFS. Parmi les six protéines, la structure du transporteur de glycerol-3-phosphate de la bactérie *E.Coli* a été sélectionné pour produire un premier modèle 3D de FPN1 (Wallace et al., 2010).

Si FPN1 appartient à la famille des MFS, elle doit donc exister sous différentes conformations ("outward-facing", "inward-facing" et "occluded") alternatives afin de prendre en charge et exporter son substrat. En 2013, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, en collaboration avec le Docteur Isabelle Callebaut, a décrit un second modèle tridimensionnel. Dans un premier temps, grâce au logiciel Phyre ("Protein Homology/analogy Recognition Engine"), une recherche d'homologie entre FPN1 et d'autres protéines a permis de mettre en lumière un alignement significatif avec trois protéines MFS issues d'*E.Coli* : EmrD (« Multidrug resistance protein D »), GlpT (« Glycerol-3-phosphate transporter »), déjà décrit, et LacY (« LacY-like proton/sugar symporter »). Malgré une faible identité de séquence (inférieure à 15% pour les trois protéines), ces protéines partagent une structure tridimensionnelle similaire, bien que dans différentes conformations ("inward-facing" pour GlpT et LacY, "occluded" pour EmrD). L'alignement entre FPN1 et EmrD a ensuite été optimisé en utilisant la

méthode “hydrophobic cluster analysis” (Callebaut et al., 1997) permettant de proposer le modèle “occluded” représenté en figure 9 (Le Gac et al., 2013).

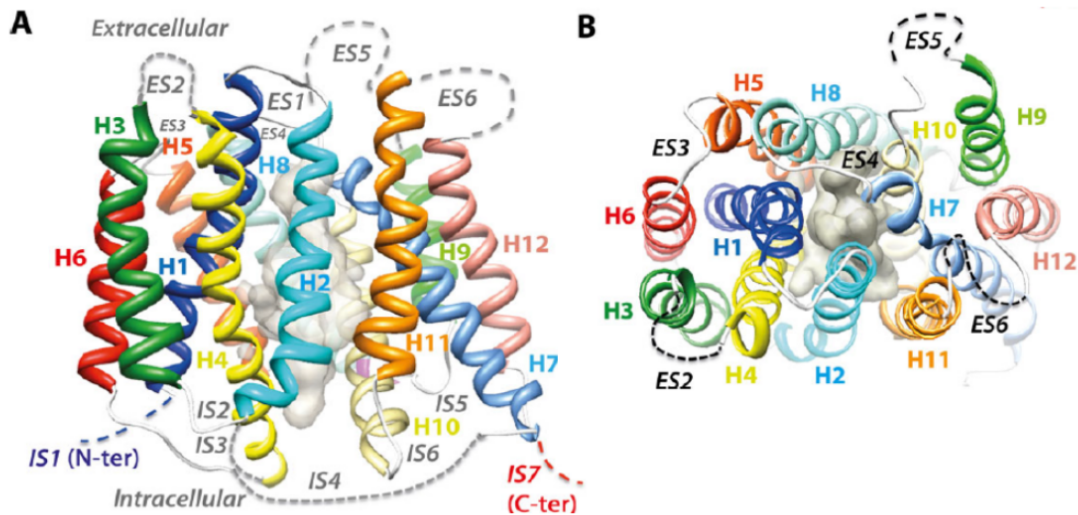


Figure 9: Modèle de la structure 3D de FPN1 dans une conformation “occluded” selon Le Gac et al. 2013. A. Vue latérale et B. vue extracellulaire du modèle construit par homologie à partir de la structure expérimentale du transporteur bactérien EmrD

Une proposition de modèles dans les deux autres conformations, à savoir “outward” et “inward-facing”, a été faite l’année suivante par une équipe italienne. En utilisant le logiciel I-TASSER (« Iterative threading assembly refinement »), ils ont construit ces modèles à partir des structures expérimentales de GlpT et LacY (pour la conformation “inward-facing”) et de FucP (« L-fucose proton symporter » pour la conformation “outward-facing”), tous trois issues d’*E.Coli* (Bonaccorsi di Patti et al., 2014). Ainsi il était possible d’apprécier la dynamique structurale de FPN1 lors de son cycle de transport du fer.

C’est à partir de la cristallisation d’un homologue bactérien de la ferroportine qu’en 2015 l’équipe de Taniguchi a ouvert un nouveau champ dans la compréhension de la structure et de la fonction de FPN1. Cet homologue, issu de la bactérie *Bdellovibrio bacteriovorus* et nommé BbFPN, possède une identité de séquence de 24% et une similarité de 40% avec la ferroportine humaine (Taniguchi et al., 2015). La cristallisation de la protéine dans les conformations “outward” et “inward-facing” a permis de préciser une nouvelle fois l’appartenance à la famille des MFS, avec une particularité cependant : la présence au niveau l’hélice transmembranaire 7 (TM7) d’une petite région non organisée en hélice (“unwound region”), la séparant en deux hélices distinctes : TM7a et TM7b, qui, nous le verrons par la suite, a une importance fonctionnelle.

Une fois que l'appartenance de FPN1 à la famille MFS a été consolidée par ces différentes équipes, plusieurs questions persistaient :

- Où se fixe le substrat?
- A quel type de transporteur MFS appartient FPN1?
- Comment sont orchestrés les changements de conformation et le maintien de la protéine dans l'une ou l'autre de ces conformations?
- Où se fixe l'hepcidine?

Tout d'abord, et pour éviter toute confusion, il est important de préciser que FPN1 est un transporteur de cations divalents, et pas uniquement de fer, bien que l'affinité pour le fer soit plus importante que pour d'autres cations, tel le cobalt (Co^{2+}), le nickel (Ni^{2+}) ou le manganèse (Mn^{2+}) (Madejczyk and Bal-latori, 2012; Mitchell et al., 2014; Taniguchi et al., 2015). Ces propriétés expliquent pourquoi certains auteurs ont utilisé d'autres métaux que le fer pour les modélisations.

Les travaux de Bonaccorsi et al. ont pour la première fois permis de proposer de possibles sites de fixation du fer au sein de FPN1, en plaçant notamment un site extracellulaire et un site membranaire (Bonaccorsi di Patti et al., 2014) (Figure 10). Ces sites de liaison potentiels ont été proposés sur la base de régions contenant des résidus connus pour être impliqués dans la liaison et le transport du fer d'autres protéines et sur la base de mutations du gène *SLC40A1*, codant FPN1, retrouvées chez des patients présentant une surcharge en fer. Des analyses *in vitro* sur des cellules HEK293T ont permis de valider certains résidus critiques, notamment Asp39 et Asp181, bien que le résidu Asp181 ne soit plus aujourd'hui considéré comme impliqué dans un site de fixation du cation divalent (voir plus loin).

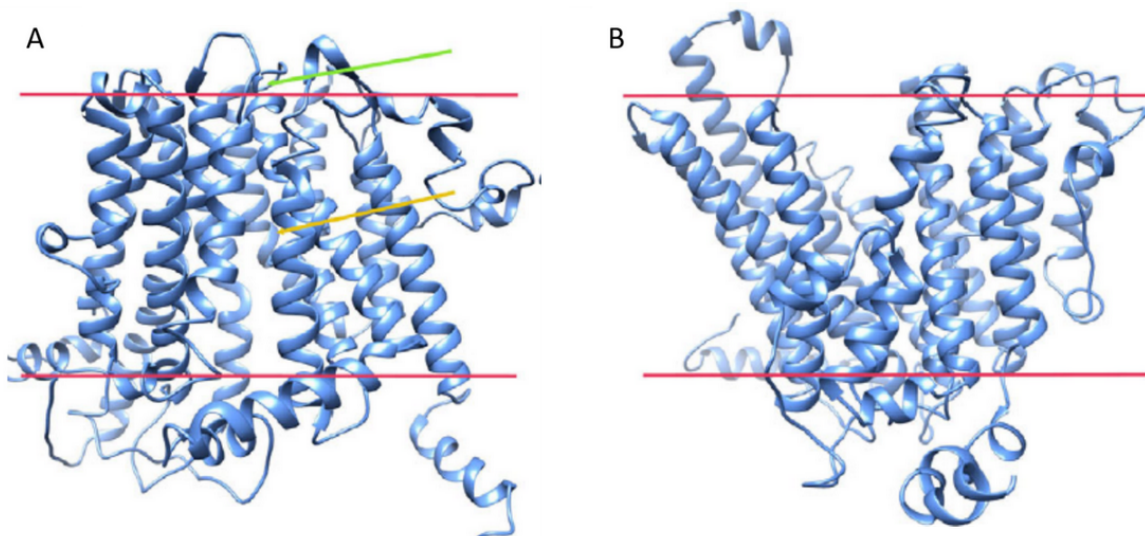


Figure 10: modèle 3D de FPN1 selon Bonaccorsi et al. 2014. Les lignes rouges représentent la membrane plasmique. A. Représentation en conformation “inward-facing”, avec les sites potentiels de fixation du fer extracellulaire (flèche verte) et intramembranaire (flèche jaune) B. Conformation “outward-facing”

Les travaux de Taniguchi et al. ont permis de préciser le premier site de liaison du fer, situé dans le lobe N-terminal. En cristallisant BbFPN en présence de Fe^{2+} et en mesurant l’activité de transport et l’affinité de liaison du fer et du cobalt, ils ont mis en avant l’importance des résidus bactériens Asp24 et Asn196, correspondant respectivement aux résidus Asp39 et Asn212 chez l’homme (Taniguchi et al., 2015).

En 2018, les travaux de Deshpande et al. ajoutent un nouvel acteur dans la fonction d’export du fer de FPN1, le calcium (Ca^{2+}) (Figure 11). Après avoir montré que l’ajout de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire favorisait l’export du fer par BbFPN, ils ont cristallisé l’homologue bactérien en présence de $CaCl_2$ (PDB 4BTX). Cette structure a mis en évidence la présence d’un site de fixation du calcium, situé dans le lobe N-terminal, impliquant les résidus Asp24, Gln84, Asn196 et Glu203, résidus conservés chez l’homme (respectivement Asp39, Gln99, Asn212 et Glu219). Des expériences de titration calorimétrique et d’export du fer ont confirmé le rôle de ces résidus dans la fixation du calcium, résidus qui recouvrent en partie, mais pas totalement, le site de liaison du fer proposé par Taniguchi trois ans plus tôt (Taniguchi et al., 2015; Deshpande et al., 2018).

Puisque le calcium semble occuper en conformation “outward-facing” le lobe N-terminal, Deshpande et al. se sont intéressés à un autre site pour la liaison du fer, cette fois sur le lobe C-terminal. Ils se sont intéressés à l’hélice TM7, qui présente un segment “unwound”, déjà décrit par Taniguchi (Taniguchi et al., 2015). Ce segment formerait une large poche dans une région décrite comme liaison du sub-

strat dans d'autres protéines MFS (Forrest et al., 2011). Ils ont mis en évidence l'importance du résidu His261 dans la coordination du cation bivalent Ni^{2+} , partie du complexe Ni-EDTA provenant du protocole de purification protéique. Ce résidu a pour orthologue l'acide aspartique en position 325 chez l'homme, et la substitution de ce résidu en alanine et histidine affecte de façon claire la capacité de BbFPN à exporter le fer, alors que la substitution en asparagine n'a qu'un effet modeste. L'équipe dans laquelle j'ai réalisé cette thèse a récemment exploré l'importance de cette hélice TM7 et du résidu Asp325, à travers une analyse structurale comparative et des analyses fonctionnelles. Elle a ainsi suggéré que ce résidu aurait une importance pour la fixation du fer mais également dans la stabilité de la protéine à la surface cellulaire, par la formation d'un pont salin avec l'asparagine en position 40 (TM1), située dans le lobe N-terminal, en conformation "inward-facing" (Deshpande et al., 2018; Le Tertre et al., 2021a) (Figure 11).

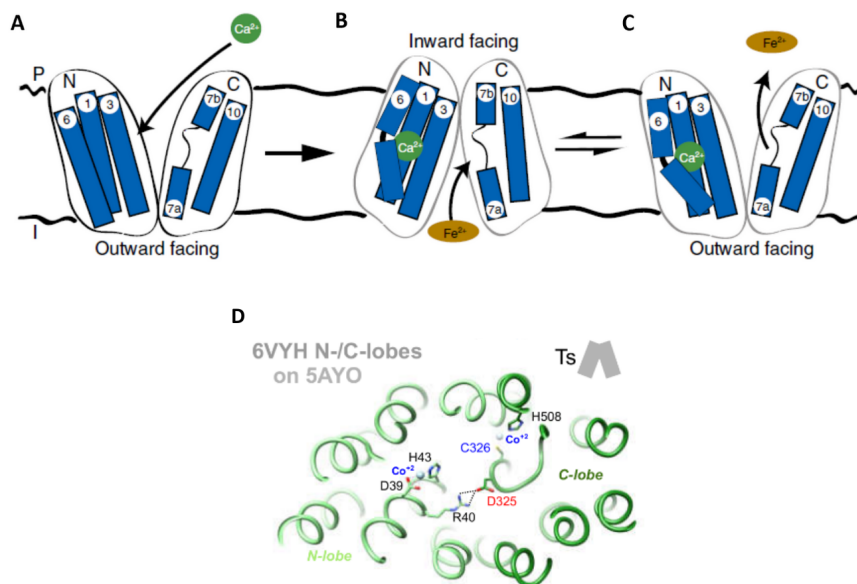


Figure 11: Modèle du mécanisme d'export du fer de la ferroportine, sur la base des premiers éléments proposés par Deshpande et al. en 2018.. **A** Schématisation de la fixation du calcium au niveau du lobe N-terminal de FPN1 en conformation "outward-facing", puis **(B)** basculement en conformation "inward-facing" pour la fixation du fer, avant **(C)** un nouveau basculement en position "outward-facing" pour libération du fer, avec un maintien de la fixation du calcium. **(D)** Prédiction de la modélisation tridimensionnelle de la ferroportine en conformation "inward-facing", à partir de la superposition de la structure tridimensionnelle de la ferroportine de tarsier décrite par Pan et al. 2020, en conformation "outward-facing" (PDB 6VYH) et la conformation "inward-facing" de BbFPN (PDB 5AYO). Cette représentation, tirée de Le Tertre et al. 2021, montre la liaison non covalente entre le résidu Asp325, situé dans le lobe C-terminal, et le résidu Arg40, situé dans le lobe N-terminal.

En 2020, l'équipe de Billesbølle a décrit pour la première fois une structure de la ferroportine humaine par cryo-microscopie électronique ("cryo-EM") (Billesbølle et al., 2020). A partir d'un "screening" de fragments de liaison à l'antigène ("fragment antigen-binding" Fab) connus pour fixer FPN1, ils ont pu guider l'imagerie par microscopie électronique de la ferroportine intégrée dans des nanodisques lipidiques. Un nouveau modèle tridimensionnel est ainsi proposé, représentant les hélices transmembranaires et une partie de la boucle intracellulaire 3, dans plusieurs conditions : sans et avec métal (ici Co^{2+}), sans ou avec hepcidine, en conformation "outward-facing". Ces travaux permettent de regrouper les propositions de Taniguchi et al. et de Deshpande et al., proposant deux sites de fixation du fer, un sur le lobe N-terminal et un autre sur le lobe C-terminal. Du côté C-terminal, le Co^{2+} interagirait directement avec les résidus Cys326 et His507, des hélices TM7b et TM11 respectivement, ainsi qu'avec le résidu Asp325 et Thr320 mais de façon indirecte, médiée par une molécule d'eau. Du côté N-terminal, ils ont mis en évidence une coordination directe du Co^{2+} avec les résidus Asp39 et His43. Ces résultats viennent en partie contredire les conclusions de Deshpande et al., qui attribuaient le rôle de l'acide aspartique en position 39 à la coordination du calcium, et non du fer. Ils ont cependant confirmé que l'ajout de calcium favorisait la fonction d'export de la ferroportine, suggérant que dans le lobe N-terminal, le fer et le calcium puissent coexister. Leurs résultats les ont poussés à se poser la question de l'importance relative de ces deux sites de fixation pour l'export du fer. Les expériences déjà décrites de mutagenèse des résidus Cys326 et His507 ont montré que la substitution de ces résidus n'entraînait pas de défaut d'export du fer (Drakesmith et al., 2005; Mayr et al., 2011), contrairement à la substitution du résidu Asp39. Ils ont ainsi proposé que le site situé en N-terminal était le site primaire de liaison du fer, et le site en C-terminal serait un site régulateur du fer (Figure 12).

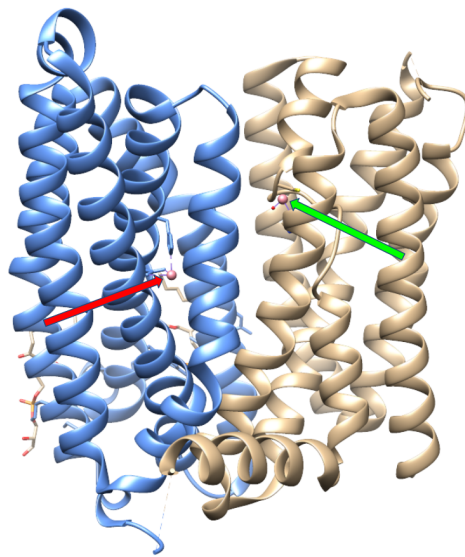


Figure 12: Structure 3D de FPN1 d'après Billesbølle et al., 2020 (PDB 6WBV), avec les deux sites de liaison au fer. Le lobe N-terminal est représenté en bleu et le lobe C-terminal en beige. Les deux sites de fixation sont représentés par les flèches rouges et vertes, pour le site principal et régulateur, respectivement. Visualisation réalisée par le logiciel Chimera (UCSF Chimera).

L'hypothèse de Deshpande et al. concernant le rôle du calcium comme un cofacteur pour la fonction d'export du fer de FPN1 nous amène à nous poser la question du type de transporteur MFS (uniporteur, symporteur, antiporteur) auquel appartient la ferroportine. En 2020, Pan et al. ont décrit un modèle structural de la ferroportine chez le primate tarsier des Philippines, résolu par "cryoEM" dans des nanodisques (Pan et al., 2020). Cette structure, en conformation "outward-facing", superpose avec la structure humaine (Le Tertre et al., 2021a). Leurs résultats confirment la présence de deux sites de fixation, avec les mêmes résidus impliqués dans les hélices TM6 (Cys326) et TM11 (His508, qui correspond à la His507 humaine) pour le site du lobe C-terminal, et l'hélice TM1 (Asp39 et His43) pour le lobe N-terminal, avec également un rôle plus important du site situé en C-terminal.

En analysant la dépendance de la fonction de la ferroportine aux variations de pH à partir de tests de "quenching" de la calcéine dans des liposomes dans laquelle est insérée la ferroportine, Pan et al. ont remarqué que la fixation du substrat était abolie à un pH de 6, et augmentait graduellement en même temps que le pH. Cette observation avait déjà été faite par Taniguchi sur BbFPN (Taniguchi et al., 2015) et par Billesbølle sur la ferroportine humaine (Billesbølle et al., 2020). Par d'autres expériences permettant de suivre les variations de concentration en ions H⁺, ils ont conclu que la ferroportine agissait en antiporteur, faisant circuler un ion Co²⁺ (et par extension le Fe²⁺) et deux ions H⁺ en direction opposée, sans variation électrique. Ils suggèrent également que les sites de fixation des ions H⁺ sont les mêmes que ceux du Fe²⁺. Cette hypothèse permettrait d'expliquer comment la ferroportine ex-

porte les ions Fe^{2+} , chargés positivement, à l'inverse du gradient électrochimique de la membrane plasmique (chargée négativement en intracellulaire et positivement en extracellulaire).

Pourtant, toujours en 2020, une autre équipe a réalisé le même type d'expériences à partir de ferroportine humaine au sein de liposomes, et est arrivée à la proposition inverse, que FPN1 transporte le fer et les ions H^+ dans le même sens, et serait donc un symporteur (Li et al., 2020). Les raisons de ces résultats contradictoires ne sont pas connues et méritent des investigations supplémentaires.

Nous avons donc vu jusqu'ici que FPN1 :

- appartient à la famille des MFS, passant d'une conformation "outward-facing" à "inward-facing" pour exporter le fer
- le caractère symporteur ou antiporteur de FPN1 n'est pas clairement élucidé, mais que le gradient de protons joue un rôle dans la biologie de la protéine
- qu'il existe deux sites de fixation du fer et un site de fixation d'un cofacteur, le calcium.

Il me reste à évoquer un point important de la biologie du transporteur de fer : la dynamique de changements conformationnels et la stabilisation de la protéine dans ses différentes conformations. Comme explicité précédemment pour les protéines MFS, le maintien de ces conformations est permis par des réseaux de résidus, les "gating residues", réalisant des liaisons non covalentes entre eux.

Taniguchi et al. ont posé cette question dès leur description du modèle BbFPN. Plusieurs résidus ont ainsi été pointés pour participer à la formation des "gates" intra et extracellulaires. A partir de tous ces résultats ils ont pu proposer un mécanisme de transport du fer par BbFPN, où la protéine passe successivement d'une conformation "inward-facing" prenant en charge le fer cytoplasmique, stabilisée par la "gate" extracellulaire, à une conformation "outward-facing" libérant le fer et stabilisée par la "gate" intracellulaire, en passant par un état intermédiaire (Figure 13).

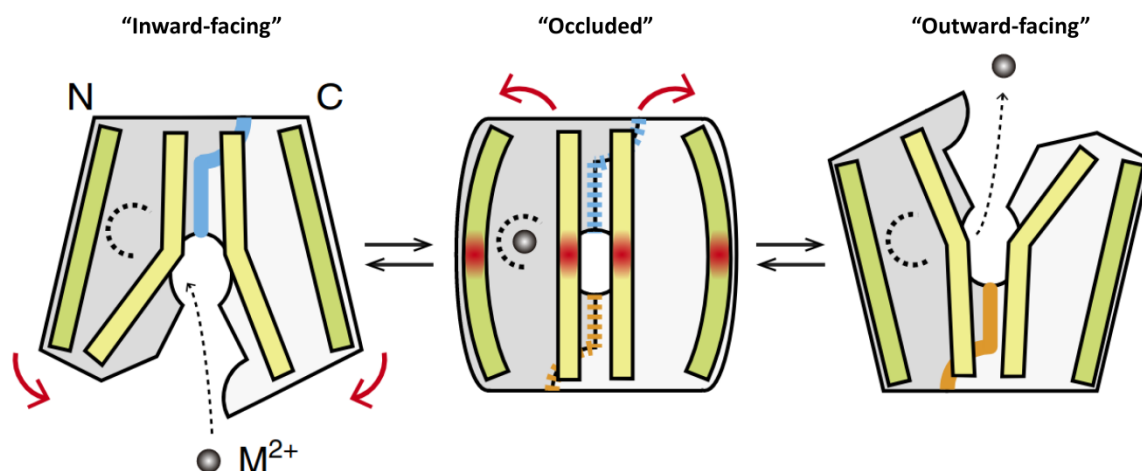


Figure 13: Proposition de modèle de transport de fer de BbFPN par Taniguchi, 2015. Le fer (ici le métal M^{2+}) se fixe dans le lobe N-terminal de BbFPN en conformation “inward-facing” (à gauche), stabilisée par la “gate” extracellulaire (ligne bleue), pour être libéré dans le milieu extracellulaire lorsque BbFPN est en conformation “outward-facing” (à droite) stabilisée par la “gate” intracellulaire (ligne orange). Le passage d’une conformation à l’autre se fait par la distorsion d’hélices, notamment TM3, TM6, TM9, TM11 et TM12 (en rouge).

A partir des deux structures de BbFPN, le Docteur Isabelle Callebaut, grâce à un alignement de BbFPN et de la ferroportine humaine, a construit les modèles tridimensionnels de FPN1 dans les deux conformations. En combinant des analyses structurales et fonctionnelles, le Docteur Isabelle Callebaut et le groupe du Pr Le Gac se sont intéressés à la “gate” intracellulaire. A partir d’une variation (p.Arg178Gln) retrouvée chez plusieurs patients présentant une surcharge en fer, des analyses fonctionnelles d’export du fer dans des cellules HEK293T ont montré que cette substitution affectait l’export du fer sans affecter la présence en membrane de la protéine (Ka et al., 2018). Des analyses structurales ont montré l’importance de ce résidu dans un réseau de liaisons non covalentes pouvant constituer la “gate” intracellulaire. Les travaux qui ont suivi, auxquels j’ai pris part durant ma thèse, ont mis en évidence sept résidus impliqués dans cette “gate”, et des études de dynamique moléculaire ont mis en avant des interactions inter et intra-lobes d’importance cruciale pour la dynamique de la ferroportine dans l’export du fer (Guellec et al., 2019) (Figure 14), hypothèses corroborées par les travaux de Billesbølle et al. sur la structure humaine de FPN1 (Billesbølle et al., 2020). A l’image de la variation p.Arg178Gln, nous avons montré que cette “gate” intracellulaire était le siège de près de la moitié des mutations entraînant une perte de fonction retrouvées chez des patients présentant une surcharge en fer, décrivant ainsi un mécanisme physiopathologique de perte de fonction inédit dans les surcharges en fer liées à la ferroportine.

Il a été décrit chez la souris que le promoteur de *Slc40a1* possède, 7007 pb en amont du point d'initiation de la transcription, une séquence ARE/MARE ("Antioxydant Response Element"/"Maf Recognition Element"). Cet élément est responsable de la régulation par l'hème de l'expression de la ferroportine, en fixant soit le répresseur transcriptionnel Bach1 ("BTB domain and CNC homolog 1") soit l'activateur transcriptionnel Nrf2 ("Nuclear factor erythroid 2-related factor 2"). Dans les macrophages, la présence accrue d'hème lors de l'érythrophagocytose entraîne la libération de Bach1 de la séquence ARE ainsi que dégradation de l'enzyme Keap1 ("Kelch-like ECH-associated protein 1"), permettant l'accumulation de Nrf2 au niveau de la séquence ARE et ainsi la transcription du gène *Slc40a1* (Marro et al., 2010).

Chez l'homme, l'ARN messenger de *SLC40A1* possède une séquence permettant une régulation post transcriptionnelle médiée par le fer lui-même. La présence d'une séquence IRE dans le 5'UTR du gène *SLC40A1* avait déjà été mise en évidence par Abboud et Haile lors de la première description du gène (Abboud et al., 2000), mais les premières preuves fonctionnelles du rôle de la séquence IRE dans la régulation de la ferroportine nous viennent de Lymboussaki et al. (Lymboussaki et al., 2003). A partir de lignées macrophagiques, ils ont mis en évidence qu'en cas de déficit en fer, les IRP se lient aux séquences IRE, entraînant une diminution de la traduction de la ferroportine. A l'inverse, un taux élevé en fer entraîne un changement dans la conformation de la protéine IRP1, l'empêchant de se fixer à l'IRE, et permettant une augmentation de la traduction de FPN1. Il en est de même pour la protéine IRP2 qui sera quant à elle dégradée par le protéasome (Anderson et al., 2012) (Figure 15).

2.3.2. Régulation liée à l'inflammation

Le macrophage, en dehors de son rôle dans la clairance des globules rouges, est un élément clé de l'inflammation et la réponse à un agent pathogène (Navegantes et al., 2017). De façon plus précise, on distingue classiquement deux types de macrophages, issus de deux phénomènes de polarisation : les macrophages de type M1, dits proinflammatoires, dont la polarisation est favorisée par les cytokines de type interféron- γ ou TNF ("tumor necrosis factor") et les macrophages de type M2, qui ont un rôle de modulation de l'inflammation. En cas d'infection par un agent pathogène, le macrophage de type M1 permet, en ayant la capacité de séquestrer le fer, de diminuer la quantité de fer circulante, et ainsi limiter la croissance du pathogène (Gammella et al., 2014; Willemetz et al., 2017). Les mécanismes à l'origine de la répression de la ferroportine en réponse à l'inflammation sont mal connus, mais mettent en jeu diverses cytokines tels les lipopolysaccharides (LPS) Liu et al. (2005a), ou FSL-1 ("Fibroblast-Stimulating Lipopeptide-1") via le récepteur TLR6 ("Toll-Like Receptor 6") (Guida et al., 2015). A l'inverse, il a été montré chez la souris que Nrf2, en activant la transcription de *Fpn1*, permettait de contrebalancer l'effet des LPS et ainsi jouer un rôle anti-inflammatoire (Harada et al., 2011). Des travaux plus récents de Jonczyk et al. ont montré que la charge en cuivre (CuCl_2) des macrophages permettait une induction de l'expression de *Fpn1*, en utilisant une voie indépendante de l'IRE, mais

dépendante de Nrf2 (Jończy et al., 2021).

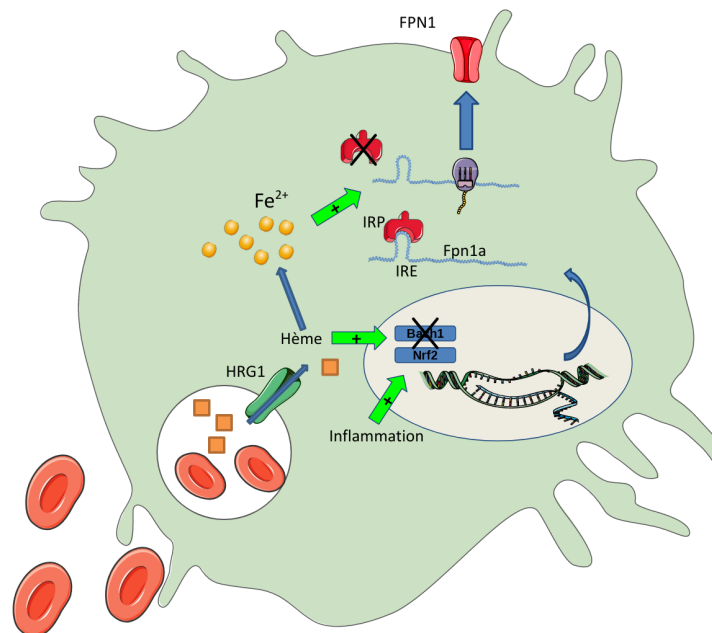


Figure 15: Régulation transcriptionnelle et traductionnelle de la ferroportine dans les macrophages. L'hème et l'inflammation activent la transcription du gène *SLC40A1* par le facteur Nrf2. La présence de fer dans le cytoplasme active la traduction de FPN1 en libérant les protéines IRP de l'élément IRE présent sur l'ARN messager du gène *SLC40A1*.

2.3.3. Particularité de la régulation dans les entérocytes et les érythrocytes

La régulation de l'expression de la ferroportine dans les entérocytes est distincte de celle des macrophages, de par leur rôle différent dans la régulation du fer. Dans les entérocytes, la production de ferroportine est fortement régulée par le fer et l'hypoxie, le but étant de favoriser l'absorption du fer alimentaire en cas de déficit en fer. Ce processus passe par l'action de facteurs de transcription HIF ("Hypoxia-Inducible Factors"). Plus précisément, l'hétérodimère HIF est constitué d'une sous-unité régulatrice α (HIF-1, 2 ou 3) et β . La sous-unité α est, en présence d'oxygène, hydroxylée par la famille des prolylhydroxylases (PHD) et ainsi dégradée par la voie ubiquitine-protéasome *via* l'interaction avec un suppresseur de tumeurs, Von Hippel-Lindau (VHL) (Semenza, 2012). En cas d'hypoxie le facteur de transcription HIF est protégé de cette dégradation. De la même manière, les enzymes PHD sont sensibles au fer et un déficit en fer permet une stabilisation de la sous-unité α . Les travaux de Shah et al. ont montré l'importance des facteurs HIF, plus précisément le facteur HIF2 α dans l'import du fer *via* une activation de DCYTB et DMT1 (Mastrogiannaki et al., 2009; Shah et al., 2009). Pour ce qui concerne la ferroportine, on retrouve dans la séquence promotrice des éléments HRE ("HIF

Response Element”), cibles de HIF2 α . Des analyses d’immunoprécipitation de la chromatine ont confirmé l’interaction entre ce facteur et la région promotrice de *Slc40a1*, et la suppression de Hif2 α au niveau intestinal chez la souris abolit l’activation de la transcription de la ferroportine médiée par un déficit en fer (Mastrogiannaki et al., 2009; Taylor et al., 2011).

Qu’en est-il du rôle des protéines IRP dans les entérocytes? On a vu que dans les macrophages, un déficit en fer a pour conséquence une limitation de la traduction de la ferroportine par la fixation de protéines IRP. La présence d’une séquence IRE dans le 5’UTR de HIF2 α (Sanchez et al., 2007) évoque la possibilité d’une régulation de ce facteur de transcription par les protéines IRP. Bien que cette régulation ait été montrée (Anderson et al., 2013), elle serait antagoniste de la régulation par les PHD, et pourrait venir atténuer l’effet de l’hypoxie sur la transcription et la traduction de la ferroportine (Renassia and Peyssonnaud, 2019). Pour ce qui est de la régulation par les protéines IRP de la traduction de la ferroportine, c’est en 2009 que l’équipe de Zhang a mis en évidence la présence d’un transcrit alternatif de la ferroportine, FPN1B, à hauteur de 20%. Ce transcrit a la particularité de ne pas présenter la séquence IRE et donc ne pas être régulé par les protéines IRP, permettant le maintien d’un certain niveau d’expression de ferroportine quelle que soit la quantité de fer intracellulaire (Zhang et al., 2009).

Un autre type cellulaire est connu pour exprimer ce transcrit alternatif, il s’agit des érythroblastes dans la moelle osseuse. La proportion de ce transcrit est d’ailleurs majoritaire aux premiers stades de l’érythropoïèse et tend à diminuer lors de la différenciation (Cianetti et al., 2005; Zhang et al., 2009). Il permettrait aux précurseurs d’échapper à la régulation par les IRP et ainsi exporter du fer aux cellules environnantes durant l’étape de prolifération cellulaire, tout en permettant d’éviter la toxicité du fer libre dans la cellule. Puis, lorsque la cellule commence à produire l’hémoglobine, le transcrit FPN1A, sensible à la régulation par les IRP, reprend le dessus afin d’équilibrer le pool de fer, constituant l’hème (Zhang et al., 2018a).

2.3.4. Régulation de l’expression de FPN1 par des micro-ARNs

Un autre mode de régulation de l’expression de FPN1 a été décrit, cette fois-ci lié à des micro-ARN. Les travaux de Sangokoya et al. ont montré le rôle du miR-485-3p dans la régulation de l’expression de ferroportine en ciblant une séquence dans le 3’UTR du gène. Ce micro-ARN étant sensible à la concentration en fer, il permet une régulation supplémentaire de la ferroportine en réponse au taux de fer (Sangokoya et al., 2013). D’autres micro-ARNs ont été décrits comme pouvant influencer l’expression de FPN1 dans d’autres types cellulaires et notamment les cellules cancéreuses, agissant ainsi sur les réserves en fer permettant la prolifération cellulaire (Babu and Muckenthaler, 2016; Jiang et al., 2019; Wu et al., 2020). De façon contradictoire, le miRNA-302a-3p a récemment été décrit comme entraînant la mort cellulaire dans le cancer pulmonaire non à petites cellules, en inhibant FPN1, induisant la ferroptose (Wei et al., 2021).

Le tableau suivant permet de résumer les principaux mécanismes régulant l'expression de la ferroportine, selon le type cellulaire (Tableau 1).

Mécanisme	Référence	Mode	Type cellulaire	Effet sur FPN1
IRE-IRP	Lymboussaki et al. 2003	post-transcriptionnel	macrophage	augmentation du Fe intracellulaire = augmentation de FPN1
Hème, <i>via</i> BACH et Nrf2	Marro et al. 2010	transcriptionnel	macrophage	augmentation de l'hème intracellulaire = augmentation de FPN1
miR-485-3p	Sangokoya et al. 2013	post-transcriptionnel	multiples	diminution du Fe intracellulaire = diminution de FPN1
Inflammation et TLR	Liu et al. 2005, Guida et al. 2015	transcriptionnel	macrophage	inflammation = diminution de FPN1
Inflammation et Nrf2	Harada et al. 2011	transcriptionnel	macrophage	effet anti-inflammatoire = augmentation de FPN1
HIF2alpha	Mastrogiannaki et al. 2009	transcriptionnel	entérocyte	diminution du Fe intracellulaire = augmentation de FPN1
miR-20a, miR-20b, miR-194-5p, miR-302a-3p	Babu et al. 2016, Jiang et al. 2019, Wu et al. 2020, Wei et al. 2021	post-transcriptionnel	entérocyte, poumon, ovaire	augmentation du miRNA = diminution de FPN1

Tableau 1 : Mécanismes de régulation de la ferroportine (FPN1), indépendants de l'hepcidine (*inspiré*)

de Nemeth et Ganz, 2021).

2.4. Le deuxième acteur de la régulation systémique du fer : l'hepcidine

En dehors de la régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle de la ferroportine, sa régulation post-traductionnelle est majoritairement assurée par l'hepcidine. Ce petit peptide, majoritairement synthétisé par le foie, avait, à l'origine, été décrit comme une molécule antimicrobienne par deux équipes, d'où son nom, "hep" du fait de la production hépatique, et "-cidine" pour ses propriétés bactéricides. Krause et al. ont isolé un peptide de 25 acides aminés riche en cystéines, par spectrométrie de masse à partir de sang, qui s'est avéré avoir un effet sur la croissance de certaines bactéries (Krause et al., 2000). Dans le même temps, Park et al. décrivent le même peptide à partir d'urine, et montre que l'hepcidine présente également une activité antifongique (Park et al., 2001). Ce n'est que peu de temps après que deux équipes françaises relient l'hepcidine au métabolisme du fer. En comparant les foies de souris contrôles et présentant une surcharge en fer par une stratégie de banques soustractives d'ARN, Pigeon et al. ont révélé que l'hepcidine était surexprimée chez les souris présentant une surcharge en fer (Pigeon et al., 2001). A partir de souris KO pour le gène *Usp2*, qui se trouve être localisée juste en amont du gène codant l'hepcidine, Nicolas et al. ont mis en évidence une surcharge en fer liée à une diminution de l'expression de l'hepcidine (Nicolas et al., 2001).

2.4.1. Le gène *HAMP* et la structure de l'hepcidine

L'hepcidine est codée par le gène *HAMP* situé sur le chromosome 19 (en 19q13.1). Il est composé de 3 exons et est transcrit en un ARN messager de 406 nucléotides (transcrit NM_021175.4 ou LRG_791), qui code une protéine de 84 acides aminés. Ce pré-propeptide va subir deux clivages successifs : un premier clivage permet de retirer le peptide signal (acides aminés 1 à 25) (Park et al., 2001), et un second clivage retire les acides aminés 26 à 59 par l'action d'une convertase, la furine, reconnaissant une séquence consensus -RX(K/R)R- (ici RRRRR) autour de l'arginine en position 59 (Wise et al., 1990; Loo et al., 1997; Valore and Ganz, 2008). Il en résulte un peptide actif de 25 acides aminés, l'hepcidine-25. A noter que lors de la découverte de l'hepcidine par l'équipe de Park, deux autres isoformes ont été identifiées, de 20 et 22 acides aminés. Une troisième isoforme a également été décrite, de 24 acides aminés (Laarakkers et al., 2013). Ces trois isoformes, minoritaires, seraient des produits de dégradation de la forme active et certaines garderaient un rôle antimicrobien (Addo et al., 2016).

L'hepcidine-25 contient huit résidus cystéines, très conservés. C'est d'ailleurs cette particularité qui a permis son identification (Park et al., 2001). Ces cystéines participent à la structure de l'hepcidine, en formant quatre ponts disulfures, donnant une structure en "épingle à cheveux" (Figure 16) (Clark et al., 2011).

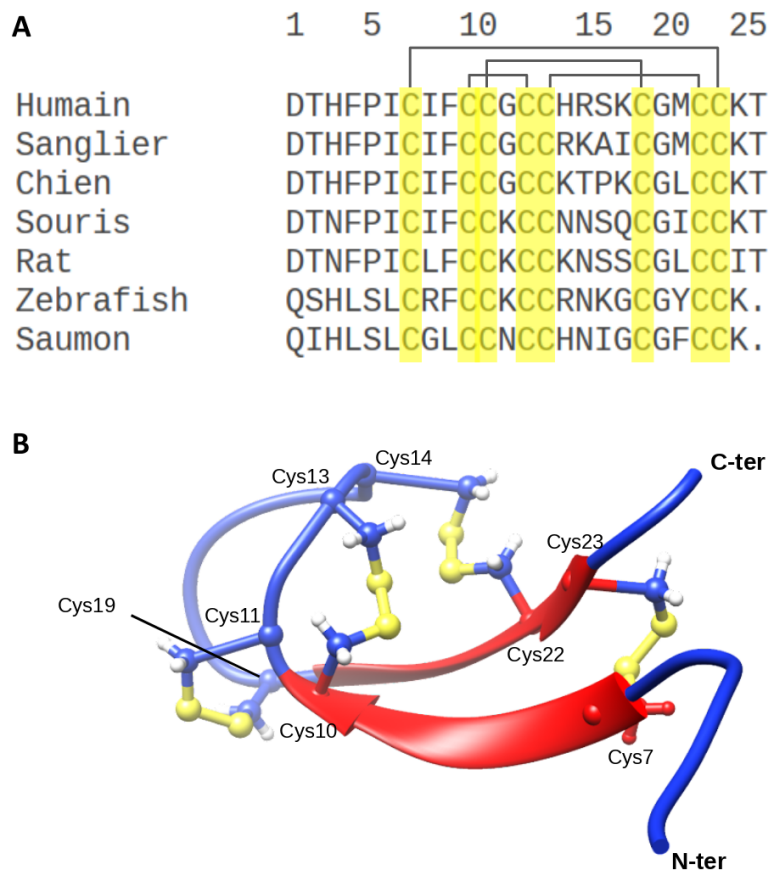


Figure 16: Alignement interspèces de la séquence primaire de l'hepcidine et structure 3D de la protéine. **A.** Alignement des séquences protéiques de l'hepcidine humaine et divers vertébrés (NCBI Blast). Les cystéines sont représentées en jaune et les ponts disulfures par des liaisons entre ces résidus. **B.** Structure tridimensionnelle de l'hepcidine. Les ponts disulfures sont représentés en jaune (UCSF Chimera, structure PDB 2KEF) (*inspiré de Clark et al. 2011*).

2.4.2. L'hepcidine, régulateur de la ferroportine

Il aura fallu trois ans entre la découverte de l'hepcidine et l'identification de sa cible : la ferroportine. En 2004, l'équipe de Nemeth a mis en évidence l'interaction hepcidine-ferroportine en utilisant des cellules HEK293T exprimant de façon stable et inducible la ferroportine murine couplée à la GFP. Ils ont pu mettre en évidence qu'en présence d'hepcidine, la ferroportine était internalisée pour être dégradée dans le lysosome. L'utilisation d'une hepcidine radiomarquée a permis de mettre en évidence une liaison directe entre l'hepcidine et la ferroportine (Nemeth et al., 2004b). De là, il restait à définir les mécanismes exacts de cette liaison hepcidine-ferroportine et des étapes de la dégradation du transporteur de fer.

Du côté de l'hepcidine tout d'abord, les travaux de Nemeth et al. ont permis, en synthétisant des dérivés de l'hepcidine portant des délétions de plusieurs résidus, de montrer que l'extrémité N-terminale de l'hepcidine était nécessaire à sa liaison avec la ferroportine (Nemeth et al., 2006). Plus précisément, la délétion des cinq acides aminés situés à l'extrémité N-terminale entraînait une perte complète de l'activité de l'hepcidine, alors que la délétion de résidus en C-terminal ne montre pas d'effet. La suppression individuelle de ponts disulfure n'a pas d'effet *in vitro* mais diminue l'activité *in vivo*, potentiellement du fait d'un manque de stabilité dans la circulation. L'importance des acides aminés N-terminaux a été confirmée par les travaux de Clark et al. qui ont, en substituant les différents résidus en N-terminal de l'hepcidine, montré l'importance d'interactions hydrophobes entre l'hepcidine et la ferroportine (Clark et al., 2011). La même équipe a tenté de développer une forme minimale de l'hepcidine active et ont montré, entre autres, que les neuf premiers résidus suffisaient à mimer l'activité de l'hepcidine. Cette mini-hepcidine contient uniquement une cystéine, dont la substitution (p.Cys7Ser) ou le blocage du groupe thiol entraîne une diminution drastique de la fonction de dégradation de la ferroportine (Preza et al., 2011).

Du côté de la ferroportine, la même équipe a publié en 2009 une étude portant sur le site de fixation de l'hepcidine. A partir d'une mutation retrouvée chez des patients présentant une surcharge en fer (dont je parlerai par la suite), la substitution d'une cystéine en sérine en position 326 de la ferroportine, ils ont mis en évidence le rôle critique de ce résidu dans l'interaction avec la ferroportine. La substitution p.Cys326Ser (de même que la p.Cys326Thr) entraîne une abolition totale de la liaison entre la ferroportine et son régulateur (Fernandes et al., 2009). Ces résultats font écho à d'autres travaux mettant en évidence que la cystéine en position 326 présente un thiol libre à la surface cellulaire (Liu et al., 2005b). Fernandes et al. ont donc évalué le rôle des thiols dans la liaison hepcidine-ferroportine, et ont montré que la modification chimique des thiols entraînait une altération de cette interaction (Fernandes et al., 2009). Au final, ces travaux ont mis en lumière que la cystéine 326 de la ferroportine a un rôle critique dans l'interaction avec la "cage disulfide" de l'hepcidine et que l'interaction thiol-disulfide est primordiale pour la stabilisation de la liaison entre ces deux partenaires (Preza et al., 2011). Les travaux suivants d'Aschemeyer et al. ont étendu ce site d'interaction, à partir de l'étude d'autres mutations retrouvées chez des patients avec une surcharge en fer (Aschemeyer et al., 2018). Ainsi, les résidus du lobe N-terminal Asn144, Val72, et les résidus du lobe C-terminal Tyr501, Asp504 et Phe508 joueraient un rôle dans la liaison hepcidine-ferroportine (Figure 17). Ces résultats sont cependant en partie discordants avec d'autres études, comme celle de Fernandes et al., où la mutation du résidu Asn144 n'altère pas l'interaction hepcidine-ferroportine (Fernandes et al., 2009).

La description en 2020 de la structure humaine de FPN1 en présence d'hepcidine par l'équipe de Billesbølle a permis de mieux apprécier la dynamique de l'interaction entre l'hepcidine et la ferroportine, et le rôle du fer dans cette dyade (Billesbølle et al., 2020). En effet, ils ont montré que la présence de fer favorisait la liaison hepcidine-ferroportine. De plus, les analyses structurales montrent que certains résidus connus pour être importants pour la liaison avec l'hepcidine, notamment Cys326 et His507, in-

teragissent avec le fer. Enfin, le résidu Asp325, bien décrit plus haut comme étant important pour la coordination du métal et la “gate” extracellulaire en conformation “inward-facing” (Deshpande et al., 2018; Le Tertre et al., 2021a), joue un rôle dans la liaison avec l’hepcidine. Au niveau expérimental, la substitution de ce résidu par une asparagine abolit la liaison hepcidine-ferroportine. Les expériences de dynamique moléculaire suggèrent que l’intégration de Fe^{2+} abolit les mouvements de la chaîne latérale du résidu Asp325, rigidifiant le segment “unwound” entre les hélices TM7a et TM7b dans une conformation favorisant la liaison avec l’hepcidine (Billesbølle et al., 2020). Les travaux de Pan et al. sont venus appuyer l’hypothèse de l’importance du fer dans la liaison avec l’hepcidine (Pan et al., 2020).

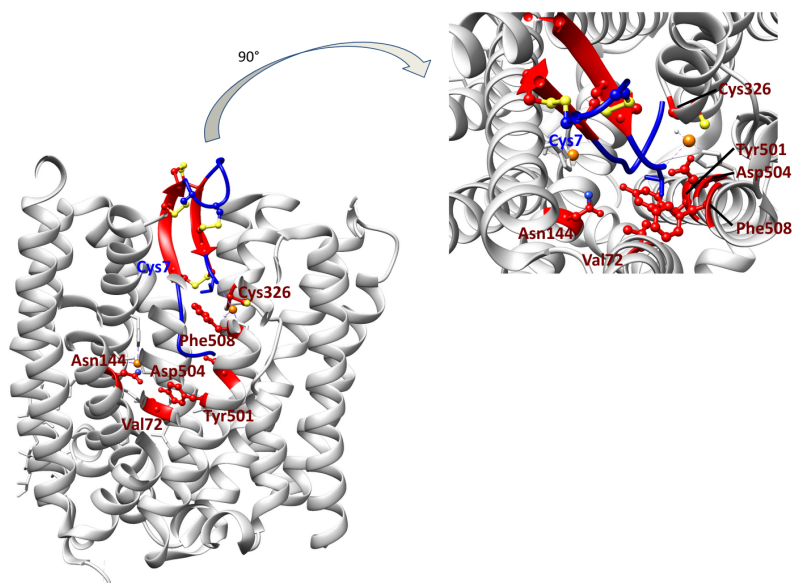


Figure 17: Représentation tridimensionnelle de FPN1 en présence d’hepcidine et résidus impliqués dans la liaison hepcidine-FPN1 selon Aschemeyer et al., sur le modèle structural proposé par Billesbølle et al. 2020 (PDB 6WBV). Les résidus Val72 et Asn144 situés dans le lobe N-terminal, ainsi que les résidus Cys326, Tyr501, Asp504, et Phe508 du lobe C-terminal seraient décrits pour être impliqués dans la liaison avec l’hepcidine (en bleu et rouge). Visualisation que j’ai réalisée à partir du logiciel Chimera (UCSF Chimera).

Une fois l’hepcidine fixée à la ferroportine, nous avons vu que la ferroportine était dégradée dans le lysosome (Nemeth et al., 2004b). Toutefois, le signal d’internalisation et de dégradation de la ferroportine n’était pas identifié. Il a fallu attendre 2012 et les travaux de Ross et al. pour comprendre que le signal d’internalisation de la ferroportine passait par l’ubiquitination de lysines intracellulaires (Ross et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par Qiao et al., qui ont mis en évidence que la substitution de lysines présentes au niveau de la large boucle intracellulaire entre les lobes N et C-terminaux (Lys229,

Lys240, Lys247, Lys258) empêchait l'ubiquitination de la ferroportine en présence d'hepcidine, sans empêcher l'interaction entre les deux partenaires (Qiao et al., 2012).

Les enzymes successives impliquées dans le processus d'ubiquitination ne sont pas clairement définies mais des travaux récents de Traeger et al. ont montré l'effet d'UBA6 ("Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 6") comme enzyme E1 "activatrice" et d'Ube2E2 ("Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 E2"), Ube2J2 et Ube2R2 comme enzymes E2 "de conjugaison" (Traeger et al., 2021). Pour ce qui est de l'enzyme E3, spécifique au substrat, ils ont montré l'effet de NDFIP1 ("Nedd4 Family Interacting Protein 1"), protéine dont le rôle est d'activer les enzymes E3 de la famille NEDD4 ("Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4"). Dans le même temps, l'équipe de Jiang a suggéré que l'enzyme RNF217 ("Ring Finger Protein 217") jouerait le rôle d'enzyme E3 (Jiang et al., 2021). Enfin, l'équipe de Tang a décrit récemment le rôle possible d'USP35 en tant que dé-ubiquitinase dans les cellules cancéreuses de poumon, interagissant directement avec FPN1 et permettant sa stabilité. L'inhibition d'USP35 ("Ubiquitin Specific Peptidase 35") favoriserait la ferroptose, inhiberait la progression tumorale et sensibiliserait les cellules cancéreuses aux chimiothérapies (Tang et al., 2021b) (Figure 18). À noter qu'en plus du lysosome, Jiang et al. ont récemment proposé que le protéasome pourrait également jouer un rôle dans la dégradation de FPN1 (Jiang et al., 2021).

La fixation de l'hepcidine serait donc à l'origine d'une ubiquitination et dégradation de FPN1. Pourtant, certains travaux ont montré que la fixation de l'hepcidine pouvait empêcher la ferroportine d'exporter le fer sans pour autant l'internaliser. En effet, Aschemeyer et al. ont, à l'instar des travaux de Qiao, substitué plusieurs lysines intracellulaires de la ferroportine. Ils ont de la même manière montré une moindre ubiquitination de la ferroportine, mais malgré tout un maintien de l'activité de l'hepcidine, à des concentrations élevées, sur l'inhibition de l'export du fer de la ferroportine (Aschemeyer et al., 2018). Ils ont également mis en évidence, en reprenant les travaux de Zhang et al. sur le paludisme, que les érythrocytes, qui expriment la ferroportine mais qui sont dépourvus de machinerie d'endocytose, sont sensibles à l'hepcidine, cette dernière agissant donc en inhibant l'export du fer sans dégrader la ferroportine (Aschemeyer et al., 2018; Zhang et al., 2018b). Un éclairage sur cette inhibition a été proposé par Pan et al., suggérant que la fixation de l'hepcidine sur la ferroportine pouvait à la fois entraîner la dégradation de la ferroportine et altérer la liaison du Fe^{2+} au niveau du site de fixation du lobe C-terminal, du fait de la proximité de ce site avec le site de liaison à l'hepcidine et du blocage des changements de conformations nécessaires à l'export du fer (Pan et al., 2020).

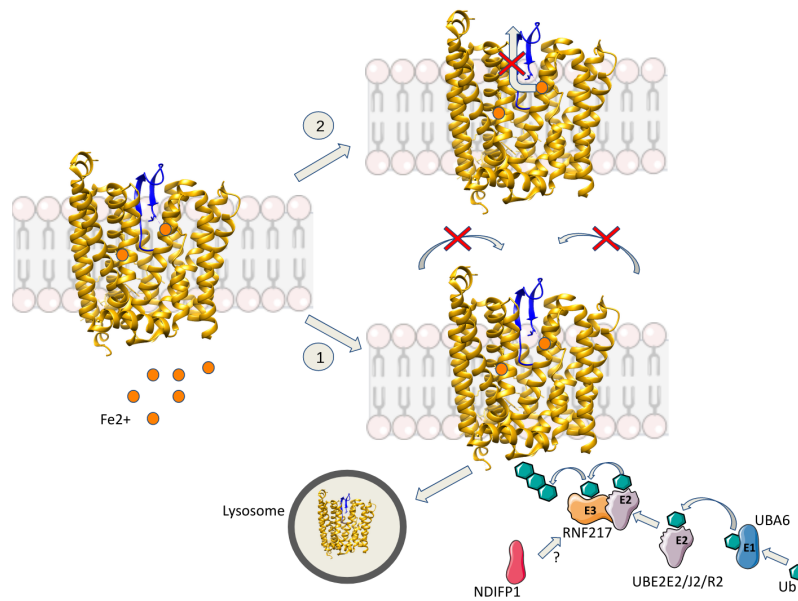


Figure 18: Mécanismes d'action de l'hepcidine sur la fonction et la dégradation de la ferroportine. La fixation de l'hepcidine entraîne (1) l'ubiquitination de la ferroportine. L'ubiquitine est prise en charge successivement par UBA6, UBE2E2/J2/R2 et RNF217 pour y être fixée aux lysines intracellulaires. Cette fixation entraîne l'internalisation et la dégradation du transporteur dans le lysosome. (2) La fixation de l'hepcidine peut également être à l'origine d'un blocage de l'export du fer sans dégradation de la ferroportine. Visualisation réalisée à partir de la structure 3D de la ferroportine en présence d'hepcidine (PDB 6WBV) par le logiciel Chimera (UCSF Chimera).

Le rôle de l'hepcidine dans le métabolisme du fer ne s'arrête pas à la régulation de la ferroportine. Au niveau de l'entérocyte, le fer régule l'expression de la ferroportine au pôle basolatéral de la cellule, mais également celle de DMT1, l'importateur de fer depuis la lumière duodénale (Gunshin et al., 2001). A ce jour, trois mécanismes d'action sont proposés pour expliquer la régulation de DMT1 par le fer et l'hepcidine. Premièrement, un mécanisme de régulation transcriptionnelle passe par HIF2 α qui, une fois hydroxylé par les enzymes PHD en présence de fer, sera dégradé entraînant une répression de l'expression de DMT1 (Gunshin et al., 2001). Deuxièmement, au niveau post transcriptionnel la séquence IRE située dans le 3'UTR de l'ARN messager permet une régulation négative en présence de fer (Gunshin et al., 2001). Enfin, au niveau post-traductionnel, les travaux de Brasse-Lagnel et al. ont montré que, dans des segments de duodénum de souris et des lignées cellulaires humaines intestinales (Caco-2) polarisées, l'hepcidine entraînait l'ubiquitination et la dégradation de DMT1 par le protéasome (Brasse-Lagnel et al., 2011).

2.4.3. La régulation de la synthèse hépatique d'hepcidine

De par son rôle primordial dans l'homéostasie systémique du fer, l'expression de l'hepcidine est régulée de manière très fine. Les paragraphes suivants vont présenter les différentes voies de régulation de l'hepcidine, médiée par le fer, l'inflammation ou encore l'érythropoïèse (Figure 19).

1. Régulation par le fer

Comme beaucoup d'hormones, l'hepcidine est régulée par la substance qu'elle contrôle. Ainsi, le fer joue un rôle dans la régulation de la production d'hepcidine, au travers de l'expression du gène *HAMP*, par l'hépatocyte.

Au niveau moléculaire, l'expression du gène *HAMP* passe entre autres par la voie SMAD ("Son of Mother Against Decapentablegic"), elle-même sous la dépendance de l'activation de BMPRs ("Bone Morphogenic Protein Receptors") par les BMPs ("Bone Morphogenic Protein") (Babitt et al., 2006; Xia et al., 2008). Cette voie de régulation, historiquement liée à la formation des os et du cartilage (Nishitoh et al., 1996), implique dans le foie un co-récepteur, l'hémojuvéline (HJV) (Babitt et al., 2006). Il existe plusieurs BMPs, et même si la principale protéine impliquée dans la synthèse d'hepcidine est BMP6, le rôle de BMP2 a également été montré (Xia et al., 2008; Zhang et al., 2011). Bien que l'interaction entre HJV et les différents types de BMP ait été montrée dans les cellules hépatiques (Xia et al., 2008), Latour et al. ont montré que la suppression de BMP6 aggravait la surcharge en fer de souris déficientes en HJV, suggérant que BMP6 puisse agir sans l'aide d'HJV (Latour et al., 2017).

Les BMPs vont activer la formation des complexes de BMPRs. Ces complexes sont des tétramères de récepteurs sérine/thréonine kinase, formés ici de deux sous-unités de type I (Alk2 et Alk3) et deux sous-unités de type II (ACTRII et BMPRII) (Xia et al., 2008; Steinbicker et al., 2011). Bien que plusieurs BMPs peuvent se fixer à un même récepteur, il a été proposé que BMP6 a une affinité plus grande avec Alk2 alors que BMP2 se fixe principalement à Alk3 (Silvestri et al., 2019). Une fois formé, le complexe permet la phosphorylation des protéines SMAD dont le but est d'activer la transcription de gènes (Massagué et al., 2005). Les protéines cytoplasmiques SMAD1, 5 et 8 vont ainsi être phosphorylées, s'associer à SMAD4 et être transloqués dans le noyau pour induire la transcription du gène *HAMP* qui présente au niveau de son promoteur des séquences BMP-RE ("Bone Morphogenetic Protein-Responsive Elements") (Babitt et al., 2006; Casanovas et al., 2009).

Le fer agit sur cette voie par divers mécanismes. Au niveau intracellulaire, l'excès de fer va entraîner, en activant la voie Nrf2, la synthèse de Bmp6 par les cellules épithéliales des sinus hépatiques (Canali et al., 2017; Lim et al., 2019) et la formation des complexes ALK2/BMPRII au niveau des hépatocytes, augmentant la synthèse d'hepcidine. A l'inverse, l'excès de fer libre (NTBI), dans les cellules hépatocytaires cette fois, entraîne par la production de ROS une inhibition de la voie BMP/SMAD et une diminution de la production d'hepcidine (Gehrke et al., 2003; Charlebois and Pantopoulos, 2021). Ces résultats ont été obtenus *in vitro* et l'implication biologique *in vivo* reste à prouver.

Le fer extracellulaire a également un effet sur la production d'hepcidine. La voie de signalisation BMP/SMAD est toujours au coeur de cette régulation, mais sans BMP6 (Corradini et al., 2011; Shanmugam and Cherayil, 2013). Les récepteurs à la transferrine, TfR1 et TfR2, ainsi que la protéine HFE jouent les rôles de senseur du fer extracellulaire et d'activateurs de la voie BMP/SMAD. L'hypothèse aujourd'hui est que, en dehors de surcharge en fer plasmatique, HFE est liée à TfR1 au niveau du site de fixation de la transferrine. Une augmentation de fer plasmatique, lié à la transferrine, va entraîner une compétition entre HFE et l'holotransferrine, cette dernière se fixant à TfR1 va favoriser l'interaction HFE/TfR2 avec le couple BMPRII/Alk3, entraînant alors la cascade BMP/SMAD induisant l'expression du gène *HAMP* (Gao et al., 2009; D'Alessio et al., 2012; Wu et al., 2014; Traeger et al., 2018).

Dans le cas d'un déficit en fer, un rétrocontrôle permet la limitation de la synthèse d'hepcidine. Le gène *TMPRSS6* code une sérine protéase membranaire, la matriptase-2 (MT2). MT2 a pour but d'inhiber la voie BMP/SMAD en clivant l'HJV membranaire et ainsi inhibant la voie BMP/SMAD (Silvestri et al., 2008b; Silvestri et al., 2008a).

2. Régulation par l'Inflammation

Comme nous l'avons vu plus tôt, l'hepcidine a été au départ décrite comme une protéine aux propriétés bactéricides, ce qui lui a d'ailleurs valu son nom. La réponse de l'hépatocyte à la présence d'un agent pathogène implique plusieurs voies dont les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés, mais dont le but final serait la réduction de la quantité de fer circulante, élément primordial à la survie des pathogènes.

Lors de l'inflammation, l'IL-6 est libérée par les cellules inflammatoires. Cette cytokine va venir se fixer à son récepteur à la surface de l'hépatocyte, entraînant la formation d'un complexe avec la protéine GP130 ("Glycoprotein 130"). Ce complexe active la protéine JAK2 entraînant la phosphorylation de STAT3 (Nemeth et al., 2004a; Pietrangelo et al., 2007). Ce phénomène induit sa dimérisation et sa translocation dans le noyau. La fixation de STAT3 sur le « STAT3-responsive element » situé sur le promoteur de *HAMP* va induire la production d'hepcidine (Nemeth et al., 2004a; Wrighting and Andrews, 2006). L'IL-6 jouerait également un rôle dans l'expression de gène *HAMP* par la voie BMP/SMAD, comme le suggèrent les travaux de Mayeur et al., qui ont montré que chez les souris déficientes en Alk3, l'IL-6, bien que capable d'induire la phosphorylation de STAT3, n'induisait pas une augmentation significative de la production d'hepcidine (Mayeur et al., 2014).

Cette même voie BMP/SMAD est également impliquée dans la production d'hepcidine en contexte inflammatoire par le biais d'autres molécules pro-inflammatoire : l'activine B qui active les récepteurs BMP de type 1, et l'interleukine 1- β qui induit la production de BMP2 (Besson-Fournier et al., 2012; Shanmugam et al., 2015).

Enfin, la présence de lipopolysaccharides (LPS) sur les bactéries Gram négatives activerait la production d'hepcidine en se fixant au récepteur TLR4, activant la voie MyD88-JNK-c-Jun (Lee et al., 2017).

Cette même voie serait également impliquée dans la réponse de l'hépatocyte à la sécrétion de mélatonine, à l'origine du rythme circadien d'expression d'hepcidine (Park et al., 2022).

3. Régulation par l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus consommant le plus de fer chez les vertébrés, il est donc indispensable de coordonner la disponibilité du fer en cas de besoin accru en fer au niveau de la moelle osseuse, en cas notamment d'hypoxie ou d'anémie. Dans ces situations, le rein sécrète une hormone, l'érythropoïétine (EPO), qui a pour but de stimuler l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. Dès la description de l'hepcidine en 2002, Nicolas et al. ont montré que l'EPO était capable de réprimer la production d'hepcidine (Nicolas et al., 2002), bien que ce mécanisme ait été décrit comme indirect (Pak et al., 2006). C'est en 2014 que le lien entre l'hepcidine et l'EPO a été montré, par la description d'un nouvel acteur, l'érythroferrone (ERFE) (Kautz et al., 2014). La production d'EPO par le rein va entraîner la production d'ERFE par les érythroblastes par la voie JAK/STAT5. L'ERFE va ensuite inhiber l'action de BMP2 et BMP6, en séquestrant les hétérodimères BMP2/BMP6 (Arezes et al., 2018, 2020; Wang et al., 2020).

Enfin, à noter qu'il existe d'autres voies de régulation de la synthèse d'hepcidine. Entre autres, les hormones sexuelles, dont la testostérone, sont à l'origine d'une diminution de la production d'hepcidine chez la souris et l'homme, par des mécanismes qui restent à établir (Bachman et al., 2010; Goodnough et al., 2012; Guo et al., 2013b).

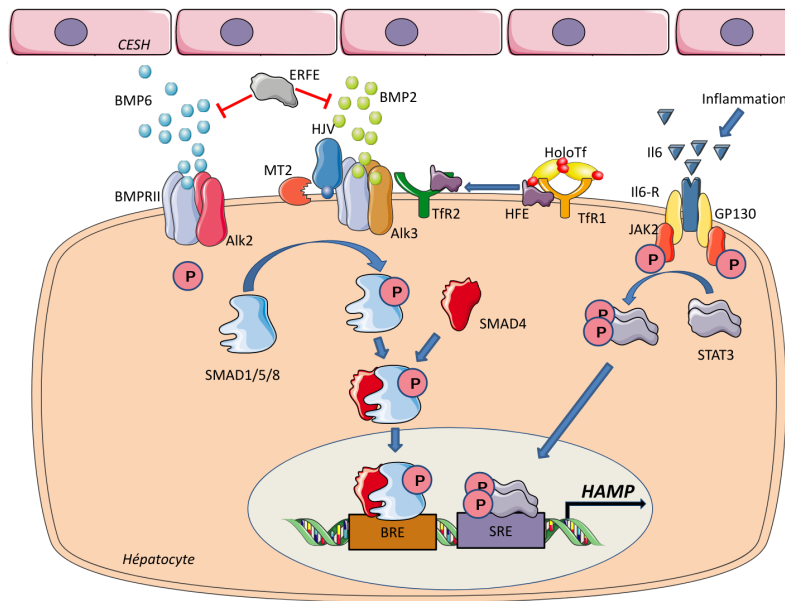


Figure 19: Régulation de la synthèse d’hepcidine au sein de l’hépatocyte. Les BMPs (BMP2 et BMP6), ainsi que le couple Tfr2/HFE, activent les BMPRs afin de phosphoryler les protéines SMAD1/5/8 qui, après couplage avec SMAD4, vont activer la transcription du gène *HAMP*. L’inflammation, par la production d’IL6, va activer JAK2 qui phosphoryle STAT3, augmentant la transcription du gène *HAMP* et ainsi la synthèse d’hepcidine.

3. Les hyperferritinémies et les surcharges en fer

3.1. La ferritine sanguine et ses variations

L'axe hepcidine-ferroportine est au cœur du métabolisme systémique du fer. Toute dérégulation de cette dyade perturbera la disponibilité du fer, à la fois dans la cellule et le compartiment sanguin. Un manque de fer peut être responsable d'un trouble de l'érythropoïèse et une anémie, alors qu'une surcharge en fer peut être délétère du fait de sa toxicité. Le témoin biologique le plus fréquemment utilisé pour évaluer l'état homéostatique du fer est le dosage de la ferritine sanguine. Nous l'avons vu, la ferritine est la protéine intracellulaire permettant le stockage du fer. Cependant, en condition physiologique, une part de ferritine se retrouve dans la circulation sanguine. Les mécanismes à l'origine d'un relargage de ferritine dans le compartiment sanguin ne sont pas encore totalement élucidés, tout comme son rôle dans le sang. Ce relargage a été décrit pour plusieurs types cellulaires, tel que l'hépatocyte (Tran et al., 1997), les cellules de Küpffer (Fan et al., 2009) ou encore les macrophages alvéolaires (Wesselius et al., 1994). La majeure partie de la ferritine sanguine est composée de chaînes légères ("L-chain"), est peu chargée en fer et est en partie glycosylée, témoignant d'une sécrétion principalement hépatocytaire (Ghosh et al., 2004). La part de ferritine glycosylée atteint 100% dans certaines formes d'hyperferritinémie héréditaire (Kannengiesser et al., 2009).

Il est connu depuis près de 50 ans que le taux de ferritine sanguine est le reflet du statut en fer d'un patient (Jacobs et al., 1972), et une étude réalisant des phlébotomies chez des sujets sains a montré une corrélation entre le taux de ferritine sérique et la réserve en fer, où 1 $\mu\text{g/L}$ de ferritine correspond approximativement à 8 mg/L de réserve en fer (Walters et al., 1973). En l'absence d'inflammation (qui, nous le verrons, entraîne une augmentation de la ferritine), un taux bas de ferritine est un paramètre sensible et spécifique pour le diagnostic d'un déficit en fer (Guyatt et al., 1992). A l'inverse, un taux élevé de ferritine est un bon reflet de l'augmentation des réserves en fer, en l'absence d'autres causes entraînant un relargage sanguin de la ferritine à partir de cellules endommagées (Sandnes et al., 2021).

L'hyperferritinémie est définie par un taux de ferritine sanguine supérieur à 200 $\mu\text{g/L}$ chez la femme (non ménopausée) et 300 $\mu\text{g/L}$ chez l'homme (Adams et al., 2005). Les situations menant à une élévation de la ferritine sanguine sont diverses, et peuvent déjà être divisées en deux grandes catégories, en fonction de la présence ou non d'une surcharge en fer. Cette distinction est essentielle, tant pour la démarche étiologique que thérapeutique. Les principales étiologies détaillées plus bas sont résumées dans le tableau 2.

Catégorie	Etiologie
Hyperferritinémie sans surcharge en fer	<p>Causes fréquentes</p> <p>Inflammation</p> <p>Cancer</p> <p>Dommages cellulaires</p> <p>Syndrome métabolique et obésité</p> <p>Consommation d'alcool</p> <p>Diabète et résistance à l'insuline</p> <p>Causes rares</p> <p>Mutations du gène <i>FTL</i></p> <p>Maladie de Gaucher</p> <p>Pathologies auto-inflammatoires</p> <p>Pathologie hépatique chronique (cirrhose, NAFLD, hépatite virale, porphyrie cutanée tardive)</p>
Cas particulier	
Hyperferritinémie avec surcharge en fer	<p>Causes fréquentes</p> <p>Hémochromatose de type 1</p> <p>Surcharge en fer dysmétabolique</p> <p>Anémies avec surcharge en fer</p> <p>Surcharge en fer iatrogène (transfusions, administration parentérale de fer)</p> <p>Causes rares</p> <p>Hémochromatoses rares</p> <p>Maladie de la ferroportine</p> <p>Acéruplasminémie</p> <p>Atransferrinémie/hypotransferrinémie</p>

Tableau 2 : Principales causes d'hyperferritinémie (*inspiré de Sandnes et al, 2021*).

3.2. Hyperferritinémies sans surcharge en fer

L'hyperferritinémie sans surcharge en fer, qui représente la grande majorité des situations (Sandnes et al., 2021), est le résultat d'un relargage de ferritine par les cellules et/ou une synthèse accrue de ferritine. Les causes peuvent être secondaires à une pathologie où elle est le témoin d'un relargage de ferritine dans le compartiment sanguin, où être primaire, d'origine génétique.

3.2.1. Hyperferritinémies secondaires

L'une des principales causes d'hyperferritinémie non génétique et sans surcharge en fer est l'inflammation. Depuis les travaux de Konijn en 1977 et 1981 il est connu que l'inflammation entraîne une augmentation de la synthèse de ferritine (Konijn and Hershko, 1977; Konijn et al., 1981), en lien avec une augmentation de la synthèse d'hepcidine et une rétention intracellulaire de fer. Cette rétention a pour but de limiter la disponibilité du fer dans l'organisme, élément indispensable à la survie du pathogène. Tout d'abord, une synthèse accrue de chaîne lourde de ferritine est stimulée par diverses cytokines pro-inflammatoires, telle que IL1- α et TNF- α (Kernan and Carcillo, 2017). Mais cette régulation n'explique pas la hausse de ferritine sanguine, principalement constituée de chaîne légère. La libération de ferritine par les hépatocytes notamment semble être activée par les mêmes cytokines (Tran et al., 1997). De plus, les dommages cellulaires secondaires à la libération de cytokines induisant l'apoptose accentuent l'hyperferritinémie grâce au relargage par les cellules endommagées (Kernan and Carcillo, 2017). La sécrétion d'hepcidine et de ferritine en réponse à un agent pathogène a pour conséquence la limitation de la disponibilité du fer pour la synthèse d'hémoglobine, entraînant une anémie (Roy and Andrews, 2005).

Bien que la cause la plus fréquente de l'inflammation soit l'infection, il existe des étiologies plus rares, telles que les maladies auto-immunes (Orbach et al., 2007) ou encore auto-inflammatoires. Dans cette dernière catégorie, nous pouvons évoquer le syndrome d'activation macrophagique, ou lymphohistiocytose hémophagocytaire, complication grave de certains états inflammatoires, où une activation incontrôlée du système immunitaire est responsable d'un orage cytokinique, et s'accompagne notamment d'une hyperferritinémie (Rosário et al., 2013). Ce phénomène a été récemment observé chez des patients présentant des formes graves d'infection par le virus SARS-Cov2 (Cheng et al., 2020).

Le cancer est une cause connue d'hyperferritinémie, à la fois par une production accrue de ferritine par la tumeur et une cytolyse (Hazard and Drysdale, 1977; Hann et al., 1984; Cazzola et al., 1985). Il n'a pas été clairement établi aujourd'hui si cette hyperferritinémie participe à la progression du cancer ou si elle représente un marqueur de la présence d'une néoplasie, bien que certains éléments semblent incriminer la surcharge en fer dans le développement de certains cancer, notamment du sein, avec une diminution de la synthèse de ferroportine (Kabat and Rohan, 2007; Wang et al., 2010; Torti et al., 2018).

Le foie étant l'organe principal de stockage du fer dans le corps, les dommages cellulaires causés par l'alcool, les virus, la stéatose hépatique, peuvent être à l'origine d'un relargage de ferritine dans le compartiment sanguin. Concernant l'alcool, on sait qu'une hyperferritinémie modérée ($<1000 \mu\text{g/L}$) est retrouvée chez 40 à 70% des alcooliques chroniques (Moirand et al., 1991), où l'alcool serait à l'origine à la fois d'une production accrue de ferritine (Moirand et al., 1995) et dans un second temps d'une suppression de l'expression de l'hepcidine (Harrison-Findik et al., 2007). Une autre cause de lésion hépatique à l'origine d'hyperferritinémie est le syndrome métabolique. La définition de ce syndrome a évolué depuis sa description, mais un consensus semble avoir été proposé en 2005 avec plusieurs critères dont le principal est la présence d'une obésité abdominale, avec des valeurs de tour de taille spécifique en fonction de l'ethnie, et d'au moins deux critères parmi les suivants (Huang, 2009) :

- une hypertriglycéridémie
- un faible taux de HDL ("High Density Lipoprotein") cholestérol
- une hypertension artérielle
- une résistance à l'insuline avec une hyperglycémie à jeun ou un diabète de type 2 diagnostiqué.

Une des complications connues de ce syndrome est la stéatose hépatique non alcoolique ("Non Alcoholic Fatty Liver Disease" ou NAFLD), qui se caractérise par une accumulation de graisse dans le foie, pouvant mener à une hépatite non alcoolique ("Non-alcoholic SteatoHepatitis" ou NASH). Il a longtemps été admis que l'inflammation dans cette pathologie était la cause de l'hyperferritinémie, or il a été montré qu'il n'existait pas de corrélation entre les marqueurs de l'inflammation et la ferritine chez ces patients (Beaton et al., 2014). Une autre hypothèse pouvant expliquer l'hyperferritinémie dans ces cas est la résistance à l'insuline (Brudevold et al., 2008). Celle-ci pourrait entraîner une induction de la production de ferritine par l'insuline elle-même, comme suggéré par certains travaux (Yokomori et al., 1991; Han et al., 2010).

Enfin, une cause rare d'hyperferritinémie est liée à une anomalie du métabolisme, la maladie de Gaucher. Cette pathologie lysosomale autosomique récessive est secondaire à des mutations dans le gène *GBA* codant la glucocérébrosidase. Le phénotype, extrêmement variable, associe des anomalies osseuses, une hépatosplénomégalie, une anémie et thrombocytopénie, une pathologie pulmonaire et dans certaines formes plus graves des anomalies neurologiques (Pastores and Hughes, 1993). Le mécanisme à l'origine de cette hyperferritinémie n'est pas connu mais pourrait être lié à une inflammation chronique (Regenboog et al., 2016).

3.2.2. Hyperferritinémies primaires sans surcharge en fer

Le gène *FTL* codant la chaîne légère de la ferritine est associé à plusieurs pathologies, dont deux formes d'hyperferritinémie sans surcharge en fer. En 1995, Girelli et al. ont émis l'hypothèse, à partir de l'étude de deux familles, d'un lien entre une forme d'hyperferritinémie sans surcharge en fer

et une forme autosomique dominante de cataracte, suggérant une cause génétique commune, non encore identifiée (Girelli et al., 1995). La même année, à partir d'une famille présentant une hyperferritinémie associée à une cataracte sur trois générations, Beaumont et al. ont mis en évidence la présence d'une variation dans la séquence IRE du gène *FTL*, touchant un nucléotide impliqué dans la formation de la boucle IRE (Beaumont et al., 1995). L'analyse de l'expression de L-ferritine dans des cellules lymphoblastoïdes générées à partir de patients de cette famille a montré que la mutation entraînait une suppression de la régulation de la synthèse de L-ferritine par le système IRE-IRP. Il s'ensuit une production accrue de L-ferritine, qui va notamment se déposer dans le cristallin, entraînant la cataracte (Mumford et al., 2000). Plusieurs cas ont été décrits dans la littérature, toujours situés dans l'IRE (Celma Nos et al., 2021).

Plus récemment, une variation faux-sens récurrente a été décrite chez des patients présentant une hyperferritinémie sans surcharge en fer et sans cataracte. Il s'agit de la substitution d'une thréonine en isoleucine en position 30 (p.Thr30Ile) (Kannengiesser et al., 2009). Ces patients présentaient de façon intéressante un taux élevé de ferritine glycosylée, suggérant que la variation entraînait une augmentation de l'hydrophobicité de l'hélice α située en N-terminal. Par la suite, d'autres mutations ont été décrites dans le même lobe (p.Gly26Ile et p.Ala27Val) (Thurlow et al., 2012), les substitutions en isoleucine et valine appuyant l'hypothèse de l'augmentation de l'hydrophobicité.

A noter que d'autres mutations du gène *FTL* sont décrites dans des pathologies différentes. D'une part, plusieurs mutations dans l'exon 4 avec un effet potentiellement dominant négatif ont été décrites dans une forme de neurodégénérescence avec accumulation de fer cérébrale (NBIA) (Curtis et al., 2001; Maciel et al., 2005). D'autre part, des mutations perte de fonction ont été associées de façon isolées à des formes dominante ou récessive de déficit en L-ferritine, avec pour l'un une simple diminution du niveau de L-ferritine (Cremonesi et al., 2004) et pour l'autre une épilepsie associée à un syndrome des jambes sans repos (Cozzi et al., 2013).

3.3. Les formes secondaires d'hyperferritinémie avec surcharge en fer

Il est également possible de classer les hyperferritinémies avec surcharge en fer en deux catégories : les formes primaires résultant d'une anomalie génétique de la régulation du métabolisme du fer, et les formes secondaires à une pathologie génétique autre ou acquise.

Le foie étant l'organe principal de stockage du fer, il est connu que les pathologies hépatiques sont à l'origine d'une surcharge en fer. Nous avons vu plus haut que la prise d'alcool ou la stéatose hépatique non alcoolique sont à l'origine d'un relargage de ferritine dans le compartiment sanguin. Cette hyperferritinémie peut être associée à une surcharge en fer, notamment dans le compartiment hépatique (Ludwig et al., 1997), et cette surcharge serait liée à des modifications de l'expression d'hepcidine, influant sur l'expression des transporteurs du fer DMT1 et FPN1 (Dostalíkova-Cimburova et al., 2014;

Sandnes et al., 2021). On retrouve une surcharge en fer hépatique (“Hepatic Iron Overload” HIO) chez près de 50% des patients avec hépatopathie alcoolique (Milic et al., 2016).

De la même manière, la NASH et le syndrome métabolique peuvent être à l’origine d’une hyperferritinémie mais aussi, dans environ un tiers des cas, d’une surcharge en fer modérée, appelée surcharge en fer dysmétabolique (“Dysmetabolic Iron Overload Syndrome” DIOS) (Deugnier et al., 2017; Rametta et al., 2020). Ces patients présentent souvent un coefficient de saturation de la transferrine normal, indiquant que la surcharge en fer ne se trouve pas dans le sang, mais dans les hépatocytes et macrophages. Une explication proposée serait une dérégulation de la synthèse d’hepcidine (Barisani et al., 2008). Enfin, les similitudes entre l’hyperferritinémie liée au syndrome métabolique et le DIOS, tant sur le plan épidémiologique que clinique et biologique, ont poussé certains auteurs à se poser la question d’une entité unique, ou un continuum où le syndrome métabolique pourrait évoluer vers un DIOS (Dongiovanni et al., 2011; Rametta et al., 2020).

La pathologie rénale chronique est une cause fréquente de dérégulation du métabolisme du fer. L’une des complications bien connues de cette pathologie est l’anémie. Il a longtemps été admis que cette anémie était secondaire à un déficit en érythropoïétine (EPO), hormone produite par le rein (McGonigle et al., 1984) et base du traitement de l’anémie chez ces patients depuis les années 1980. Mais les patients atteints d’insuffisance rénale présentent d’autres anomalies du métabolisme du fer, avec des pertes accrues par les saignements chroniques dûs à une dysfonction plaquettaire et une diminution de l’absorption de fer (Babitt and Lin, 2012). De plus, l’utilisation d’EPO ou d’autres agents stimulant l’érythropoïèse entraîne une déplétion du fer circulant au profit de la moelle osseuse. Enfin, des études ont montré qu’un excès de sécrétion d’hepcidine serait à l’origine d’un déficit fonctionnel en fer, qui resterait donc séquestré dans les cellules (Ashby et al., 2009). C’est en partie pour cette raison que le traitement par des agents stimulant l’érythropoïèse chez les patients dialysés est souvent couplée avec l’injection de fer intraveineuse, pour fournir suffisamment de fer nécessaire à la production de nouveaux globules rouges. Ces injections à répétition, bien qu’indispensables, sont à risque d’entraîner une surcharge en fer, notamment au niveau hépatique (Rostoker et al., 2012).

D’autres pathologies avec anémie chronique, telle que la thalassémie, l’anémie hémolytique, dysérythropoïétique ou encore sidéroblastique, sont traitées par des injections récurrentes de fer ou par transfusions itératives de culots de globules rouges. La prise en charge des globules rouges transfusés par les macrophages du système réticulo-endothélial va entraîner la libération de fer dans le compartiment sanguin, qui se trouvera sous forme libre quand la transferrine aura atteint ses limites. Sachant qu’un culot globulaire contient aux alentours de 200 mL de sang, il est estimé qu’à partir de 40 culots globulaires transfusés, une surcharge en fer apparaît (Kohgo et al., 2008).

Ces pathologies, où une anémie chronique s’installe par défaut d’érythropoïèse, sont à risque de surcharge en fer même sans transfusions. En effet, l’anémie entraîne une diminution de la production d’hepcidine par l’action de l’ERFE, expliquée précédemment. Cette baisse d’hepcidine

va donc entraîner une absorption accrue de fer alimentaire, une libération accrue de fer par les cellules macrophagiques, et possiblement une surcharge en fer, comme montré chez des patients thalassémiques non traités par transfusion (Shenoy et al., 2014).

En dehors de toutes ces causes secondaires de surcharge en fer, il existe des formes primaires, génétiques, avec principalement les hémochromatoses (HC).

3.4. Les formes primaires de surcharge en fer

Les hémochromatoses représentent de loin la première cause de surcharge sévère en fer. Du fait d'une longue phase préclinique, sans symptômes, l'HC est souvent sous-diagnostiquée (Ogilvie et al., 2015), pourtant les conséquences d'une surcharge en fer prolongée peuvent être dramatiques, du fait du dépôt de fer dans les organes tels que le foie, le pancréas ou encore le coeur, et entraîner un risque accru de décès (Barton et al., 2012; Ellervik et al., 2014). Le terme en lui-même d'hémochromatose et les entités qu'il indique est sujet à débat. Auparavant découpé en "hémochromatoses héréditaires" et "hémochromatoses acquises", il est aujourd'hui réservé aux formes primaires de surcharge en fer, et même plus précisément aux surcharges liées à un défaut de synthèse ou d'activité de l'hepcidine sur la ferroportine (Vlasveld et al., 2019). Nous verrons donc qu'une des formes de surcharge en fer liée à un type de mutations du gène *SLC40A1* n'est plus considérée aujourd'hui en tant qu'hémochromatose. Les principales voies touchées dans les hémochromatoses et autres surcharges en fer génétiques sont représentées sur la figure 20.

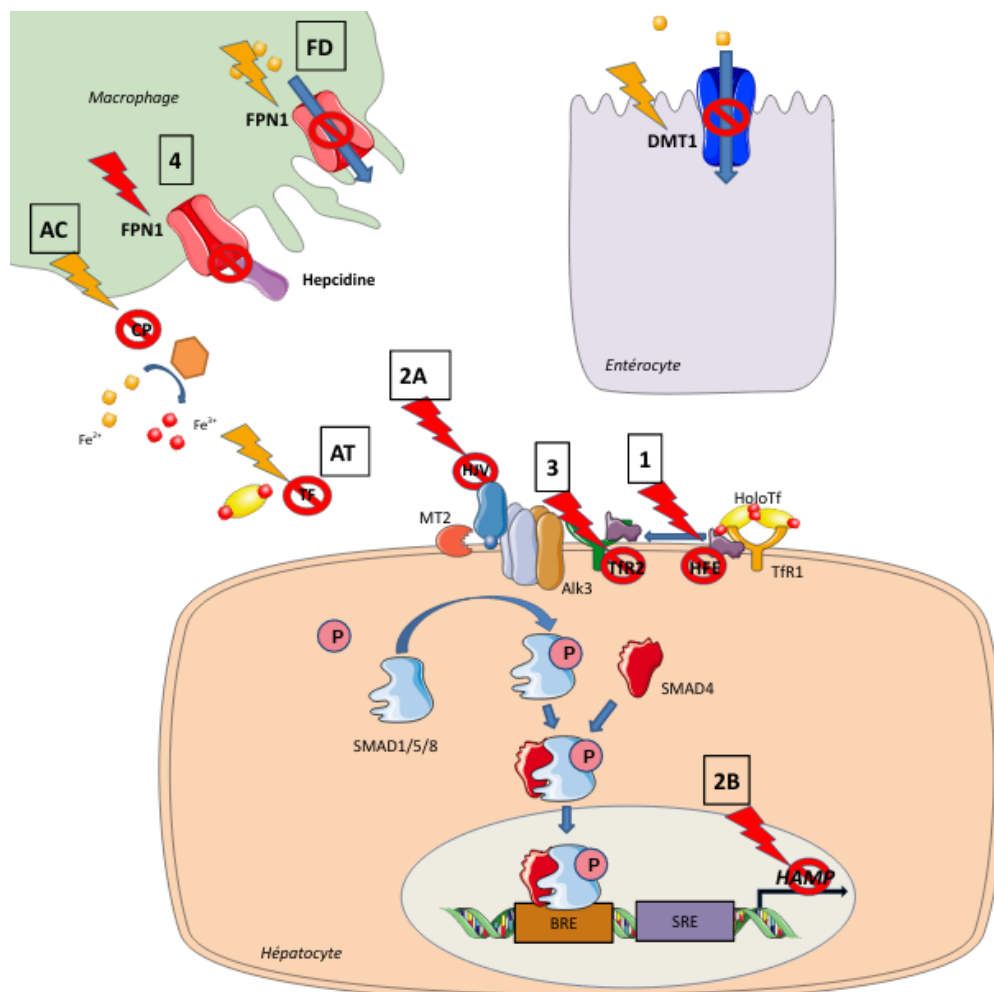


Figure 20: Représentation des différentes voies touchées dans les formes d’HC liées à un défaut de production d’hepcidine par l’hépatocyte.. Flèches rouges = hémochromatoses, flèches orange = surcharges en fer génétiques non hémochromatosiques. Les numéros correspondent aux différentes formes d’HC. AC=acéruplasminémie, AT=atransferrinémie.

3.4.1. L’hémochromatose de type 1 (HC1)

La première cause génétique d’HC a été identifiée en 1996 par Feder et al. et est liée à des mutations bialléliques du gène *HFE*, qui code la protéine HFE, impliquée dans la synthèse d’hepcidine (Feder et al., 1996; Feder et al., 1997). Elle représente la forme la plus fréquente d’HC, appelée HC de type 1, et touche principalement les individus du nord-ouest de l’Europe (Le Gac and Férec, 2005). Elle ségrège sur le mode autosomique récessif, et une variation est retrouvée chez la grande majorité des patients à l’état homozygote, la substitution d’une cystéine par une tyrosine en position 282 (p.Cys282Tyr). La

prévalence de l'homozygotie pour cette mutation est estimée entre 0,4 et 0,5%, et 1 personne sur 11 en Europe de l'Ouest présenterait la variation à l'état hétérozygote (Hanson et al., 2001; Le Gac and Férec, 2005). La substitution de cette cystéine en tyrosine impacte l'interaction de la protéine HFE avec son partenaire la β 2-microglobuline, affectant son expression membranaire et ainsi sa fonction dans la régulation de l'expression de l'hepcidine (Feder et al., 1997). D'autres mutations, plus rares, ont été décrites dans le gène *HFE* chez des patients présentant une surcharge en fer, homozygotes ou en *trans* de la variation p.Cys282Tyr (Le Gac et al., 2003, 2008; Ka et al., 2005; Le Gac and Férec, 2005; Uguen et al., 2017). Enfin, les variations p.His63Asp et p.Ser65Cys ont été décrites initialement comme causant une hémochromatose. Mais les données phénotypiques chez les patients homozygotes ou hétérozygotes composite pour ces variations, la pénétrance du génotype diminuée par rapport à la situation d'homozygotie p.Cys282Tyr ou la description de facteurs secondaires ont amené les auteurs à considérer ces variations comme des facteurs de risque plutôt que de véritables mutations causales (Arya et al., 1999; Wallace et al., 2002b; Le Gac and Férec, 2005; Saliou et al., 2013).

Le dysfonctionnement de la protéine HFE entraîne une diminution de la synthèse d'hepcidine par l'hépatocyte, et par voie de conséquence un trouble de la régulation de la ferroportine, qui se retrouve privée de son principal régulateur post-traductionnel. Ainsi les cellules hépatocytaires, macrophagiques et entérocytaires exportent le fer de façon anormalement élevée dans le compartiment sanguin, entraînant une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine (CST). Comme nous l'avons vu plus tôt, au dessus de 45% de saturation de la transferrine, le fer se trouve sous forme libre et toxique dans le sang (Brissot et al., 2012), pouvant ainsi être capté par les hépatocytes.

L'histoire clinique et biologique de l'HC de type 1 est depuis longtemps bien connue et décrite. L'évolution de la maladie est divisée en cinq stades, en fonction des modifications du bilan biologique et des signes cliniques (Figure 21).

Le premier stade, dit de latence ou stade 0, correspond à une phase où l'individu homozygote pour la variation p.Cys282Tyr du gène *HFE* ne présente aucun signe clinique. Les deux autres stades sont regroupés sous le terme de phase biologique, commençant par une élévation isolée du CST (stade 1), témoignant d'un excès de fer dans le compartiment sanguin, suivie d'une élévation de la ferritine sanguine (stade 2), témoignant d'une surcharge en fer tissulaire.

Les deux stades suivants sont regroupés dans le terme de phase clinique et sont marqués par l'apparition de signes cliniques, d'abord affectant la qualité de vie, telle une asthénie, un hypogonadisme, des douleurs articulaires (stade 3), ainsi qu'une mélanodermie (stade 3 ou 4), puis des complications mettant en jeu le pronostic vital apparaissent (cirrhose, carcinome hépatocellulaire, insuffisance cardiaque, diabète insulino-dépendant), c'est le stade 4 (Brissot et al., 2018).

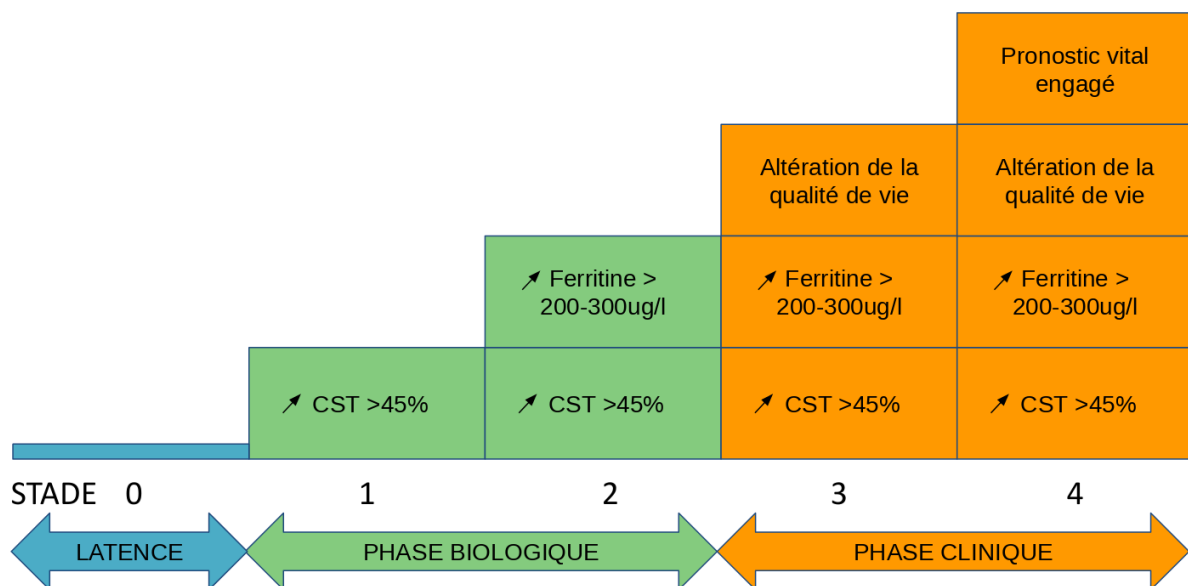


Figure 21: Représentation des différents stades de l'HC1, selon Brissot et al. 2018. Leur classification repose sur 4 paramètres : l'élévation du coefficient de saturation de la transferrine, de la ferritine sérique, l'atteinte de la qualité de vie ainsi que l'engagement du pronostic vital des patients atteints d'hémochromatose. Deux phases sont observées : la phase préclinique regroupant les 3 premiers stades phénotypiques et la phase clinique comprenant les 2 derniers stades phénotypiques de la maladie.

L'HC1 est une pathologie de l'adulte, dans le sens où les premiers signes biologiques apparaissent après une phase de latence (stade 0) de 20 à 30 ans. De plus, la pathologie n'apparaîtra pas chez tous les individus homozygotes pour la variation p.Cys282Tyr. Ce défaut de pénétrance de génotype (proportion de patients avec signes biologiques ou cliniques parmi les homozygotes) est bien connu, et diffère en fonction du sexe. Il est décrit que la pénétrance des signes biologiques (hyperferritinémie) est de 80% pour les hommes et de 50% pour les femmes, alors que quand on s'intéresse à la pénétrance des signes cliniques (arthropathie, hépatopathie), elle chute à 1% pour les femmes et 28% pour les hommes (Allen et al., 2008). Entre les deux, le terme de pénétrance thérapeutique a été décrit, prenant en compte la quantité de fer soustraite par saignées pour revenir à un taux normal de ferritine, et estimée à 9% chez les femmes et 24% chez les hommes (Rochette et al., 2010).

Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer cette pénétrance réduite, tant du côté génétique, par l'action de gènes modificateurs, tels que *HAMP*, *HJV*, *CYBRD1*, *BMP2* (Jacolot et al., 2004; Le Gac et al., 2004b; Island et al., 2009; Milet et al., 2010; Pelucchi et al., 2012), que du côté environnemental, dont le facteur le plus important serait la consommation d'alcool (Fletcher et al., 2002; Scotet

et al., 2003). Certains facteurs environnementaux protecteurs ont été supposés, comme la pratique régulière du don de sang, mais cette hypothèse n'a pas été confirmée (Barton et al., 2001). Un dernier facteur modificateur peut quant à lui expliquer les différences de pénétrance entre les hommes et les femmes, c'est la testostérone, qui aurait une action répressive sur la synthèse d'hepcidine chez les hommes (Latour et al., 2013).

D'un point de vue diagnostique, la recherche d'une HC1, qui consiste dans un premier temps à rechercher une situation d'homozygotie pour la variation p.Cys282Tyr dans le gène *HFE* se justifie en cas de mesure d'un CST >45% à deux reprises ou en cas d'apparenté atteint. En cas de variation homozygote, le diagnostic est posé, et un traitement peut être mis en place en fonction du stade de la maladie. En cas de situation d'hétérozygotie p.Cys282Tyr ou hétérozygotie composite p.Cys282Tyr/p.His63Asp, la recherche de formes secondaires de surcharge en fer peut être envisagée, et en l'absence d'autre cause, la recherche d'une autre variation rare dans le gène *HFE* peut se discuter (Uguen et al., 2017) ou la recherche de formes rares d'hémochromatose, détaillées par la suite (European Association For The Study Of The Liver, 2010; Brissot et al., 2018).

Le traitement utilisé est peu coûteux, bien connu et en général bien toléré, il s'agit de la saignée itérative, ou phlébotomie. Par la soustraction d'une quantité de sang variant de 400 à 500 mL, la moelle osseuse mobilisera le fer en excès dans l'organisme pour pouvoir synthétiser de nouveaux globules rouges. Selon les recommandations de la haute autorité de santé, à partir du stade 2, une prise en charge par saignées est indiquée, avec une phase d'induction (saignées au maximum une fois par semaine) pour atteindre un taux de ferritine < 50 µg/L, puis une phase d'entretien avec des saignées tous les deux à quatre mois pour maintenir le même objectif de ferritinémie (Haute Autorité de Santé, 2005). A cela s'ajoute une surveillance de la tolérance clinique et biologique (notamment à la rechercher d'une anémie), et de la survenue de complications de l'HC. L'efficacité de ce traitement est démontrée dans l'amélioration de la fatigue, de la fonction cardiaque, dans la stabilisation de la pathologie hépatique et la réduction de la pigmentation cutanée. En revanche, les symptômes articulaires répondent peu à ce traitement, qui peut même les aggraver (Husar-Memmer et al., 2014; Brissot et al., 2018).

En complément de ce traitement, des mesures hygiéno-diététiques, telles que l'arrêt de l'alcool ou toute supplémentation orale en fer, sont recommandées, sans autre régime particulier. La saignée est en général bien tolérée, mais peut toutefois provoquer une anémie, des effets secondaires (vertiges, malaises) ou être difficile à réaliser du fait d'un abord veineux difficile. Pour ces raisons, d'autres thérapeutiques ont été recherchées. La chélation par le fer n'est pas recommandée du fait de l'absence de bénéfice et des effets secondaires parfois invalidants et notamment une toxicité hépatique (Aslam et al., 2010), bien qu'elle soit toujours utilisée dans les cas où la phlébotomie est mal tolérée (Adams and Barton, 2010). Une autre piste pour le traitement est de jouer sur l'axe hepcidine-ferroportine. Certaines équipes ont tenté de synthétiser une "mini-hepcidine", composée de neuf acides aminés indispensables à la fonction de l'hepcidine (Preza et al., 2011), tandis que

d'autres se sont intéressés à la synthèse endogène d'hépcidine en inhibant *TMPRSS6* (un inhibiteur de la voie BMP-SMAD (Guo et al., 2013a)), ou encore inhiber la ferroportine par un compétiteur de l'hépcidine, le VIT-2763 (Porter et al., 2021). A noter que cette approche n'a de bénéfice qu'en l'absence de surcharge tissulaire avérée en fer, car dans ce cas le traitement risquerait de séquestrer le fer déjà en excès dans les tissus.

3.4.2. Les hémochromatoses de type 2A, 2B et 3

En plus de cette forme majoritaire, il existe plusieurs formes d'HC, beaucoup plus rares, secondaires à des dysfonctionnements de la production ou de la fonction de l'hépcidine (Figure 20). Ces différents types d'HC diffèrent dans leur sévérité et leur mode de transmission (Figure 22). Les formes les plus sévères sont les HC de type 2A et 2B, dues à des mutations bialléliques sur les gènes *HJV*, codant l'hémojuvéline, et *HAMP*, codant l'hépcidine, respectivement. Ces deux formes sont caractérisées par un âge d'apparition de la maladie précoce, avant 30 ans, et une atteinte sévère au niveau hépatique (cirrhose), cardiaque (cardiomyopathie) et un hypogonadisme (Roetto et al., 2003; Papanikolaou et al., 2004), bien que pour le cas de l'*HJV* des formes à apparition plus tardives aient été décrites (Dhillon et al., 2018).

Entre les deux extrêmes (formes juvénile et adulte), il existe une forme intermédiaire d'HC, liée au gène *TFR2*, codant le récepteur à la transferrine de type 2 qui joue un rôle dans l'expression de l'hépcidine (Camaschella et al., 2000; Le Gac et al., 2004a; Le Gac and Férec, 2005).

Enfin, une dernière forme d'HC est décrite, la seule ségrégant sur le mode autosomique dominant, il s'agit de l'HC de type 4 liée au gène *SLC40A1*. Les mutations dans ce gène, qui représente la seconde forme d'HC en termes de fréquence, peuvent être à l'origine de deux pathologies distinctes : l'HC de type 4, en cas de résistance de la ferroportine à l'hépcidine, et la maladie de la ferroportine, en cas de perte de fonction. Etant donné les particularités liées aux mutations de ce gène, qui constitue le sujet principal de ma thèse, je vais développer cette partie un peu plus loin.

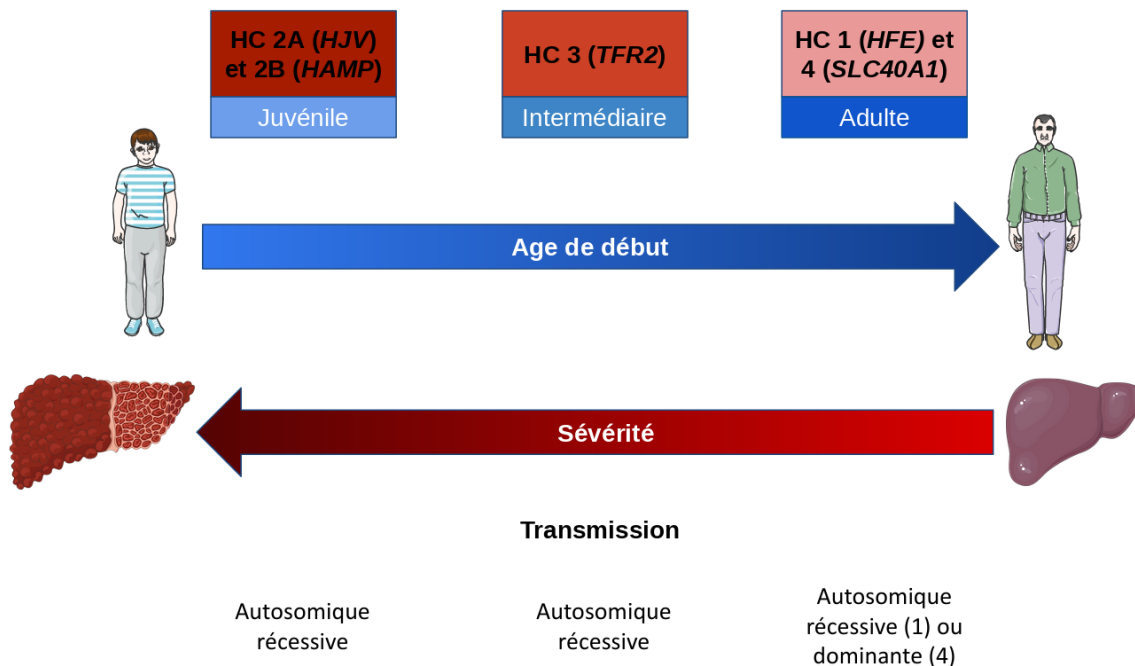


Figure 22: Hétérogénéité phénotypique et génétique de l'hémochromatose. L'hémochromatose (HC) de type 1, ainsi que l'HC de type 4, sont les formes les plus tardives, alors que les HC de type 2A et 2B sont les plus précoces, avec des atteintes sévères à un âge jeune. Entre les extrêmes se trouve l'HC de type 3.

3.4.3. Les autres formes héréditaires de surcharge en fer

En dehors de ces cinq gènes responsables d'hémochromatose, d'autres gènes ont été associés à des surcharges en fer rares. L'un d'eux est responsable d'une forme rare de surcharge en fer associée à une baisse de la synthèse d'hepcidine : *BMP6*. Nous avons vu précédemment que le peptide BMP6 est primordial pour l'activation de la synthèse d'hepcidine. Dès 2009, deux équipes ont montré que la délétion de *Bmp6* était responsable d'une surcharge en fer chez la souris (Andriopoulos et al., 2009; Meynard et al., 2009), suggérant un possible rôle de ce gène dans des formes précoces d'hémochromatoses. C'est en 2016 que les premières mutations du gène *BMP6* sont décrites, à l'état hétérozygote, chez des patients présentant une surcharge en fer et une sécrétion inappropriée d'hepcidine (Daher et al., 2016; Le Gac et al., 2016). Les analyses fonctionnelles ont montré que les variations p.Pro95Ser, p.Leu96Pro et p.Gln113Glu étaient responsables d'une diminution de la sécrétion de la forme mature de BMP6 et ainsi d'une baisse de la synthèse d'hepcidine.

Parmi les formes héréditaires de surcharge en fer, il en existe trois particulières (Figure 20), qui se caractérisent par une anémie associée à une surcharge en fer. La première est due à des mutations du

gène *CP* codant la céruloplasmine. Cette protéine, comme expliqué plus haut, a pour rôle d'oxyder le fer exporté par la ferroportine, afin qu'il soit pris en charge par la transferrine. Des mutations bialléliques de ce gène ont été décrites chez des patients présentant un phénotype complexe, associant des troubles neurologiques, une anémie, une surcharge en fer au niveau hépatique et cérébral, un diabète et une dégénérescence rétinienne (Logan et al., 1994; Harris et al., 1996).

Des mutations dans le gène *TF*, codant la transferrine, ont été décrites dans une forme sévère, précoce, autosomique récessive, d'anémie avec surcharge en fer, appelée l'atransferrinémie. La perte de fonction de *TF* entraîne l'absence de fer lié à la transferrine, élément indispensable à la synthèse de globules rouges, et donc une anémie. Le fer se retrouve à l'état libre dans le sang, se déposant dans les tissus et entraînant des lésions hépatiques et cardiaques, parfois fatales sans traitement (Heilmeyer, 1966; Hayashi et al., 1993).

Des mutations bialléliques dans le gène *DMT1*, codant *DMT1* impliquée dans l'absorption du fer alimentaire et le transport du fer à l'intérieur des cellules, sont retrouvées chez des patients présentant une anémie hypochrome et une surcharge en fer (Shahidi et al., 1964; Mims et al., 2005). Il est intéressant de noter que ce même phénotype a été retrouvé dans une famille où une variation tronquante dans le gène *STEAP3* a été retrouvée à l'état hétérozygote (Grandchamp et al., 2011).

Enfin, une mutation dans le gène *FTH*, codant la sous-unité lourde de la ferritine, plus précisément dans l'élément IRE, a été décrite dans une famille japonaise présentant une surcharge en fer avec hyperferritinémie et élévation du CST. Les imageries du foie et de la rate ainsi que la biopsie hépatique montraient un dépôt de fer localisé dans le foie et la rate, évocateur d'une hémochromatose (Kato et al., 2001), ce qui lui a valu le terme d'HC de type 5, mais elle n'est pas une hémochromatose dans le sens où il n'y a pas d'atteinte de la synthèse ou de la fonction de l'hepcidine.

Nous venons de voir un certain nombre de causes génétiques de surcharge en fer, avec des présentations phénotypiques différentes. La recherche d'une cause génétique devant un patient présentant une surcharge en fer n'est pas systématique, et, en dehors de la recherche d'une homozygotie pour la variation p.Cys282Tyr du gène *HFE*, les examens plus poussés doivent être orientés par la clinique, la biologie et l'imagerie (Figure 23).

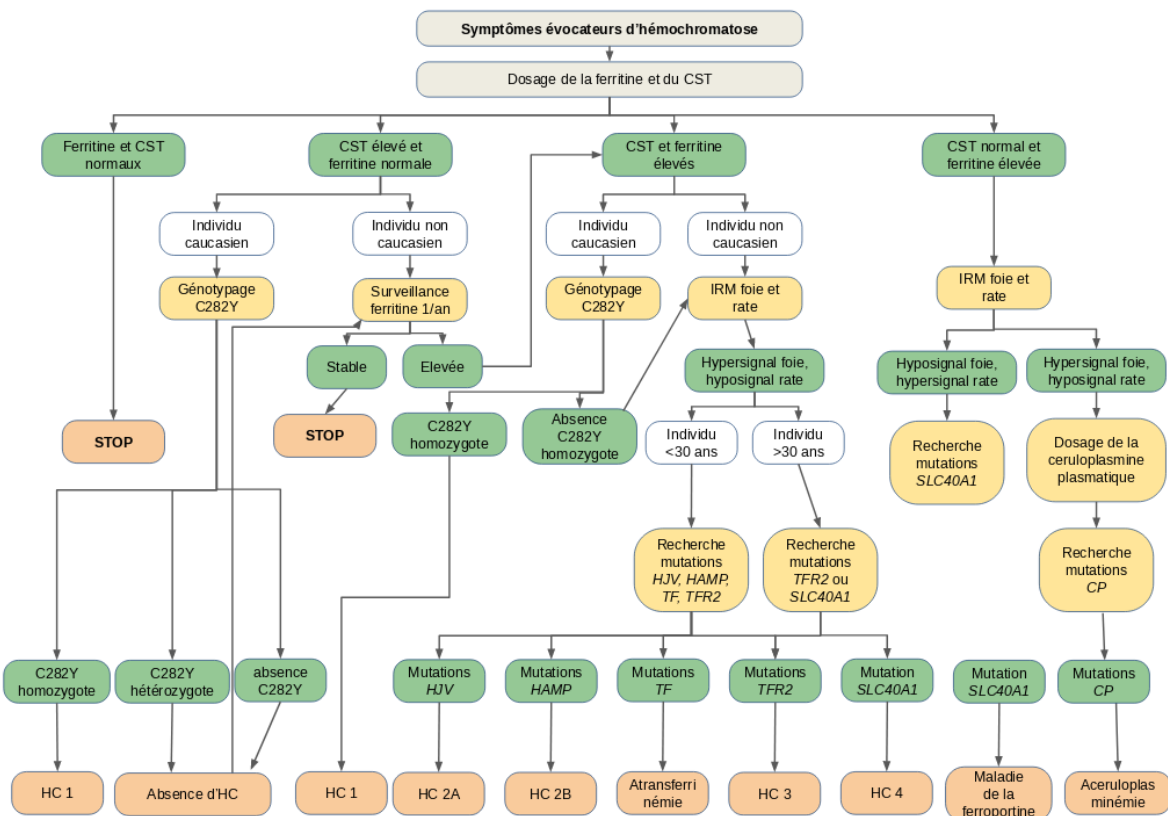


Figure 23: Arbre décisionnel devant une suspicion d'hémochromatose (d'après Brissot et al. 2018).

3.4.4. La maladie de la ferroportine et l'hémochromatose de type 4

Le cas des mutations du gène *SLC40A1* est particulier, et ce pour plusieurs raisons :

- c'est la seconde forme de surcharge en fer génétique après l'HC de type 1 en termes de fréquence, avec une prévalence estimée des allèles pathogènes à 0.03% (Wallace and Subramaniam, 2015) et une répartition mondiale
- c'est la seule forme à ségréger sur le mode autosomique dominant
- selon le type de mutations retrouvées, deux phénotypes distincts sont décrits.

Les premières descriptions de surcharge en fer liées au gène *SLC40A1* datent de 2001, chez des patients italiens et néerlandais, à savoir les variations p.Asn144His et p.Ala77Asp respectivement (Montosi et al., 2001; Njajou et al., 2001). Par la suite, d'autres variations ont été décrites, dont certaines récurrentes, comme la variation p.Val162del (Cazzola et al., 2002; Devalia et al., 2002; Roetto et al., 2002; Wallace et al., 2002a) ou encore la variation p.Arg178Gln (Ka et al., 2018). La description de ces nou-

velles variations a révélé la présence de deux phénotypes distincts, avec d'une part un CST élevé et un dépôt de fer dans les hépatocytes, et d'autre part une surcharge en fer réticulo-endothélial avec un CST normal (Drakesmith et al., 2005; Schimanski et al., 2005). Les premières analyses fonctionnelles ont posé l'hypothèse de deux conséquences des mutations faux-sens du gène *SLC40A1* :

- des mutations, comme les substitutions p.Val162del et p.Ala77Asp, causent un défaut d'export du fer par la protéine (Schimanski et al., 2005)
- d'autres, comme les substitutions p.Tyr64Asn, p.Asn144Asp et p.Cys326Tyr, exportent de façon normale le fer mais confèrent une résistance de la ferroportine vis à vis de son principal régulateur, l'hepcidine (Drakesmith et al., 2005), et sont qualifiées de mutation gain de fonction.

Ces deux classes de mutations correspondent à deux entités cliniques distinctes, la maladie de la ferroportine et l'hémochromatose de type 4 (Figure 24).

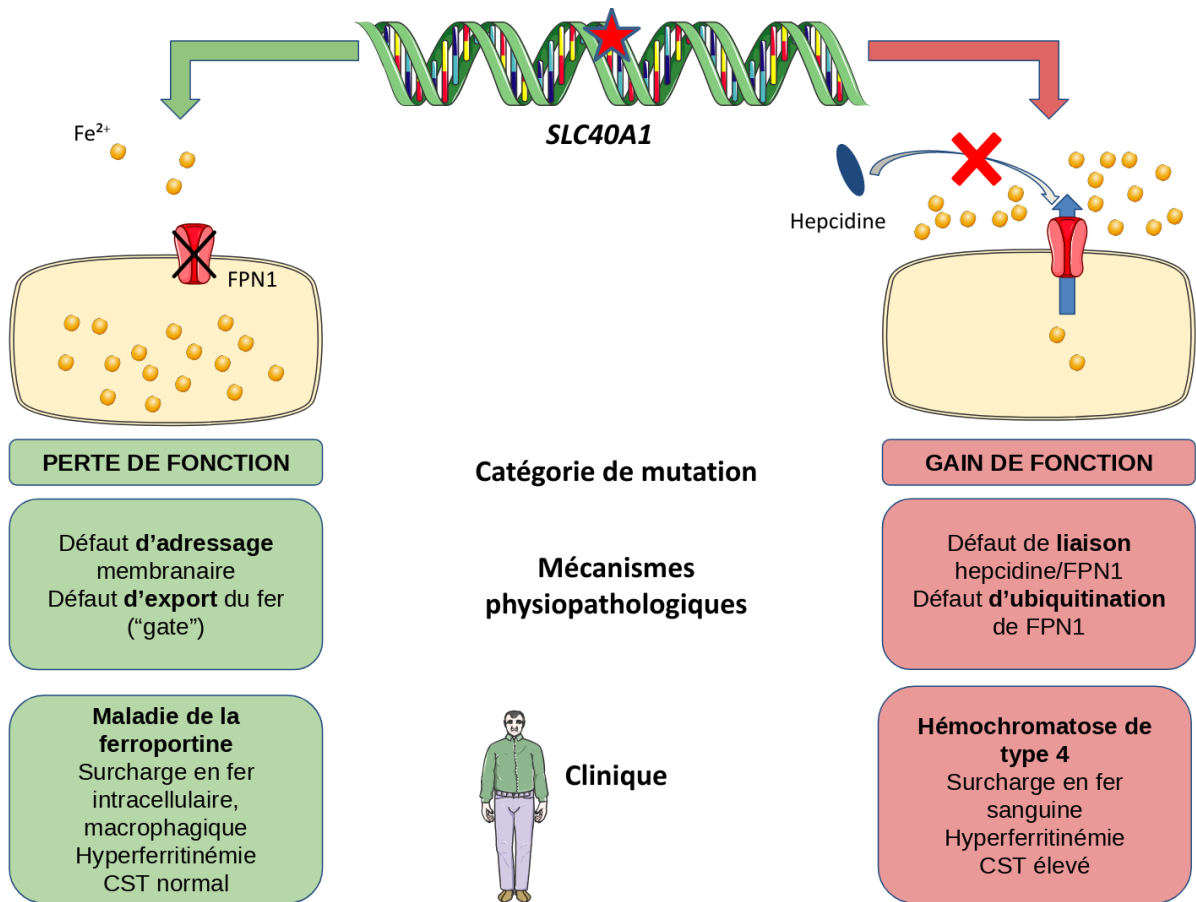


Figure 24: Dichotomie génétique et clinique des mutations du gène *SLC40A1*. Les mutations perte de fonction sont responsables d'un défaut d'export du fer, entraînant une surcharge en fer intracellulaire, avec une hyperferritinémie sans augmentation du CST. A l'inverse, les mutations gain de fonction sont responsables d'une surcharge en fer sanguine, avec une présentation similaire à l'HC de type 1.

- **Les mutations perte de fonction : la maladie de la ferroportine**

Les mutations perte de fonction ont été décrites chez des patients présentant une surcharge en fer différente de l'HC, avec une hyperferritinémie contrastant avec un CST normal à bas, et un dépôt de fer majoritairement localisé dans le système réticulo-endothélial. Ceci est expliqué par le rôle des macrophages dans le recyclage des érythrocytes sénescents, qui accumuleront le fer du fait de la perte de fonction de la ferroportine. Le défaut d'export de fer dans le sang se traduit également par un CST normal voire bas (Pietrangelo, 2017).

Cliniquement, l'absence de surcharge sanguine en fer, et notamment l'absence d'accumulation de fer libre, explique une sévérité plus faible de la maladie de la ferroportine par rapport à l'HC de type 1 ou 4. Les cellules macrophagiques du foie et de la rate, les plus touchées par la perte de fonction de FPN1, ont une résistance élevée à l'accumulation de fer, comme en témoignent des valeurs de ferritinémie très élevées chez certains patients (Piperno et al., 2020). Cependant, lors de l'évolution de la pathologie, une surcharge mixte peut apparaître, avec une augmentation du CST et une accumulation de fer dans les cellules hépatocytaires, pouvant favoriser la fibrogenèse et la carcinogenèse (Pietrangelo, 2017).

A l'image de l'HC de type 1, une forte hétérogénéité phénotypique est décrite, qui peut être expliquée par différents facteurs, tel que le sexe, le poids corporel, la consommation d'alcool... (Le Lan et al., 2011).

Concernant la prise en charge, la saignée reste comme pour l'HC le traitement de première intention, bien que la tolérance soit moindre avec un risque d'anémie. Ainsi, il est conseillé de surveiller de façon particulière le taux d'hémoglobine chez les patients, et de maintenir un taux de ferritine sérique plus élevé que pour l'HC, entre 100 et 200 $\mu\text{g/L}$ (Pietrangelo, 2017). Une récente revue a cependant nuancé ce constat avec une tolérance équivalente entre les patients avec une maladie de la ferroportine et ceux avec une HC de type 4 (Vlasveld et al., 2019).

- **Les mutations gain de fonction : l'hémochromatose de type 4**

Dans le cas des mutations gain de fonction du gène *SLC40A1*, la ferroportine devient résistante à l'hepcidine, et n'est donc plus régulée et exporte le fer de façon inappropriée. A l'image des autres formes d'HC où la synthèse d'hepcidine est altérée, le fer s'accumule dans le compartiment sanguin et le parenchyme hépatique, avec des manifestations phénotypiques comparables à celles observées pour l'HC de type 1 (Drakesmith et al., 2005; Le Gac et al., 2013; Vlasveld et al., 2019) et une prise en charge similaire.

3.4.5. La problématique des mutations du gène *SLC40A1* : l'apport des analyses structurales et fonctionnelles à l'interprétation des variations faux-sens

Au niveau génétique, la dichotomie entre les mutations perte et gain de fonction a été évoquée assez précocément après la description des familles et les premières analyses fonctionnelles (Drakesmith et al., 2005; Le Gac and Férec, 2005; Schimanski et al., 2005). A ce jour, plus de 70 variations ont été décrites dans la littérature associées à un phénotype de surcharge en fer, chez près de 370 patients. Toutes les variations, à l'exception de la variation p.Val162del, et une variation d'épissage entraînant un saut d'exon partiel (Le Tertre et al., 2021b) sont des variations faux-sens. L'absence de variations tronquantes ou de délétion du gène s'explique par la fonction primordiale de la ferroportine dans le métabolisme du fer, qui serait intolérante à la perte totale d'un allèle du gène *SLC40A1*, en particulier au niveau placentaire (Donovan et al., 2005).

Le caractère rare, voire privé, des mutations, rend difficile l'interprétation des variations retrouvées chez des patients présentant une surcharge en fer. Ainsi, assez tôt des analyses fonctionnelles ont été mises en place, afin de caractériser l'effet des mutations sur la fonction d'export du fer et sur la relation avec l'hepcidine. Le modèle cellulaire utilisé dès les premières études a été la lignée cellulaire HEK293T, par sa facilité d'utilisation et sa supposée faible expression endogène de FPN1, ce qui permet de l'exprimer par transfection (Nemeth et al., 2004b; Drakesmith et al., 2005; Schimanski et al., 2005). De là, des études d'expression membranaire de FPN1, de dosage de ferritine intracellulaire, d'export de fer radioactif ou encore de liaison hepcidine-ferroportine peuvent être réalisées en surexprimant la protéine sauvage ou mutée.

Concernant les mutations perte de fonction tout d'abord, les études fonctionnelles montrent que les mutations sont responsables soit d'un défaut d'adressage membranaire de la protéine (et donc par extension un défaut d'export du fer par la cellule), comme pour les variations p.Ala77asp ou p.Val162del, soit d'un défaut d'export du fer malgré un adressage normal à la membrane plasmique, comme les variations p.Gly80Ser ou p.Asp157Gly (Liu et al., 2005b; Schimanski et al., 2005; Gonçalves et al., 2006). La compréhension des mécanismes menant à la perte de fonction d'export du fer était encore partielle, et ce n'est qu'avec la description des premières structures tridimensionnelles que les hypothèses ont pu être soulevées. Entre autres, la combinaison d'analyses structurales et fonctionnelles a permis, comme nous l'avons vu plus tôt, de mettre en évidence l'importance de la "gate" intracellulaire dans la stabilisation de FPN1 en conformation "outward-facing" et la fonction d'export du fer. Les résidus impliqués dans cette "gate" sont le siège de près de la moitié des variations perte de fonction décrites à ce jour, décrivant un mécanisme physiopathologique inédit (Ka et al., 2018; Guellec et al., 2019).

Pour ce qui est du gain de fonction, les premières études fonctionnelles ont montré l'impact de certaines variations, touchant notamment la cystéine en position 326, sur la liaison hepcidine-ferroportine (Fernandes et al., 2009), confirmant l'importance de ce résidu dans l'interaction entre les deux protéines. A travers la description de nouvelles variations, une dichotomie semblait émerger

entre des variations responsables d'une résistance totale à l'hepcidine, plutôt situées dans le lobe C-terminal de la protéine (Létocart et al., 2009; Mayr et al., 2011; Callebaut et al., 2014), et des variations responsables d'une résistance partielle, localisée majoritairement dans le lobe N-terminal (Fernandes et al., 2009; Détiavaud et al., 2013; Prashberger et al., 2014; Le Tertre et al., 2017). Les bases moléculaires de cette dichotomie n'étaient en revanche pas connues. Comme expliqué plus haut, la fixation de l'hepcidine entraîne entre autres l'ubiquitination de la ferroportine, suivie de son internalisation et de sa dégradation. Ce constat permet de soulever plusieurs hypothèses quant aux mécanismes de résistance à l'hepcidine :

- il y a-t-il un défaut d'interaction hepcidine/ferroportine?
- il y a-t-il un défaut dans les changements conformationnels déclenchés par la fixation de l'hepcidine?
- il y a-t-il un défaut d'ubiquitination de la ferroportine?

Pour ce qui concerne le défaut d'ubiquitination, Qiao et al. ont mis en évidence l'impact d'une variation retrouvée chez un patient et touchant une lysine intracellulaire, p.Lys240Glu, responsable d'une absence d'ubiquitination et donc d'une résistance à l'hepcidine (Qiao et al., 2012).

C'est en 2018 qu'Aschemeyer et al. ont apporté un nouveau regard sur la résistance à l'hepcidine, grâce à la combinaison d'analyses structurales et fonctionnelles de variants de *SLC40A1* retrouvés chez des patients présentant une surcharge en fer. Ils ont ainsi, à partir de cellules HEK293T, pu différencier d'une part les variants responsables d'un défaut de liaison hepcidine/ferroportine, notamment ceux touchant les résidus Cys326 (déjà connu), Tyr501, Asp504, Asn144, Val72 ou encore Phe508, et d'autre part des variants qui n'altéraient pas la liaison entre les deux protéines mais réduisaient substantiellement l'ubiquitination de FPN1 et donc sa dégradation. C'est le cas notamment pour les résidus Tyr64, His507, Ser71, Gly204, Asp270, Ser338, Phe324 et Tyr333. En couplant ces analyses fonctionnelles à la structure tridimensionnelle de FPN1 (par homologie avec BbFPN), les auteurs ont mis en évidence que les résidus impliqués dans la liaison avec l'hepcidine étaient plutôt situés dans les hélices transmembranaires 2, 4, 7 et 11, dans la cavité centrale qui serait le siège de la fixation de l'hepcidine, alors que les résidus qui une fois mutés maintiennent une liaison hepcidine/ferroportine sont situés à la périphérie, à l'interface entre plusieurs hélices. Ces derniers seraient donc impliqués dans la dynamique des changements conformationnels déclenchés par la fixation de l'hepcidine et possible-ment impliqués dans l'ubiquitination de FPN1 (Aschemeyer et al., 2018).

La description de nouvelles structures tridimensionnelles de FPN1, et notamment la structure humaine par Billesbølle et al., a permis de mieux décrire la cavité centrale formée par les lobes N et C-terminaux de FPN1 (Billesbølle et al., 2020). Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence les rôles structuraux de résidus situés sur les deux lobes dans la liaison avec l'hepcidine. On peut citer la Tyr333 de FPN1 (Zhang et al., 2018c) qui formerait une liaison hydrogène avec la Met21 de l'hepcidine, les résidus Asp504 (Callebaut et al., 2014) et Tyr501 (Létocart et al., 2009) qui interagiraient avec la His3

de l'hepcidine, ou encore la liaison hydrogène entre les résidus Asn144 (Drakesmith et al., 2005) et Tyr501 qui stabiliseraient le réseau d'interactions. Par contre, le résidu Tyr64, qui serait en contact avec l'isoleucine en position 6 de l'hepcidine, ne semble pas être indispensable à la fixation de cette dernière, car la substitution de ce résidu n'entraîne pas de défaut d'interaction (Aschemeyer et al., 2018), mais le déplacement de l'hélice transmembranaire 2 autour de la Tyr64 pourrait être important pour l'ubiquitination de FPN1.

Problématique et objectifs de ma thèse

Ma thèse porte sur les surcharges en fer liées au gène *SLC40A1*. Nous venons de voir que les mutations touchant le gène *SLC40A1* sont responsables de deux pathologies distinctes, et que les analyses fonctionnelles et structurales permettent d'apprécier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, tout en permettant une interprétation précise des variations retrouvées chez les patients présentant une surcharge en fer. Ce dernier point est très important en clinique, et le cas du gène *SLC40A1* représente très bien les difficultés d'interprétation des variations faux-sens, pour plusieurs raisons :

- La rareté de la pathologie, bien qu'elle soit la seconde forme d'hémochromatose en termes de fréquence
- La rareté des mutations, qui sont, en dehors de quelques mutations récurrentes, privées
- L'hétérogénéité phénotypique, avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable, rendant difficile l'interprétation des données de la base gnomAD
- La dichotomie des variations, avec des variations perte et gain de fonction
- La prédominance, quasi exclusive, de variations faux-sens
- La présence de phénocopies, avec de nombreuses causes génétiques ou secondaires de surcharges en fer.

Ainsi, la découverte d'une variation rare non encore décrite du gène *SLC40A1* dans le bilan d'une surcharge en fer de suffit pas à conclure à sa pathogénicité, comme l'ont montré les travaux menés dans le laboratoire où j'ai réalisé ma thèse (Callebaut et al., 2014).

En 2015, Richards et al. ont proposé des recommandations pour l'interprétation des variations constitutionnelles (Richards et al., 2015), prenant en compte des arguments populationnels (présence du variant en population générale), structuraux (position de la variation, type de variation), de conservation, bibliographiques, fonctionnels et familiaux. Chaque argument a un poids différent pour l'interprétation des variations en cinq classes, de bénin à pathogène. L'utilisation de ces recommandations, qui ont été mises à jour régulièrement depuis la première publication, permet une aide pour le biologiste dans l'interprétation d'une variation. Cependant, les particularités de chaque gène et leur protéine, tant au niveau structural que fonctionnel, ne permettent pas toujours de classer de façon certaine les variations, notamment faux-sens, avec parfois la nécessité de l'aide d'un expert travaillant sur ce gène. Les particularités citées plus haut pour le cas des variations touchant le gène *SLC40A1* rendent difficiles leur interprétation en l'absence de données structurales et fonctionnelles.

Pour répondre à la question de l'interprétation des variations rares du gène *SLC40A1*, mon travail de thèse, plus précisément du premier chapitre, s'est articulé autour de ces objectifs :

-
- Apporter une aide à l'interprétation des variations rares du gène *SLC40A1*, à travers une revue des variations décrites dans la littérature, reclassées sur des bases fonctionnelles, structurales et *in silico*, de corrélations génotype/phénotype et la création d'une base de données locus-spécifique.
 - Améliorer la compréhension des mécanismes de résistance à l'hepcidine par la mise en place d'analyses fonctionnelles et structurales des variants du gène *SLC40A1* retrouvés dans le cadre du diagnostic moléculaire de surcharges en fer.

Article 1

Article 1 : The spectra of disease-causing mutations in the ferroportin 1 (SLC40A1) encoding gene and related iron overload phenotypes (hemochromatosis type 4, ferroportin disease)

Dans ce premier article, nous avons, à partir d'une revue de la littérature, entrepris un travail de recensement et classification de toutes les variations décrites, à la fois sur la base de la classification de l'ACMG, et d'autre part, pour les variations pathogènes, selon leur conséquence : perte ou gain de fonction. Nous avons tenté, pour les variations sans données fonctionnelles, de nous baser sur la structure 3D de la protéine pour permettre d'aider à l'interprétation. Nous avons également comparé différents outils de prédiction *in silico* disponibles sur les variations clairement pathogènes ou neutres, afin de déterminer la stratégie générant le moins de faux négatifs ou faux positifs pour classer d'éventuelles nouvelles variations.

Enfin, nous avons comparé les données phénotypiques disponibles en classant les patients comme suit :

- Maladie de la ferroportine pour les mutations perte-de-fonction
- Hémochromatose de type 4 pour les mutations gain-de-fonction
- Hyperferritinémie inexplicée pour les variations de signification incertaine et les variations neutres.

Nous affinons ainsi les phénotypes associés, bien que les données cliniques disponibles dans la littérature soient souvent incomplètes.

Toutes ces données ont été intégrées dans une base de données UMD ("Universal Mutation Database"), afin d'être accessibles à la communauté.

Cet article sera soumis à la revue Human Mutation dès que la base de données sera en ligne.

The spectra of disease-causing mutations in the ferroportin 1 (*SLC40A1*) encoding gene and related iron overload phenotypes (hemochromatosis type 4, ferroportin disease)

Kevin Uguen,^{1,2} Chandran Ka,^{1,2,3} Gwenaëlle Collod - Bérout,⁴ Marlène Le Tertre,^{1,2} Julie Guellec^{1,2,5},

Claude Férec,^{1,2,5} Christophe Bérout,⁴ Isabelle Callebaut,^{6*} Gérald Le Gac.^{1,2,3*}

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

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

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

⁴ Aix Marseille Univ, INSERM, Marseille Medical Genetics, Marseille, France.

⁵Association Gaétan Saleün, F-29200, France

⁶ Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, F-75005 Paris, France

* Authors share co-last authorship.

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

Abstract

SLC40A1 is the sole iron export protein reported in mammals and is key player in both cellular and systemic iron homeostasis. This unique iron exporter, which belongs to the Major Facilitator Superfamily, is predominantly regulated by the hyposideremic hormone hepcidin. SLC40A1 dysfunction causes Ferroportin Disease, and autosomal-dominant iron overload disorder characterized by cellular iron retention, principally in reticuloendothelial cells, correlating with high serum ferritin and low to normal transferrin saturation. Resistant to hepcidin SLC40A1 mutations are rather associated with elevated plasma iron and parenchymal iron deposition, a condition that resembles *HFE*-related hemochromatosis and is associated with more clinical complications. With very few exceptions, only missense variations are reported at the *SLC40A1* locus; this situation increasingly limits the establishment of pathogenicity. In this mutation update, we provide a comprehensive review of all the pathogenic or likely pathogenic variants, variants of unknown significance, and benign or likely benign *SLC40A1* variants. The classification is essentially determined using functional, structural, segregation and recurrence data. We furnish new information on genotype-phenotype correlations for loss-of-function, gain-of-function and other *SLC40A1* variants, confirming the existence of wide clinical heterogeneity and the potential for misdiagnosis. All information is recorded in a locus-specific online database that is accessible at <http://umd.be/SLC40A1/>.

KEYWORDS: Ferroportin 1, mutation spectrum, Ferroportin disease, Hemochromatosis type 4, UMD-*SLC40A1* Locus-specific database

1- INTRODUCTION

The solute carrier family 40 member 1 (SLC40A1), now preferably referred to as ferroportin 1 (FPN1), is the sole iron export protein reported in mammals and is a key player in both cellular and systemic iron homeostasis (Hentze et al., 2010; Drakesmith et al., 2015; Anderson and Frazer, 2017). It is expressed in all types of cells that handle major iron flow, including macrophages, duodenal enterocytes, hepatocytes, erythrocytes, and placenta syncytiotrophoblasts (Donovan et al., 2005; Zhang et al., 2018a, 2018b). SLC40A1 activity is predominantly regulated by the liver-derived peptide hepcidin which, depending on the cell type, induces internalization and degradation of SLC40A1 or blocks the SLC40A1-related iron transport mechanism (occlusive effect of hepcidin), thus decreasing iron delivery to plasma (Zhang et al., 2018a). The hepcidin-ferroportin 1 axis plays an important role in the pathogenesis of inherited and acquired iron metabolism disorders, including iron overload diseases and iron-restricted anemia (Girelli et al., 2016). Down-regulation of SLC40A1 has also been detected in various types of cancer, where it is thought to promote iron retention and cell proliferation (Kong et al., 2019).

The *SLC40A1* gene (LRG_837), which is located on chromosome 2 (2q32.2), is composed of eight coding exons that are spread on approximately 20kb of genomic DNA and give rise to a 571 amino acid protein of 62.5kDa (UniprotKB: Q9NP59). The reference transcript (ENST00000261024.6; NM_145585.5) contains an iron-responsive element (IRE) in its 5'-untranslated region (UTR), which allows for post-transcriptional regulation via the iron-responsive element/iron regulatory proteins (IRE/IRP) system as observed for other important iron metabolism genes (Muckenthaler et al., 2008). Under low-iron conditions, IRPs bind to the 5'-UTR IRE, resulting in inhibition of FPN1 translation and reduction of iron efflux from cells. It is noteworthy that duodenal epithelial and erythroid precursors cells express a shortened *SLC40A1* transcript (in addition to the canonical one), which encodes the full-length protein but lacks the IRE and thus escapes translational repression (Zhang et al., 2009).

SLC40A1 belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS), which is the largest group of phylogenetically related secondary active transporters (commonly called “SoLute Carriers”: SLCs). MFS proteins are present in cells across all life kingdoms, controlling the flow of a wide range of substrates (inorganic ions, metabolites, neurotransmitters and drugs) over lipid bilayers (Yan, 2015; Perland et al., 2017). Despite low sequence similarities, MFS members share a common architecture consisting in twelve transmembrane (TM) helices organized into two structurally similar lobes, each including 6 TMs (N-lobe: TM1-TM6; C-lobe: TM7-TM12). The two lobes are connected by a long and flexible intracellular loop that can be subjected to post-translational modifications, such as ubiquitination of FPN1 upon its downregulation by hepcidin (Qiao et al., 2012; Drew et al., 2021). They interact together and orchestrate transitions between two extreme conformational states, outward-(OF) and inward-facing (IF), according to the alternating access model of membrane transport (Quistgaard et al., 2016; Drew et al., 2021). During the structural transitions, the substrate sits at the approximate center of the transporter and is not accessible to either side of the membrane. Since 2015, the ferroportin three-dimensional (3D) structures of different organisms have been captured in distinct conformational states (Taniguchi et al., 2015; Deshpande et al., 2018; Billesbølle et al., 2020; Pan et al., 2020), with implications for our understanding of the molecular basis of the iron transport cycle and some important clues about mammalian or human specificities, and in particular those related to hepcidin regulation (Billesbølle et al., 2020; Le Tertre et al., 2021a).

The existence of an adult, autosomal dominant primary iron overload, soon regarded as an atypical form of hemochromatosis (HC) and now also referred to as ferroportin disease (FD) (Pietrangelo, 2017), was based on the description of two *SLC40A1* missense mutations, namely p.Ala77Asp and p.Asn144His, in Italian and Dutch pedigrees (Montosi et al., 2001; Njajou et al., 2001). The study of few other families (Le Gac and Férec, 2005) and the achievement of *in vitro* assays (Drakesmith et al., 2005; Schimanski et al., 2005) then revealed the existence of two functional categories of *SLC40A1* gene mutations underlying two distinct clinical entities. Loss-of-function (LOF) mutations, such as p.Ala77Asp, affect cellular localization of SLC40A1 and/or its iron export function.

This results in cellular iron retention, principally in reticuloendothelial cells, and relative plasma iron deficiency. Laboratory tests show a significant increase in serum ferritin, which contrasts with a normal or slightly increased transferrin saturation. As the disease progresses, iron is deposited in parenchymal cells, normally accompanied by a rise in transferrin saturation. This iron overload phenotype, which has historically been associated with HC type 4A, is typical of FD. Gain-of-function (GOF) mutations, such as p.Asp144His, result in partial to complete resistance to hepcidin. This leads to excessive iron export to the bloodstream, increased transferrin saturation and progressive iron accumulation in parenchymal cells (primarily hepatocytes). These biologic and histologic features mimic the natural history of *HFE*-related HC; hence, GOF *SLC40A1* mutations are associated with HC type 4 (historically referred to as HC type 4B, and nowadays also described as non-classical FD) (Vlasveld et al., 2019; Piperno et al., 2020).

The interpretation of missense variations and their association with disease phenotypes is one of the greatest challenges in medical genetics. This is particularly true for *SLC40A1*-related diseases, which are overwhelmingly associated with rare or private missense variations and are characterized by incomplete penetrance and variable expressivity, with several phenocopies that may confound clinical diagnosis (Vlasveld et al., 2019). Pedigree analyses have revealed the influence of age and sex in the progression of iron overload, with clinical phenotypes being mainly observed in adult males (Le Lan et al., 2011). Phenocopy, defined as an environmentally induced, non-hereditary phenotype that mimics one produced by a gene (Klein et al., 2011), is a growing concern due to increasing descriptions of variants in isolated individuals with hyperferritinemia. In clinical practice, mild elevations of serum ferritin (300-1,000 µg/L) are predominantly related to non-genetic conditions, the majority of which are not the result of true iron overload (Wong and Adams, 2006; Adams and Barton, 2011). *In vitro* assays are increasingly used to differentiate causal mutations from neutral variations identified in suspected FD or HC type 4 patients. Some experimental data are however questionable, with no obvious relationship with clinical observations (Vlasveld et al., 2019). Various *in silico* prediction tools have also been tested but have not yet been found to be very

informative (Mayr et al., 2010; Vlasveld et al., 2019), probably due to the non-consideration of the molecular-level effect of missense variants in the context of SLC40A1 3D structures. The problem may be exacerbated by the existence of several distinct disease mechanisms, some of which depend on specific groups of amino acids (Aschemeyer et al., 2018a; Guellec et al., 2019).

In this study we provide an overview of all *SLC40A1* variants that were published before January 2022. *SLC40A1* variants associated with relevant phenotypical data were manually curated and entered into a new UMD locus specific database at <http://umd.be/SLC40A1/>. We summarize the latest *in vitro* data and provide a structural rationalization of LOF and GOF mutations. We re-evaluate *in silico* prediction tools and classify all the curated variants according to the American College of Medical Genetics (ACMG) and Association for Molecular Pathology (AMP) guidelines. We finally discuss the biological effect and clinical relevance of pathogenic or likely pathogenic mutations and variants of unknown significance.

2- VARIANTS

Each published variation was checked for accuracy and named, or curated, using the Human Genome Variation Society nomenclature (<https://varnomen.hgvs.org/>) and the canonical full-length reference transcript NM_014585.5 (in human genome GRCh37). We did not include three non-coding variations (c.-181A>G, c.-428-427GG>TT and c.-59-45del) with no known functional impact, and further excluded nine missense variations (p.Ala45Glu, p.Ala69Val, p.Ser71Phe, p.Trp158Leu, p.Asn185Thr, p.Ala232Asp, p.Gly267Asp, p.Arg371TRp, p.Arg371Gln) due to the lack of phenotypic information (Cremonesi et al., 2005; Cunat et al., 2007; Relvas et al., 2009; Le Lan et al., 2011; Del-Castillo-Rueda et al., 2012). Of the total 65 variants compiled in Table 1, 40 were found in single patients or single families (62%), 21 were recurrent in up to four families (32%) and only four (p.Arg178Gln and p.Gly490Asp, p.Gly80Ser, p.Val162del) were reported in nine, 12 and 20 families, respectively (6%). The missense variation type is almost exclusive (98%); apart from this type of variation, only the p.Val162 single-amino-acid in-frame deletion has been consistently associated with iron overload

phenotypes. The p.Gly468Ser substitution must be considered separately, in that the underlying c.1402G>A transition disrupts the exon 7 donor site, resulting in the use of an exonic cryptic splice site and the generation of a truncated reading frame (Lee et al., 2007; Le Tertre et al., 2021b), while the Gly468 to Ser amino acid change by itself has no obvious effect on the ability of SLC40A1 to export iron (Le Tertre et al., 2021b). The variants included in the study ultimately correspond to 48 different amino acids (of the 571 that make up the human FPN1 protein); distribution shown in Figure 1.

2.1- Functional annotation of *SLC40A1* variants according to *in vitro* analyses

The available experimental information, taken from 28 publications and a variety of heterologous cell-based assays (Table 1), was manually curated and used for *SLC40A1* variants classification into “loss-of-function” (LoF), “gain-of-function” (GoF) or “neutral” categories. Twenty-one (of 65) *SLC40A1* variants that were proven to reduce cell surface expression and/or result in decreased iron export (impact on FPN1 biogenesis or its conformational changes within the lipid bilayer) were classified as LoF (colored in green in Figure 1A). Eighteen *SLC40A1* variants that did not significantly alter cell surface expression and iron export, but were shown to confer total or partial resistance to hepcidin, were classified as GoF (colored in red in Figure 1A). Eight *SLC40A1* variants that produced no obvious change from the wild-type protein were listed as “neutral” (colored in blue in Figure 1A). It is important to mention that the eight variants were also investigated for their possible effect on pre-mRNA splicing and that no abnormalities were found (Callebaut et al., 2014).

No functional data was available for 17 missense variants, while we decided to ignore those published for the p.Ser209Leu substitution because of a fairly obvious discrepancy between the assumption made by An P. and collaborators about a gain-of-function mechanism (An et al., 2017) and the phenotypic data provided by the authors in two distinct publications (An et al., 2017; Wang et al., 2017).

Ten of the eighteen missense variants without functional data were at the same eight positions (Tyr64, Gly80, Arg88, Asn144, Asp157, Leu233, Cys326, Arg329) than substitutions that were analyzed *in vitro* and recognized as either LoF or GoF mutations (colored in grey in Figure 1A). Five of the eight residues thus considered were found to be strictly conserved in all vertebrates (Supplementary Figure 1), whereas the remaining three (Asn144, Cys326, Leu233) diverged only in bacteria. We examined the difference for each amino acid pairs in terms of side chain atoms composition, polarity and volume by using the Grantham matrix (Grantham, 1974; Li et al., 1984). The Grantham score (GS) for the 10 amino acid changes without functional data ranged from 23 to 205 (corresponding to an exchange between two amino acids separated by a very small physiochemical distance, and a very important physiochemical distance, respectively). Six substitutions were predicted to be conservative (p.Asp157Asn, p.Asn144Ser, p.Leu233Val; Grantham score: 0-50) or moderately conservative (p.Tyr64His, p.Arg88Thr, p.Arg88Ile; Grantham score: 51-100) with lower GS scores than substitutions functionally described as pathogenic (*e.g.* p.Asp157Tyr, p.Asp157Gly, p.Asn144His, p.Asn144Thr, p.Leu233Pro, p.Tyr64Asn, p.Arg88Gly). Conversely, four substitutions were classified as moderately radical (p.Gly80Val, p.Asp157Ala, p.Arg489Ser; Grantham score: 101-150) or radical (p.Cys326Phe; Grantham score >150) with higher GS scores than substitutions functionally described as pathogenic (*e.g.* p. Gly80Ser, Asp157Gly, p.Arg489Lys, p.Cys326Ser, p.Cys326Tyr). Although interesting, these few observations did not take into account the structural features of the protein; therefore, they were not considered sufficient to predict the deleteriousness of the variants (also see section 2.3).

The functional importance of Leu129, Val160, Arg179, Ser209, Ala350, Gly494, Val511 and Val531 (colored in orange in Figure 1A) is yet to be elucidated. The eight residues are relatively well conserved in vertebrates (Supplementary Figure 1), suggesting the existence of structural and/or functional constraints, but they occur in regions of the protein whose functional importance has not yet been specified. The cellular effects of changes at these positions thus remain elusive.

2.2- *SLC40A1* variant spectrum and structural rationalization of LoF and GoF mutations

As illustrated in Figure 1A, the 65 variants investigated in this study have been identified throughout the *SLC40A1* coding sequence, with the exception of exons 1 and 2. No hotspot can be clearly defined, although ten residues are found to be recurrently mutated: p.Tyr64, p.Gly80, p.Arg88, p.Asn144n, p.Asp157, p.Gly204, p.Leu233, p.Cys326, p.Arg489 and p.Gly490. Functionally characterized LoF (variants in green) or GoF (variants in red) have been reported at any of these 10 amino acid positions. Similarly, variants have been identified in various topological regions of the *SLC40A1* protein, with the exception of the N-terminus and the transmembrane helices 1, 9 and 10 (Figure 1B).

Billesbølle *et al.* recently used cryo-electron microscopy to solve three-dimensional structures of human *SLC40A1* (HsSLC40A1) in the outward-facing conformational state, which is regarded as the basal state (Billesbølle *et al.*, 2020). The mapping of disease-causing mutations on the HsSLC40A1 3D structure with hepcidin (pdb 6WBV) leads to observe a clear separate distribution into functional subtypes (Figure 2). The loss-of-function missense mutations are rather located at the cytoplasmic interface (Figure 2A) suggesting that this region may be important for the iron export function. This point was already made by Wallace and collaborators over 10 years ago (Wallace *et al.*, 2010), based on *de novo* 3D structure models. As a matter of fact, we have shown that the intracellular gate, which regulates access from the cytoplasm to the central substrate-binding pocket (or central cavity), is stabilized by non-covalent interactions (salt bridges and hydrogen bonds) between the TM2, TM3, TM4 and TM11 transmembrane helices, on the one hand, and the TM5 and TM10 transmembrane helices, on the other hand (Guellec *et al.*, 2019). We identified 12 residues (Asp81, Asp84, Lys85, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, Asp473, Gln478, Arg489, Gly490, Ile491) that are critical for protein stability and/or conformational changes during the iron transport cycle. We pointed out that a total of 13 missense variations affecting 7 (Asp84, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, and Gly490) of the 12 considered gating residues were reported in 77 patients with common features

of FD. These missense variations could be responsible for two distinct loss-of-function mechanisms: protein misfolding and reduced expression on the cell surface, or failure to export iron (Ka et al., 2018; Vlasveld and Swinkels, 2018; Guellec et al., 2019). The gain-of-function mutations are rather concentrated around the central cavity (Figure 2B), which actually contains two divalent metal-binding sites (one in each lobe) and the hepcidin-binding site (Billesbølle et al., 2020). This last one is centered on the Cys326 residue, which is strictly conserved in all vertebrates and may have evolved in conjunction with hepcidin to control systemic iron homeostasis (Nemeth and Ganz, 2021). At first glance, a functional dichotomy seemed to emerge between missense mutations located in the C-lobe, in particular those affecting positions Cys326, Asp504 and His507, which were associated with the highest degree of hepcidin resistance, and missense mutations located in the N-lobe, in particular those affecting the recurrently mutated Gly204 and Asn144 positions, which were found to induce partial resistance to hepcidin (Le Tertre et al., 2017). But things could actually be more complex and depend on the effect of mutations on hepcidin binding (on each lobe) and/or hepcidin-dependent ubiquitination (in the case of hepcidin-induced endocytosis and degradation of SLC40A1) following subtle conformational changes (Aschemeyer et al., 2018a; Billesbølle et al., 2020). The effects of different mutations may also vary depending on the cell type (Aschemeyer et al., 2018).

2.3- Structural annotation of *SLC40A1* missense variants without functional data

The evolutionary conservation of amino acids (Supplementary Figure 1) and the Grantham scores presented in section 2.1 provide some interesting clues about the biochemical consequences of the *SLC40A1* substitutions for which no functional data are currently available, but they do not account for the context of the protein 3D structure and dynamics, nor its biology and interactions with the lipid membrane environment. To better predict effects of the *SCL40A1* missense variants occurring at recurrently mutated positions, especially those that are more likely to be tolerated (substitution with chemical similar amino acids), we leveraged the 3D structure of human SLC40A1 (in its outward-open

facing conformation) taking into account current knowledge about the iron export mechanism and its regulation by hepcidin.

As aforesaid, Arg88, Asp157 and Arg489 play a critical role in the architecture of the human SLC40A1 intracellular gate (Guellec et al., 2019). The loss of a salt bridge in the cytoplasmic network connecting these three charged amino acids can result in folding defects in TM helices TM3, TM4 or TM11 and their assembly or local instability of the SLC40A1 structure in its outward-open conformation. In this regard, it is very likely that the p.Arg88Thr, p.Arg88Ile, p.Asp157Asn, p.Asp157Ala and p.Arg489Ser missense variants reduce ability of SLC40A1 to export iron out of cells.

As shown in Figure 3A, some other 3D structure features are likely to contribute to the stability of the human SLC40A1 inner gate. First, a tight packing of the helices TM2 and TM11 is ensured by two glycine zipper motifs (formed on the one hand by TM2 Gly76 and Gly80 and on the other hand by TM11 Gly490 and Gly494), which face each other. The glycine-to-aspartic acid 494 substitution in such an environment is predicted to cause local structure instability, as the p.Gly490Asp substitution which appears to be particularly frequent in patients originating from the Reunion Island and has been associated with a significant reduction of the SLC40A1 cell-surface expression (Callebaut et al., 2014). Second, an additional bond (H bond) is formed between the side chain of Arg88 and the oxygen main chain atom of Leu233, further stabilizing the Arg489-Asp157-Arg88 interaction network. The Leu hydrophobic amino acid, which emerges at the end of a short helix that is located immediately after TM6, also makes CH- π contacts with Trp158 within the hydrophobic core of the gate. The leucine-to-proline 233 substitution, which has also been proven to reduce the cell surface expression of SLC40A1 (Callebaut et al., 2014), is likely to affect the interaction with Trp158, but also, via a modification of the local conformation of the short helix, lead to the loss of the H bond with Arg88. The p.Leu233Val missense mutation might have a more moderate effect, impairing the interaction with Trp158 without necessarily affecting the conformation of the small helix and the H bond with Arg88.

It has previously been established that the thiol group in the side chain of Cys326 in the SLC40A1 C-lobe is mandatory for hepcidin binding (Preza et al., 2008), and it has recently been demonstrated that the sulfur atom of this particular amino acid interacts with the main-chain oxygen atoms (O and OXT) of hepcidin Thr25 (3.28 et 3.78 Å; Figure 3B) (Billesbølle et al., 2020). As the functionally characterized and well-defined p.Cys326Ser and p.Cys326Tyr GoF mutants (Table 1), it must therefore be assumed that the p.Cys326Phe missense variant hampers the post-translational regulation of SLC40A1 by hepcidin.

As shown in Figure 3B, Tyr64 and Asn144 make part of the hepcidin binding pocket within the SLC40A1 N-lobe. The Asn144 side chain atoms interact with the hydroxyl atom of Tyr501 (3.4 Å and 3.7 Å with the OD1 and ND2 atoms of Asn144), which stacks with the imidazole side chain of hepcidin His3. Tyr64 is located less deeply in the pocket, interacting with hepcidin Phe4 and Ile6, and it has been suggested that the outward displacement of TM2 near this amino acid pun hepcidin binding play a key role in SLC40A1 ubiquitination (Billesbølle et al., 2020). In support to this idea, the p.Tyr64Asn missense mutation has been consistently reported to reduce SLC40A1 ubiquitination and prevent its intracellular degradation, without altering hepcidin binding (Fernandes et al., 2009; Aschemeyer et al., 2018). It can be assumed that the p.Tyr64His substitution produces similar effects. Regarding the SLC40A1-Tyr501/Hepcidin-His3 interaction, it is worthwhile to remember the results obtained by Aschemeyer and her collaborators showing that the p.Tyr501Cys mutant is no longer able to interact with hepcidin, in a manner comparable to the p.Cys326Ser mutant (Aschemeyer et al., 2018). Less obvious, perhaps, is the situation of the mutants described at the Asn144 position (p.Asn144His, p.Asn144Asp and Asn144Thr), which have been investigated by different groups and have been most commonly reported as partial GoF variants with no formal demonstration of a loss of interaction between hepcidin and SLC40A1 (all references provided in Table 1). This is well exemplified by the p.Asn144Asp variant which has been alternatively described as a variant that prevents binding to hepcidin (Aschemeyer et al., 2018), and as a variant that does not (or in a very

partial manner; Fernandes et al., 2009), although both studies indicate that SLC40A1 resistance to hepcidin is incomplete.

2.4- Performance of *in silico* prediction tools for the classification of SLC40A1 missense variants

There are a number of software algorithms which can be used to predict the impact of novel missense variants on protein function. In the present study, we evaluated the performance and reliability of ten prediction tools commonly used in medical genetics and by different web-based classification tools, namely, SIFT (Ng and Henikoff, 2001), PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010), Mutation Taster2 (Schwarz et al., 2014), GERP++ (Davydov et al., 2010), MetaLR (Dong et al., 2015), MetaSVM (Dong et al., 2015), UMD-Predictor (Salgado et al., 2016), REVEL (Ioannidis et al., 2016), CADD (Kircher et al., 2014; Rentzsch et al., 2019) and DANN (Quang et al., 2015).

Our evaluation set included 27 LoF variants (20 annotated on the basis of experimental data and 7 annotated on the basis of structural analysis; see the previous sections), 21 GoF variants (18 annotated on the basis of experimental data and 3 annotated on the basis of structural analysis) and 8 neutrals variants (the only ones for which functional data have been published to date; Callebaut et al., 2014). By comparing the predictions made by stand-alone tools, we identified Mutation Taster as the only computational approach that did not result in false negative predictions (Supplementary Table 1). We found four LoF missense variant and seven GOF missense variants that were wrongly categorized as neutral by at least one of the other nine *in silico* tools; SIFT having the lowest sensitivity (79.6%). All tools suffered from a lack of specificity, resulting in an excessive rate of variants classified as pathogenic at the forefront of which is Mutation Taster. Seven neutral variants were thus wrongly classified by at least two computational predictors. Two of these variants (p.Ile180Thr and p.Leu345Phe) were misclassified by all ten tools.

By combining the predictions made by two neural networks, namely CADD and REVEL, we reached a positive predictive value (PPV) of 95,7% (44 true positive variants *versus* 2 false positive variants). It is important to note that the four p.Asp270Val, p.Ser338Arg, p.Lys140Glu and

p.Arg296Gln amino acid changes were not included in the PPV calculation because they were correctly classified by only one of the two selected tools (Supplementary Figure 2A). It is also important to emphasize that the two p.Ile180Thr and p.Leu345Phe neutral variants were still wrongly categorized as pathogenic by CADD and REVEL. The sensitivity of the combined approach was 100% (CADD: 95.8%; REVEL: 97.9%), and the specificity was 71.4% (CADD: 62.5%; REVEL: 75.0%); still only considering the 52 (of 57; 91.1%) *SLC40A1* missense variants that did not show conflicting predictions.

The fact that the p.Ile180Thr and p.Leu345Phe variants are systematically classified as pathogenic by the prediction tools may seem curious. Indeed, the two residues are well conserved between species, with the exception of the leucine residue that is changed by a phenylalanine in the primary sequence of the bacterial homologue BpFPN. Furthermore, both residues are located on the hydrophobic side of transmembrane helices (TM5 and TM8, respectively). The hydrophobic character is, however, conserved at these two positions for the observed missense variations, which should therefore not be structurally damaging. Another possible explanation is that the two variants were overlooked due to inappropriate *in vitro* methodologies. It is advisable to remember here that the ACMG/AMP framework assigns strong weight to *in vitro* findings, but not stand-alone (Richards et al., 2015), owing that the biological complexity of a protein cannot be fully reproduced in cellular models.

In an attempt to go one step further, we finally compared the predictions made by CADD and REVEL for the 59 *SLC40A1* substitutions referenced in the public Genome Aggregation Database (GnomAD; V2.2.1) with a frequency > 0.00001 and for the 63 missense variations selected in this study (Table 1). Regardless of the tool considered, the set from GnomAD was highly enriched in variants predicted as benign (CADD median score: 18.47 vs. 25.02; REVEL median score: 0.38 vs. 0.76; $p < 0.0001$) (Supplementary Figure 2B). However, by combining CADD and REVEL, we noted that 12 of the GnomAD variants, or about 20%, were predicted to be deleterious (Supplementary Figure 2A).

A major limitation of this evaluation of *in silico* prediction tools is the low proportion of missense variants recognized as benign. An ideal dataset would have as many true positives as true negatives. As they stand, our observations are consistent with a variety of results from similar studies (Leong et al., 2015; Miosge et al., 2015; Ernst et al., 2018; Meléndez-Aranda et al., 2019), each confirming that computational methods generate a low rate of false negative but a high rate of false positive. The combination of CADD and REVEL did not overcome this drawback for *SLC40A1* variants. At best, it may help focus resources on variants that could warrant family studies and/or functional explorations.

3- The UMD-*SLC40A1* database

We have established a web-based, manually curated database that gives a complete overview of the *SLC40A1* variants which have been published in the medical literature and have been associated with mild to severe iron overload phenotypes. This database has been developed to aid both clinicians and scientists. It has been constructed from the generic software called UMD ("Universal Mutation Database"; Bérout et al., 2000), which is today recognized by the Human Genome Organization (HUGO) and the Human Genome Variation Society (HGVS) as a reference tool to build the Locus Specific Databases (LSDB). All the software has been built with the 4th Dimensional language (4D). *UMD-SLC40A1* is a dynamic database, in the meaning that it also includes various computerized tools for the analysis of variants. Project and online publishing was approved by the French supervisory authority ("Commission Nationale pour l'Informatique et les Libertés"; registration no. 908361) and the national ethics committee, Comité Consultatif pour le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (no. 07.421), and registered under no. 91513. The database will be freely accessible online at <http://umd.be/SLC40A1/>.

UMD-SLC40A1 currently contains the 65 variants presented in this article, which have been split into 336 entries (one per patient). We excluded a few patients harboring the p.Arg88Gly, p.Cys326Ser, p.Asp181Val, p.Gly204Ser, p.His507Arg or p.Ser209Leu missense mutation due to the

lack of individual phenotypic information (Sham et al., 2005; Santos et al., 2011; Détivaud et al., 2013; Prschberger et al., 2014; Yamakawa et al., 2016; An et al., 2017a). A unique entry number was created for each patient and second number was generated for each family; relatives (N=196) were assigned a number based on the index case (N=140) and the family numbers. Phenotypic data had to include gender, age at diagnosis, transferrin saturation and serum ferritin. Other clinical data were systematically recorded when available; these included: laboratory findings (hemoglobin, hematocrit, red blood cells, mean corpuscular volume, C-reactive protein, γ -glutamyl transferase, aspartate transaminase, alanine transaminase, ...). Magnetic Resonance Imaging and/or biopsy data (hepatic iron concentration, tissue-specific localization of iron) and clinical manifestation of iron overload (asthenia, arthralgia, skin pigmentation, type 1 or type 2 diabetes mellitus). Patterns of excessive alcohol consumption and the metabolic syndrome, which cause hyperferritinemia, with or without associated iron overload, were also documented. The standard PubMed identifier (PMID) of each publication where phenotypic data were retrieved was entered into the database and linked to the relevant entry numbers. Relatives with negative *SLC40A1* genetic testing were not included in the database.

Each variant was classified using a process consistent with the guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology in one of the following five classes (Richards et al., 2015): benign variant (BV, class 1), likely benign variant (LBV, class 2), variant of uncertain significance (VUS, class 3), likely pathogenic variant (LPV, class 4), and pathogenic variant (PV, class 5). We informed manually the criteria based on our literature review and the GnomAD population database. For familial segregation, we calculated the co-segregation score as described by Jarvik *et al.* (Jarvik and Browning, 2016). We used the strong evidence codes PS3 (abnormal protein function) and BS3 (normal protein function) for 47 missense variants with validated *in vitro* functional characterization (see section 2.1). We chose to extend the PS3 score to 10 variants corresponding to recurrently altered positions and for which we could provide structural evidence of pathogenicity (see sections 2.1 and 2.3). We also did this for the p.Gly494Asp variant that

is predicted to be deleterious by all *in silico* tools (Supplementary Table 1) and is very likely to alter interactions between the human SLC40A1 N- and C-lobes in the outward-facing conformation (see section 2.3). We reserved the PP3 (multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the protein) score for the p.Leu233Pro, p.Val160Ala, p.Arg179Thr, p.Ala350Asp, p.Val511Ile and p.Val531Ala variants that had not been functionally assessed and had a CADD score > 20 and a REVEL score > 0.5. We did not assign the PP3 score, nor the BP4 (multiple lines of computational evidence suggest no impact on the protein) score to the p.Ser209Leu variant that led to divergent predictions.

Overall, we have described each variant in accordance with its: i) positions in the *SLC40A1* gene (c.) and the human SLC40A1 protein (p.), also considering the protein structure (TM: transmembrane helices; ECL or ICL: extra- or intracellular loops), ii) reported functional effect (loss-of-function, gain-of-function, neutral), iii) ACMG/AMP classification, and iv) relationship with clinical phenotypes (ferroportin disease, hemochromatosis type 4, unexplained hyperferritinemia).

4- Clinical relevance of *SLC40A1* variants and genotype-phenotype correlations

Among the phenotypes associated with *SLC40A1* pathogenic or likely pathogenic mutations, Ferroportin Disease appears to be the most widely represented, with 29 loss-of-function mutations identified in 227 patients (96 index cases and 131 relatives). Hemochromatosis type 4 is associated with 21 gain-of-function mutations, identified in a total of 81 patients (27 index cases and 54 relatives). Unexplained hyperferritinemia only concerns 35 patients (22 index cases and 13 relatives), 17 of which have a variant that remains classified as a variant of uncertain significance and 18 have a benign or likely benign variant. The clinical characteristics and outcomes of all 343 patients are shown in Supplementary Table 2.

FD, HC4 and UH probands were identified at similar ages (Figure 4A, and Table 2), most often after age 40 (mean, 44.6, 48.7 and 51.7 years, respectively). However, they presented different biological profiles (Figure 4B and 4C). Serum ferritin concentrations were significantly higher in FD and HC4 patients (median, 2,258 µg/L interquartile range: [1,292; 4,356] and 2,195 µg/L [1,000;

4,326] vs. 1,008 μ g/L [777; 1,733]; $p < 0.0001$), while transferrin saturation levels were significantly higher in HC4 patients (mean, 83 vs. 37 and 45%; $p < 0.0001$). A fairly clear division also appeared between FD and HC4 probands when transferrin saturation and serum ferritin were matched together (Figure 4D).

FD is characterized by iron accumulation in macrophages, leading to increased production of ferritin and it releases into plasma. This can occur quite early in life (Pietrangelo, 2017), and can continue until very high serum ferritin concentrations that do not necessarily correlate with body iron stores (Piperno et al., 2020). This is well illustrated in Figure 5A, which shows a positive correlation between age and serum ferritin in patients with a LoF mutation ($r = 0.413$, $p < 0.0001$). Further data are provided in Figure 5B, showing a clear distinction in the ferritin/age ratio between LoF mutation patients and both GoF mutation patients and ACMG classes 1-3 variant patients. At referral (i.e. diagnosis or familial screening), 75% of LoF mutation patients had a ferritin/age ratio ≥ 28.1 ; this value was reached by only 38% of GoF mutation patients and 20% of patients with an unrecognized pathogenic variant.

HC type 4 is usually associated with parenchymal iron deposition similar to *HFE*-related hemochromatosis, and other rare forms of the disease resulting from inadequate levels of serum hepcidin to control systemic iron homeostasis. An elevated transferrin saturation level is considered a sign of early disease, which always precedes an elevated serum ferritin. This is well illustrated in Figure 5C, which shows a very clear separation of patient groups according to mutation classes. Interestingly, patients with GoF mutations located within the FPN1 C-lobe had higher transferrin saturation values. There was no clear association with age at diagnosis compared with the group of patients with GoF mutations located in the FPN1 N-lobe (Supplementary Figures 3A and 3B). Rather, this could be a consequence of more important hepcidin resistance effects, especially for mutations that affect critical residues (hepcidin and/or iron binding) in transmembrane helices 7 and 11. With a slightly larger data set than that constituted by Zhang et al. in 2018, we confirm another interesting

observation, which is the positive correlation between transferrin saturation and size of the red blood cells in GoF mutation patients (Figure 5D; $r=0.665$, $p<0001$). The cellular mechanism leading to this observation is not well understood, but it might be related to the specific function of SLC40A1 in erythroid cells to support hemoglobin production while avoiding iron toxicity and participating in the maintenance of systemic iron homeostasis (Zhang et al., 2018).

Information on clinical manifestation in patients with disease-causing mutations are quite sparse in literature (Figure 5E). This is particularly true for patients with a LoF mutation, which may suggest that macrophages are relatively tolerant to iron accumulation. Over time, however, iron can escape into the bloodstream, resulting in increased transferrin saturation as showed in Supplementary Figures 3C and 3D and iron deposition in parenchymal cells. This makes more likely iron-induced oxidative stress and tissue injury (Piperno et al., 2020). In line with this idea, we observed that 10 of the 16 LoF mutations patients in whom liver fibrosis had been reported also had high transferrin saturation levels ($\geq 60\%$ in men, $\geq 50\%$ in women); pointing that three transferrin saturation values were missing in the 16 considered patients. GoF mutation patients had the highest proportions of clinical signs. They also presented with higher aspartate (47 vs. 27 UI/L; $p<0.01$) and alanine transaminase (83 vs. 31 UI/L; $p<0.01$) values (Table 2), which is classically considered a sign of hepatocellular injury.

There is a general trend toward mild hyperferritinemia without evidence of plasma iron overload (transferrin saturation level $<50\%$ in females and $<60\%$ in males) in patients with variants classified in ACMG categories 1-3 (Figures 4B-D and Figure 5C) and, rather unexpectedly, this trend is more evident in patients with a variant of uncertain significance (Supplementary Figures 3E and 3F). It should be mentioned here that two variants with questionable classification, namely p.Leu129Pro and p.Ser209Leu, account for a total of three probands and nine relatives (Supplementary Table 3). Iron parameters in the three probands were rather suggestive of FD. However, none of them had a serum ferritin greater than 1000 $\mu\text{g/L}$ in age at diagnosis between 43 and 59 years. Although the

penetrance of the different variants associated with FD is thought to be incomplete, it can further be noted that none of the relatives with the p.Leu129Pro had serum ferritin concentrations clearly above the normal range (338 µg/L at most in a 73 year-old male). The p.Ser209Leu variant was studied *in vitro* but, contrary to what the phenotypes of the 7 patients of Asian origin reported in the literature suggest, it was associated with a GoF effect (An et al., 2017). Also, it is not very rare in the general population (allele frequency in the Genome Aggregation Database V2.1.1 = 0.01%), and more particularly in the eastern region of Asia where its estimating allele frequency reaches 0.06%. New phenotypic data and improved functional analysis would allow to reclassify the two variants, most likely as non-pathogenic.

5- CONCLUSION AND FUTURE PROSPECTS

With the increasing description of case reports in the literature, or small family structures with hyperferritinemia, phenotyping is emerging as an important source of uncertainty in the diagnosis of FD and HC4. In such a context, no physician prescribing a genetic test should forget that approximately 90% of patients with mildly elevated serum ferritin do not have iron overload (Wong and Adams, 2006; Adams and Barton, 2011), and that Magnetic Resonance Imaging of the abdomen is a very reliable noninvasive tool to confirm iron excess in the liver, spleen and/or bone marrow and possibly categorize FD and HC4 (Pietrangelo et al., 2006). On the other hand, no biologist should forget that benign, but rare, missense variants represent a non-negligible part of human genetic diversity (Gudmundsson et al., 2022), and that this also applies to the *SLC40A1* gene. Less than one third of the 213 missense variants reported in GnomAD at a frequency <0.01% are actually suspected to cause iron overload. The “Ferroportin score” very recently proposed by Landemaine and her collaborators to increase the proficiency of genetic testing for FD (Landemaine et al., 2022), could conceivably also be used to better distinguish pathogenic loss-of-function mutations from neutral rare variants identified by chance in patients with a secondary (but perhaps not clearly defined) cause of hyperferritinemia.

We have established a web-based database which gives a comprehensive update of the all uncommon *SLC40A1* coding variants that have been described in literature and individually associated with biological and clinical findings. It will help investigators and clinicians to better distinguish causal mutations from rare polymorphisms. Our database will also allow inclusion of new cases, hoping to contribute something even more determinant in the progression of knowledge and understanding of the molecular bases of FD and HC4. There is considerable variation in the data currently available regarding the onset, progression and type of clinical manifestations that a patient may develop. The cause of this variability is not fully understood and can only be partially explained by a lack of penetrance, the influence of non-genetic factors, and the description of two categories of causative mutations.

That almost all of the variants described at the *SLC40A1* locus correspond to missense variants undeniably represents an important challenge in the quest for an optimal clinical interpretation, and state-of-the-art prediction tools do not really help. False-negative predictions are rare, and Mutation Taster might be judged an appropriate approach for pathogenicity exclusion (at least), but specificity is a recurrent problem that mandates the use of additional data. Interestingly, we have noted that mechanisms associated with the pathogenesis of LoF and GoF missense variants pretty well correlate with particular regions of the *SLC40A1* three-dimensional structure. Similar observations have been made in the context of many other genetic diseases (Quinodoz et al., 2022). The combination of structural and functional analyses is a promising way to further clarify the *SLC40A1* biology and the molecular mechanism of down-regulation by hepcidin and, by the way, improve predictions of pathogenicity.

LEGEND TO FIGURES AND TABLES

Figure 1. Distribution of the 65 selected variants along the *SLC40A1* gene and the secondary structure of the *SLC40A1* protein. (A) The *SLC40A1* sequence is represented as a horizontal bar and each of the segments correspond to individual exons (coding parts in blue, 5' and 3' untranslated

regions in grey), in proportional size and numbered. Introns are represented as a short non-proportional line linking exons. Banners above or below the coding sequence indicate the positions of all variations included in Table 1. Variations that have been studied *in vitro* are presented in green (loss-of-function), red (gain-of-function) or blue (no functional impact). Missense variations with no functional evidence of deleteriousness or neutrality are presented in grey (for 10 substitutions that occur at the same 8 positions than other variations described as LoF or GoF) or orange (for 8 substitutions that occur at 8 positions where no well-recognized pathogenic variants has been seen to date). (B) The 48 amino acid positions known to be mutated in patients with various iron overload phenotypes, reported on the secondary structure topology of the human SLC40A1; amino acids for which variations are associated with a functional defect are colored in green (LoF) or red (GoF), whereas those for which no substitution has been characterized functionally are colored in orange.

Figure 2. Ribbon representation of the 3D structure of human SLC40A1 in complex with (pdb 6WBV), highlighting the particular distribution of the loss- (A) and gain-of-function mutations (B).

The hepcidin hyposideremic hormone is colored in magenta. Amino acids for which mutations are reported as LoF are colored in green, whereas those for which mutations are reported as GoF are colored in red. Banners indicate the considered amino acids changes and their positions within the protein. The positions of the two divalent metal-binding sites within the central cavity are delimited by blue ellipses.

Figure 3. Close-up views of the 3D structure of human SLC40A1 (pdb 6WBV).

(A) Ribbon representation of the inner gate in which amino acids discussed in section 2.3 are highlighted in atomic details. (B) Left: Solvent accessible surface of SLC40A1, with the bound hepcidin displayed in a ribbon representation. Tyr64, Asn144 and Cys326 are colored red (oxygen atom), blue (nitrogen atom) and yellow (sulfur atom), respectively. Right: focus on Tyr64, Asn144 and Cys326. Hepcidin is shown in blue.

Figure 4. Iron overload profiles of the 96 probands with ferroportin disease (FD), 27 probands with hemochromatosis type 4 (HC4), and 22 probands with unexplained hyperferritinemia (UH). Distributions of Age (A), Serum Ferritin (B) and Transferrin Saturation (C); medians (white dot on the violin plots) and interquartile ranges (the black bars in the center of violins) are shown. P values were calculated on Student t-test; ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$. (D) Relationship between serum ferritin and transferrin saturation in FD (green), HC4 (red) and UH patients (orange).

Figure 5. Iron overload profile of the 227 patients with ferroportin disease (FD), 81 patients with hemochromatosis type 4 (HC4), and 35 patients with unexplained hyperferritinemia (UH). (A) Relationship between serum ferritin and age. Linear regression lines with 95% confidence interval have been fitted to the values from FD (green) and HC (red) patients. The Pearson's correlation coefficients (r) are provided. (B) Box plots show median and range for the ferritin/age ratio. P values were calculated on Student t-test; **** $P < 0.0001$. (C) Categorization of the FD (green), HC4 (red) and UH (orange) patients according to serum ferritin and transferrin saturation cutoffs. Dark colors represent the index cases, whereas light colors represent the relatives. Size of the circles are proportional to the number of patients. (D) Relationship between mean corpuscular volume and transferrin saturation. Linear regression lines with 95% confidence interval have been fitted to the values from FD (green) and HC (red) patients. The Pearson's correlation coefficients (r) are provided. (E) Frequency distribution of clinical signs observed in FD (green), HC4 (red) and UH (orange) patients.

Table 1. Comprehensive list of published *SCL40A1* variants. *SCL40A1* variants are documented based on GenBank accession number NM_014585.5.

Table 2. Clinical and biological data of the 145 index cases. FD= ferroportin disease, HC4= hemochromatosis type 4, UH= unexplained hyperferritinemia.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the French Hospital Clinical Research Program (Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2009; Brest University Hospital UF0857), the Gaetan Saleun Association

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K. Uguen and G. Le Gac designed the study. C. Ka, M. Le Tertre, J. Guellec, C. Ferec and G. Collod-Beroud participated in the literature review and analysis of data. I. Callebaut conducted the structural analyses. C. Beroud helped to create the UMD_*SLC40A1* database. K. Uguen, I. Callebaut and G. Le Gac wrote the manuscript. All authors contributed to the editing of the final manuscript.

REFERENCES

Adams PC, Barton JC. 2011. A diagnostic approach to hyperferritinemia with a non-elevated transferrin saturation. *J Hepatol* 55:453–458.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–249.

An P, Jiang L, Guan Y, Wang H, Wang J, Tian Y, Yang W, Shi Y, Xue J, Min J, Wang F. 2017a. Identification of hereditary hemochromatosis pedigrees and a novel *SLC40A1* mutation in Chinese population. *Blood Cells Mol Dis* 63:34–36.

An P, Jiang L, Guan Y, Wang H, Wang J, Tian Y, Yang W, Shi Y, Xue J, Min J, Wang F. 2017b. Identification of hereditary hemochromatosis pedigrees and a novel *SLC40A1* mutation in Chinese population. *Blood Cells Mol Dis* 63:34–36.

- Anderson GJ, Frazer DM. 2017. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* 106:1559S-1566S.
- Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, Vieth KR, Jung G, Casu C, Rivella S, Jormakka M, Mackenzie B, et al. 2018a. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* 131:899–910.
- Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, Vieth KR, Jung G, Casu C, Rivella S, Jormakka M, Mackenzie B, et al. 2018b. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* 131:899–910.
- Bérout C, Collod-Bérout G, Boileau C, Soussi T, Junien C. 2000. UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum Mutat* 15:86–94.
- Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, Powers AS, Gonen S, Schneider S, Arvedson T, Dror RO, Cheng Y, Manglik A. 2020. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*. 586:807-811.
- Callebaut I, Joubrel R, Pissard S, Kannengiesser C, Gérolami V, Ged C, Cadet E, Cartault F, Ka C, Gourlaouen I, Gourhant L, Oudin C, et al. 2014. Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Hum Mol Genet* 23:4479–4490.
- Cremonesi L, Cemonesi L, Forni GL, Soriani N, Lamagna M, Fermo I, Daraio F, Galli A, Pietra D, Malcovati L, Ferrari M, Camaschella C, et al. 2005. Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. *Br J Haematol* 131:663–670.
- Cunat S, Giansily-Blaizot M, Bismuth M, Blanc F, Dereure O, Larrey D, Quéllec AL, Pouderoux P, Rose C, Raingeard I, Renard E, Schved J-F, et al. 2007. Global sequencing approach for characterizing the molecular background of hereditary iron disorders. *Clin Chem* 53:2060–2069.
- Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. 2010. Identifying a high fraction

of the human genome to be under selective constraint using GERP++. PLoS Comput Biol 6:e1001025.

Del-Castillo-Rueda A, Moreno-Carralero M-I, Cuadrado-Grande N, Alvarez-Sala-Walther L-A, Enríquez-de-Salamanca R, Méndez M, Morán-Jiménez M-J. 2012. Mutations in the HFE, TFR2, and SLC40A1 genes in patients with hemochromatosis. *Gene* 508:15–20.

Deshpande CN, Ruwe TA, Shawki A, Xin V, Vieth KR, Valore EV, Qiao B, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B, Jormakka M. 2018. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat Commun* 9:3075.

Détivaud L, Island M-L, Jouanolle A-M, Ropert M, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Mosser A, Leroyer P, Deugnier Y, David V, Brissot P, Loréal O. 2013. Ferroportin Diseases: Functional Studies, a Link Between Genetic and Clinical Phenotype. *Hum Mutat.* 34:1529-1536.

Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X. 2015. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet* 24:2125–2137.

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 1:191–200.

Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. 2015. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab* 22:777–787.

Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJH, Townsend ARM. 2005. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* 106:1092–1097.

Drew D, North RA, Nagarathinam K, Tanabe M. 2021. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chem Rev.* 121:5289-5335.

Ernst C, Hahnen E, Engel C, Nothnagel M, Weber J, Schmutzler RK, Hauke J. 2018. Performance of in

silico prediction tools for the classification of rare BRCA1/2 missense variants in clinical diagnostics. BMC Med Genomics 11:35.

Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T, Nemeth E. 2009. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. Blood 114:437–443.

Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. 2016. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. Blood 127:2809–2813.

Grantham R. 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. Science 185:862–864.

Gudmundsson S, Singer-Berk M, Watts NA, Phu W, Goodrich JK, Solomonson M, Genome Aggregation Database Consortium, Rehm HL, MacArthur DG, O'Donnell-Luria A. 2022. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. Hum Mutat 43:1012–1030.

Guellec J, Elbahnsi A, Le Tertre M, Uguen K, Gourlaouen I, Férec C, Ka C, Callebaut I, Le Gac G. 2019. Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. FASEB J 33:14625–14635.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. Cell 142:24–38.

Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, et al. 2016. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. Am J Hum Genet 99:877–885.

Jarvik GP, Browning BL. 2016. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. Am J Hum Genet 98:1077–1081.

Ka C, Guellec J, Pepermans X, Kannengiesser C, Ged C, Wuyts W, Cassiman D, Ledinghen V de, Varet B, Kerguenec C de, Oudin C, Gourlaouen I, et al. 2018. The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause

of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica* 103:1796–1805.

Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. 2014. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46:310–315.

Klein C, Chuang R, Marras C, Lang AE. 2011. The curious case of phenocopies in families with genetic Parkinson’s disease. *Mov Disord* 26:1793–1802.

Kong Y, Hu L, Lu K, Wang Y, Xie Y, Gao L, Yang G, Xie B, He W, Chen G, Wu H, Wu X, et al. 2019. Ferroportin downregulation promotes cell proliferation by modulating the Nrf2–miR-17-5p axis in multiple myeloma. *Cell Death Dis* 10:624.

Landemaine A, Hamdi-Roze H, Cunat S, Loustaud-Ratti V, Causse X, Si Ahmed SN, Drénou B, Bureau C, Pelletier G, De Kerguenec C, Ganne-Carrie N, Durupt S, et al. 2022. A simple clinical score to promote and enhance ferroportin disease screening. *J Hepatol* 76:568–576.

Le Gac G, Férec C. 2005. The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur J Hum Genet* 13:1172–1185.

Le Lan C, Mosser A, Ropert M, Detivaud L, Loustaud–Ratti V, Vital–Durand D, Roget L, Bardou–Jacquet E, Turlin B, David V, Loréal O, Deugnier Y, et al. 2011. Sex and Acquired Cofactors Determine Phenotypes of Ferroportin Disease. *Gastroenterology* 140:1199-1207.e2.

Le Tertre M, Elbahnsi A, Ka C, Callebaut I, Le Gac G. 2021a. Insights into the Role of the Discontinuous TM7 Helix of Human Ferroportin through the Prism of the Asp325 Residue. *Int J Mol Sci* 22:6412.

Le Tertre M, Ka C, Guellec J, Gourlaouen I, Férec C, Callebaut I, Le Gac G. 2017. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare SLC40A1 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfus Clin Biol* 24:462–467.

Le Tertre M, Ka C, Raud L, Berlivet I, Gourlaouen I, Richard G, Uguen K, Chen J-M, Férec C, Fichou Y, Le Gac G. 2021b. Splicing analysis of SLC40A1 missense variations and contribution to hemochromatosis type 4 phenotypes. *Blood Cells Mol Dis* 87:102527.

Lee PL, Gelbart T, West C, Barton JC. 2007. SLC40A1 c.1402G-->a results in aberrant splicing, ferroportin truncation after glycine 330, and an autosomal dominant hemochromatosis phenotype. *Acta Haematol* 118:237–241.

Leong IUS, Stuckey A, Lai D, Skinner JR, Love DR. 2015. Assessment of the predictive accuracy of five in silico prediction tools, alone or in combination, and two metaservers to classify long QT syndrome gene mutations. *BMC Med Genet* 16:34.

Li WH, Wu CI, Luo CC. 1984. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol* 21:58–71.

Mayr R, Janecke AR, Schranz M, Griffiths WJH, Vogel W, Pietrangelo A, Zoller H. 2010. Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatol* 53:941–949.

Meléndez-Aranda L, Jaloma-Cruz AR, Pastor N, Romero-Prado MM de J. 2019. In silico analysis of missense mutations in exons 1-5 of the F9 gene that cause hemophilia B. *BMC Bioinformatics* 20:363.

Miosge LA, Field MA, Sontani Y, Cho V, Johnson S, Palkova A, Balakishnan B, Liang R, Zhang Y, Lyon S, Beutler B, Whittle B, et al. 2015. Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E5189-5198.

Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. 2001. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 108:619–623.

Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. 2008. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 28:197–213.

Nemeth E, Ganz T. 2021. Heparin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *IJMS* 22:6493.

Ng PC, Henikoff S. 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11:863–874.

Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, Dongen JW van, Breuning MH, Snijders PJ, Rutten WP, Sandkuijl LA, Oostra BA, Duijn CM van, Heutink P. 2001. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 28:213–214.

Pan Y, Ren Z, Gao S, Shen J, Wang L, Xu Z, Yu Y, Bachina P, Zhang H, Fan X, Laganowsky A, Yan N, et al. 2020. Structural basis of ion transport and inhibition in ferroportin. *Nat Commun* 11:5686.

Perland E, Bagchi S, Klaesson A, Fredriksson R. 2017. Characteristics of 29 novel atypical solute carriers of major facilitator superfamily type: evolutionary conservation, predicted structure and neuronal co-expression. *Open Biol* 7:170142.

Pietrangelo A. 2017. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* 102:1972–1984.

Pietrangelo A, Corradini E, Ferrara F, Vegetti A, De Jong G, Luca Abbati G, Paolo Arcuri P, Martinelli S, Cerofolini E. 2006. Magnetic resonance imaging to identify classic and nonclassic forms of ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 37:192–196.

Piperno A, Pelucchi S, Mariani R. 2020. Inherited iron overload disorders. *Transl Gastroenterol Hepatol* 5:25.

Praschberger R, Schranz M, Griffiths WJH, Baumgartner N, Hermann M, Lomas DJ, Pietrangelo A, Cox TM, Vogel W, Zoller H. 2014. Impact of D181V and A69T on the function of ferroportin as an iron export pump and hepcidin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1842:1406–1412.

Preza G, Fernandes A, Clark RJ, Craik DJ, Ganz T, Nemeth E. 2008. Structural Aspects of Heparin-Ferroportin Binding. *Blood* 112:119–119.

Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez M-J, Ganz T, Nemeth E. 2012. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 15:918–924.

Quang D, Chen Y, Xie X. 2015. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* 31:761–763.

Quinodoz M, Peter VG, Cisarova K, Royer-Bertrand B, Stenson PD, Cooper DN, Unger S, Superti-Furga A, Rivolta C. 2022. Analysis of missense variants in the human genome reveals widespread gene-specific clustering and improves prediction of pathogenicity. *Am J Hum Genet* 109:457–470.

Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:123–132.

Relvas L, Claro MT, Bento MC, Ribeiro ML. 2009. Novel human pathological mutations. Gene symbol: SLC40A1. Disease: haemochromatosis, type 4. *Hum Genet* 125:338.

Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 47:D886–D894.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, et al. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424.

Salgado D, Desvignes J-P, Rai G, Blanchard A, Miltgen M, Pinard A, Lévy N, Collod-Bérout G, Bérout C. 2016. UMD-Predictor: A High-Throughput Sequencing Compliant System for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution. *Hum Mutat* 37:439–446.

Santos PCJL, Cançado RD, Pereira AC, Schetttert IT, Soares RAG, Pagliusi RA, Hirata RDC, Hirata MH, Teixeira AC, Figueiredo MS, Chiattonne CS, Krieger JE, et al. 2011. Hereditary hemochromatosis:

mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis* 46:302–307.

Schimanski LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJH, Townsend ARM. 2005. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood* 105:4096–4102.

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362.

Sham RL, Phatak PD, West C, Lee P, Andrews C, Beutler E. 2005. Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features. *Blood Cells Mol Dis* 34:157–161.

Taniguchi R, Kato HE, Font J, Deshpande CN, Wada M, Ito K, Ishitani R, Jormakka M, Nureki O. 2015. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat Commun* 6:8545.

Vlasveld LT, Janssen R, Bardou-Jacquet E, Venselaar H, Hamdi-Roze H, Drakesmith H, Swinkels DW. 2019. Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features. *Pharmaceuticals (Basel)* 12:132.

Vlasveld LT, Swinkels DW. 2018. Loss-of-function ferroportin disease: novel mechanistic insights and unanswered questions. *Haematologica* 103:1753–1755.

Wallace DF, Harris JM, Subramaniam VN. 2010. Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *Am J Physiol, Cell Physiol* 298:C75-84.

Wang Y, Du Y, Liu G, Guo S, Hou B, Jiang X, Han B, Chang Y, Nie G. 2017. Identification of novel mutations in HFE, HFE2, Tfr2, and SLC40A1 genes in Chinese patients affected by hereditary hemochromatosis. *Int J Hematol* 105:521–525.

Wong K, Adams PC. 2006. The diversity of liver diseases among outpatient referrals for an elevated serum ferritin. *Can J Gastroenterol* 20:467–470.

Yamakawa N, Oe K, Yukawa N, Murakami K, Nakashima R, Imura Y, Yoshifuji H, Ohmura K, Miura Y, Tomosugi N, Kawabata H, Takaori-Kondo A, et al. 2016. A Novel Phenotype of a Hereditary Hemochromatosis Type 4 with Ferroportin-1 Mutation, Presenting with Juvenile Cataracts. *Intern Med* 55:2697–2701.

Yan N. 2015. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys* 44:257–283.

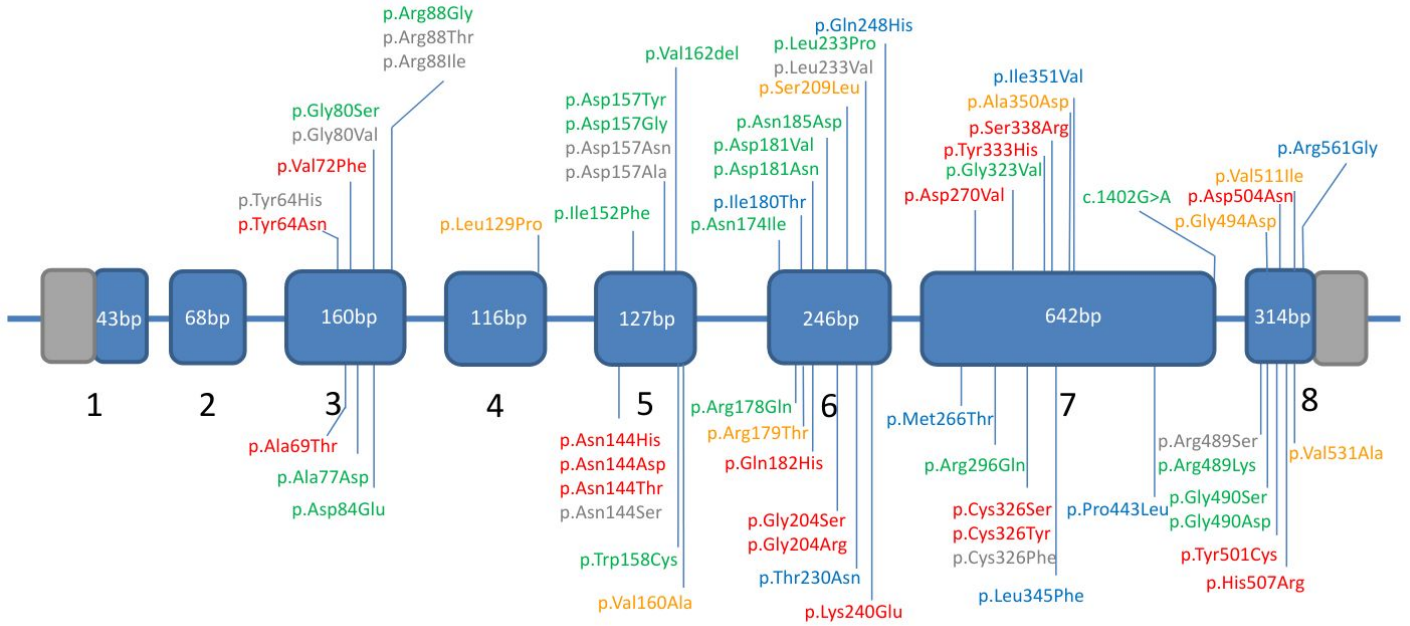
Zhang D-L, Ghosh MC, Ollivierre H, Li Y, Rouault TA. 2018a. Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. *Blood* 132:2078–2087.

Zhang D-L, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. 2009. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab* 9:461–473.

Zhang D-L, Wu J, Shah BN, Greutelaers KC, Ghosh MC, Ollivierre H, Su X-Z, Thuma PE, Bedu-Addo G, Mockenhaupt FP, Gordeuk VR, Rouault TA. 2018b. Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science* 359:1520–1523.

Figure 1

A



B

Extracellular

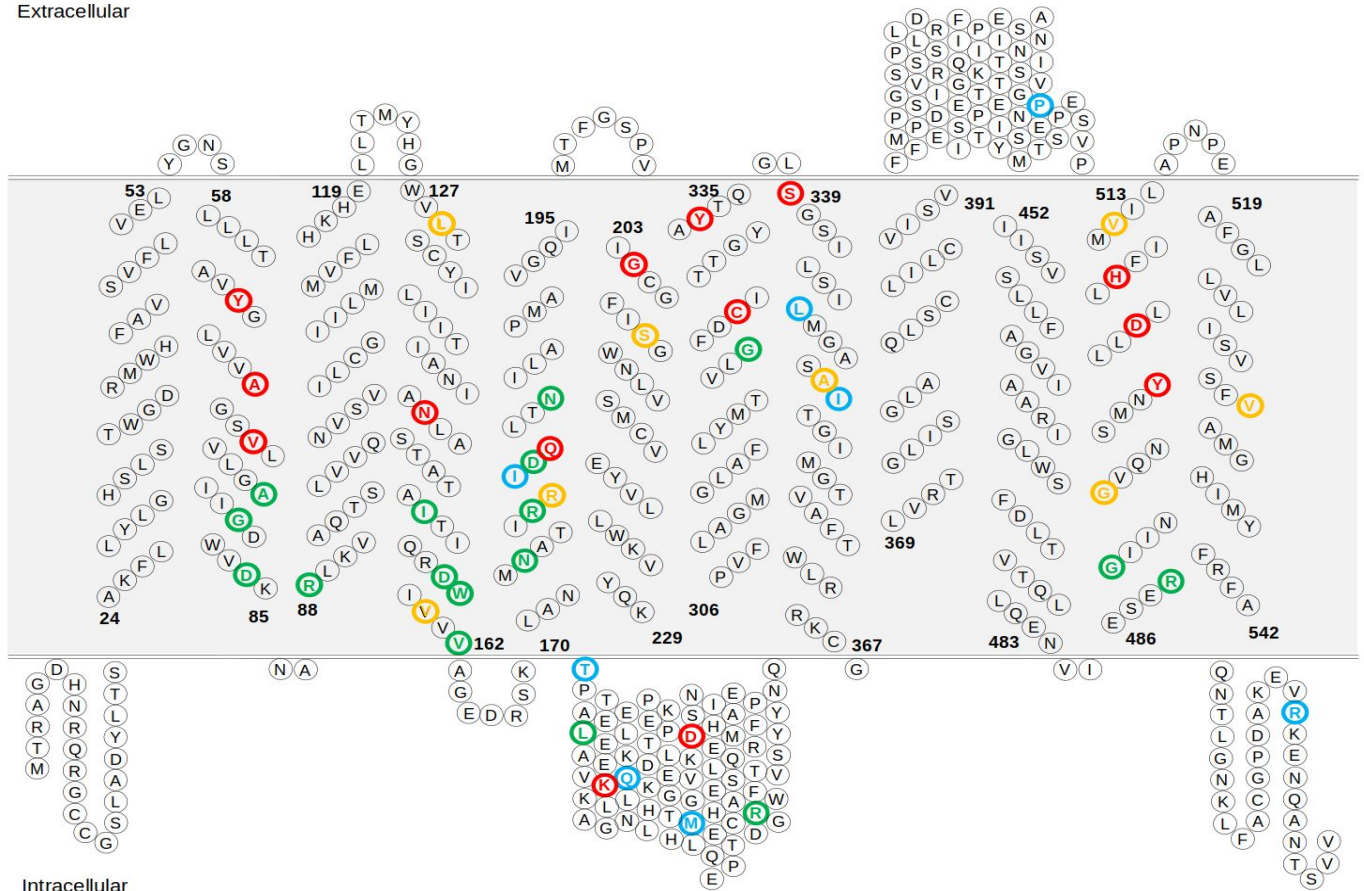
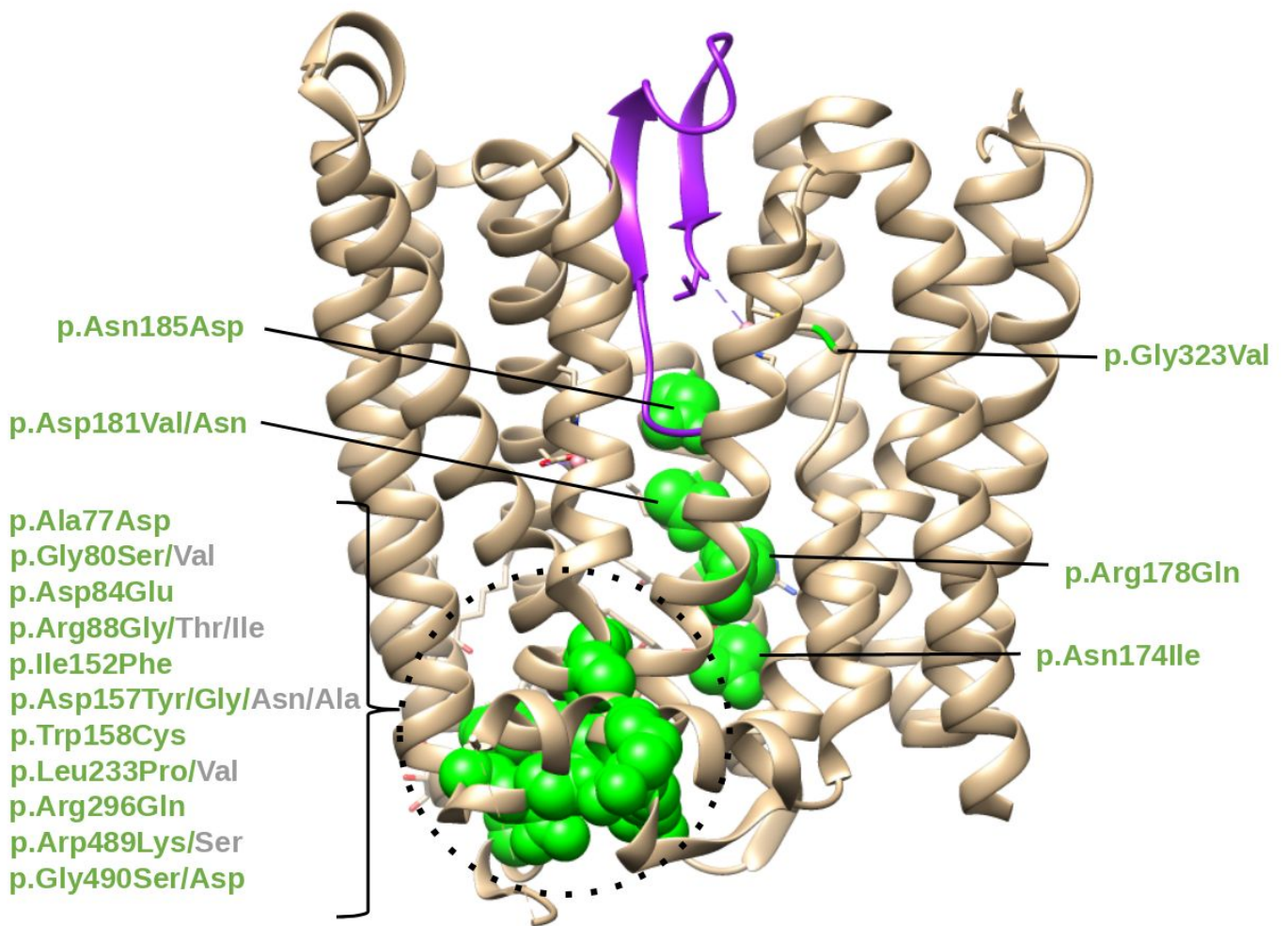


Figure 2

A



B

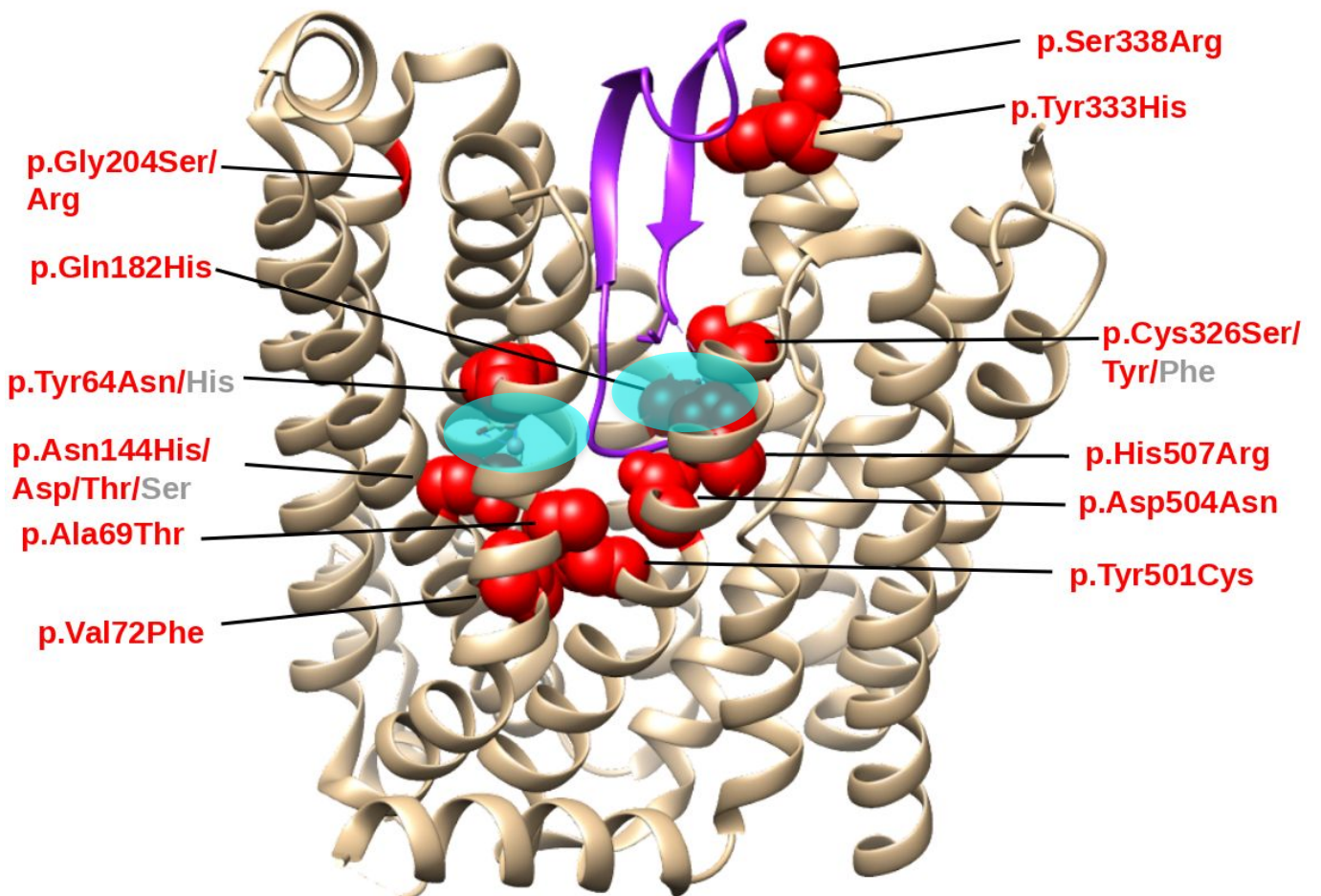
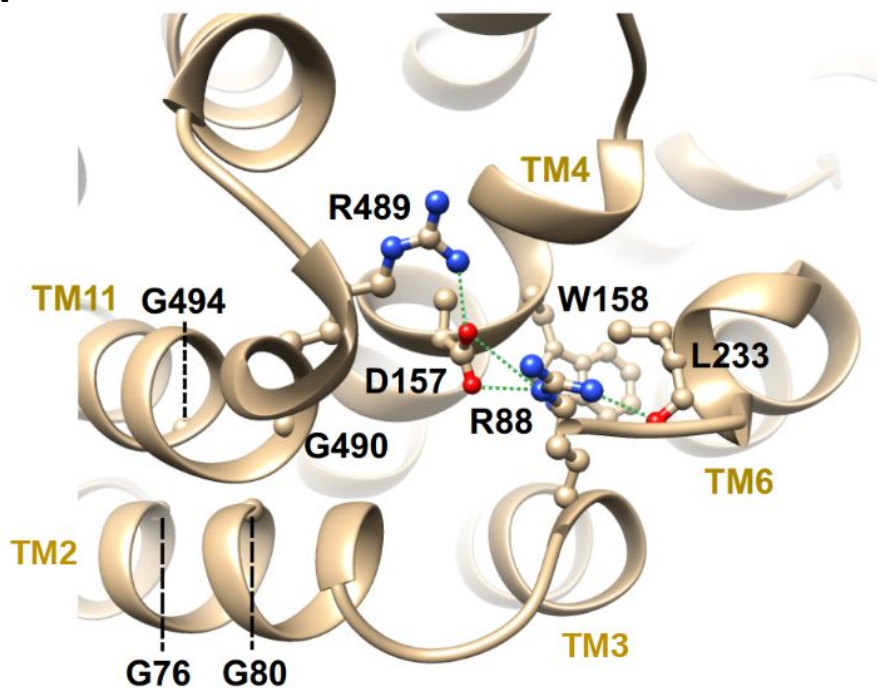


Figure 3

A



B

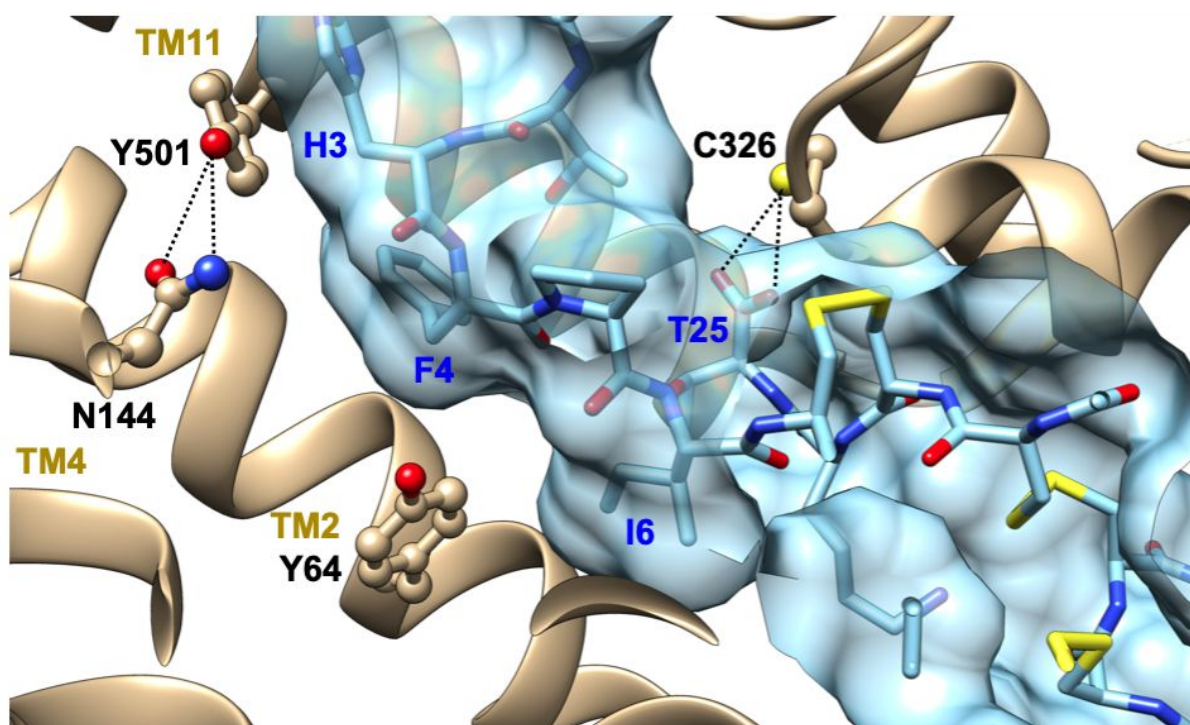
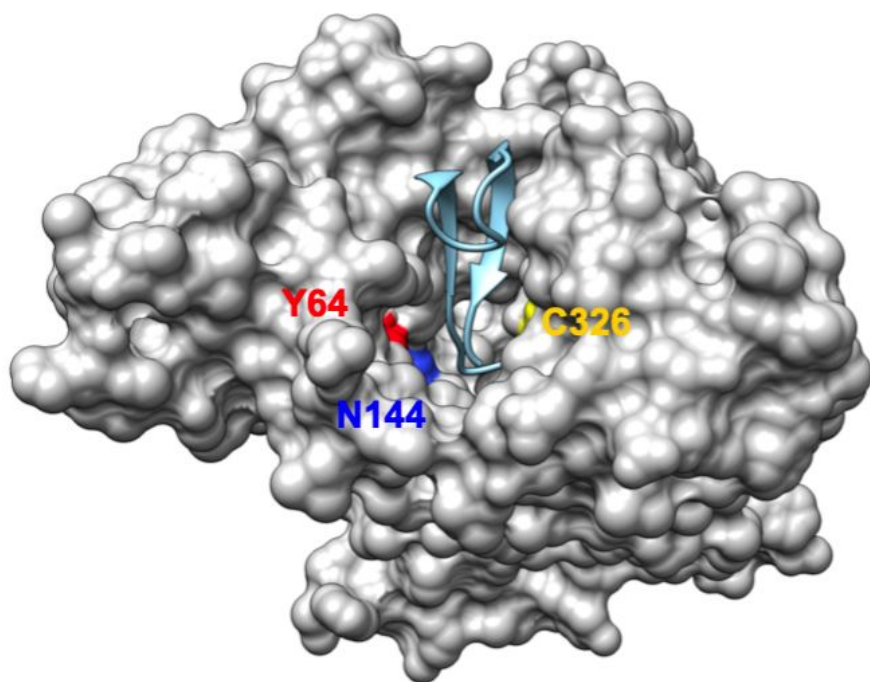


Figure 4

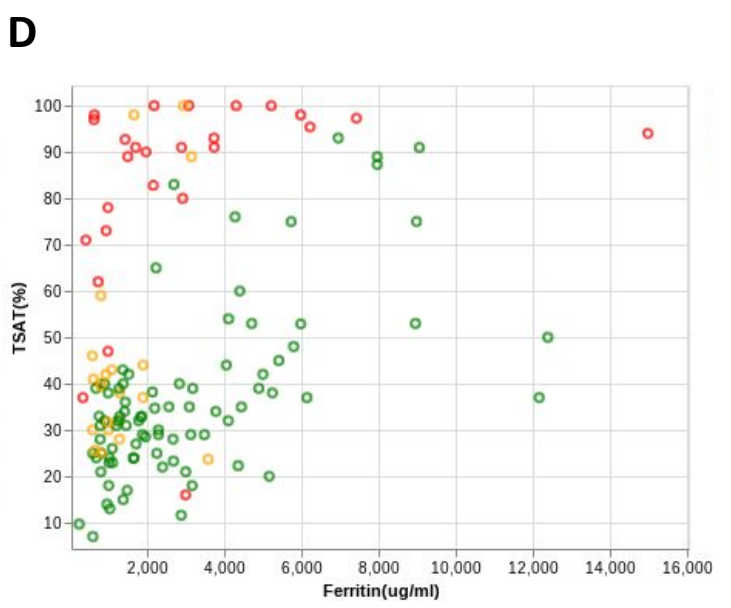
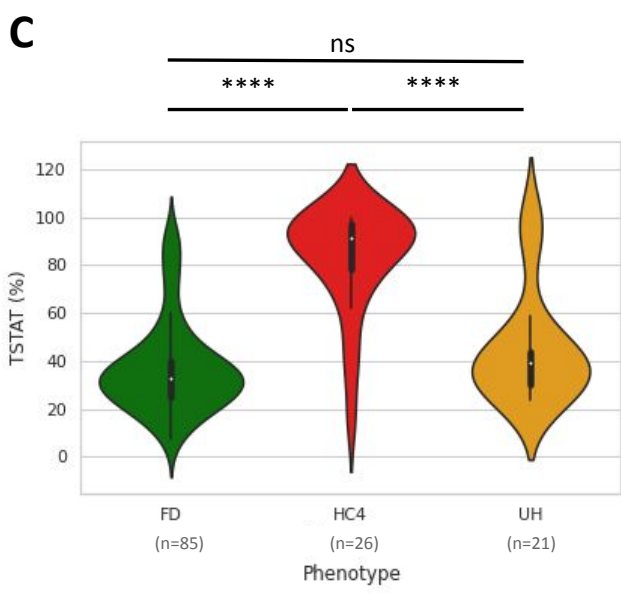
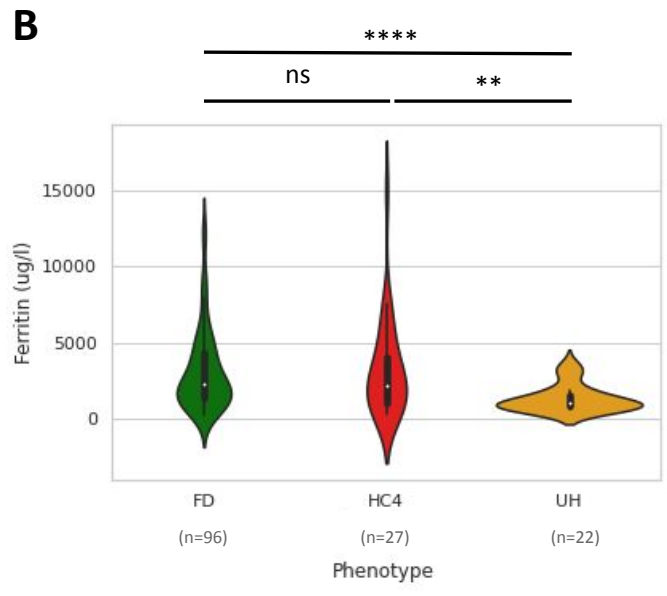
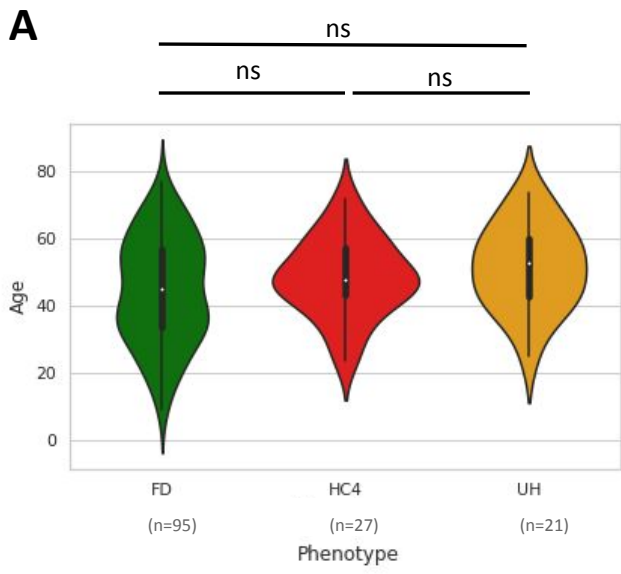
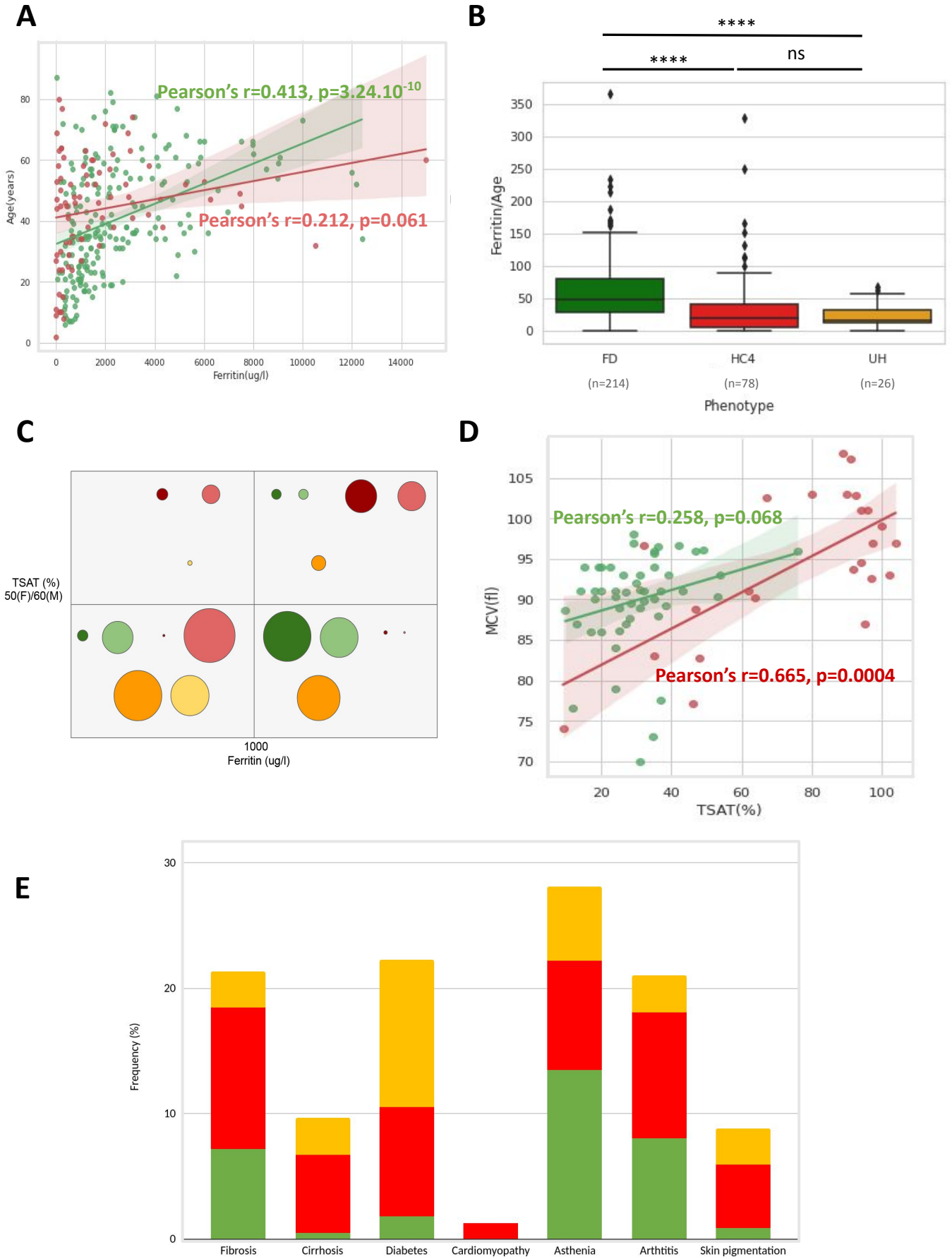


Figure 5



		Functional classification						
Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Localization in protein	Index cases (n=) (PMID)	In vitro findings (PMID)	Structural predictions (this study)	ACMG/AMP classification	Diagnosis
3	c.190T>A	p.Tyr64Asn	TM2	1 (12857562)	Gain-of-function (15831700, 15692071, 19709084, 19383972, 23943237)		Pathogenic	Hemochromatosis type 4
3	c.190T>C	p.Tyr64His	TM2	1 (25396007)		Deleterious	Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
3	c.205G>A	p.Ala69Thr	TM2	2 (27177411, 29154924)	Gain-of-function (24859227, 29154924)		Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
3	c.214G>T	p.Val72Phe	TM2	1 (18177470)	Gain-of-function (29237594)		Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
3	c.230C>A	p.Ala77Asp	TM2	3 (10471458, 15951560, 18160317)	Loss-of-function (15831700, 15692071, 16885049, 23943237, 19846751, 15935710, 23784628, 21396368, 24714983, 24859227, 30002125, 32450003)		Pathogenic	Ferroportin disease
3	c.238G>A	p.Gly80Ser	TM2	12 (16135412, 16885049, 17052926, 18420432, 21094556, 24370385, 24714983)	Loss-of-function (21094556, 24714983, 16885049)		Pathogenic	Ferroportin disease
3	c.239G>T	p.Gly80Val	TM2	1 (16351644)		Deleterious	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
3	c.252C>G	p.Asp84Glu	TM2	1 (28681497)	Loss-of-function (28681497)		Likely Pathogenic	Ferroportin disease

3	c.262A>G	p.Arg88Gly	TM3	3 (17951290, 24714983)	(23943237, 24714983)	Loss-of-function		Likely Pathogenic	Ferroportin disease
3	c.263G>C	p.Arg88Thr	TM3	1 (16257244)			Deleterious	Pathogenic	Ferroportin disease
3	c.263G>T	p.Arg88Ile	TM3	1 (33385755)			Deleterious	Pathogenic	Ferroportin disease
4	c.386T>C	p.Leu129Pro	TM4	1 (24644245)				VUS	Unexplained hyperferritinemia
		p.Asn144His	TM4	1 (11431687)		Gain-of-function (15831700, 15692071, 15956209, 19846751, 15935710, 23784628, 24859227, 19937651, 30002125)		Pathogenic	Hemochromatosis type 4
5	c.430A>C								
		p.Asn144Asp	TM4	1 (15030991)		Gain-of-function (15692071, 19383972, 29237594)		Pathogenic	Hemochromatosis type 4
5	c.431A>C	p.Asn144Thr	TM4	1 (12865285)		Gain-of-function (19383972, 19846751)		Pathogenic	Hemochromatosis type 4
5	c.431A>G	p.Asn144Ser	TM4	1 (18403150)			Deleterious	Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
5	c.454A>T	p.Ile152Phe	TM4	1 (18713659)		Loss-of-function (23784628, 18713659)		Likely Pathogenic	Ferroportin disease
5	c.469G>T	p.Asp157Tyr	TM4	1 (24714983)		Loss-of-function (24714983)		Pathogenic	Ferroportin disease
5	c.470A>G	p.Asp157Gly	TM4	3 (12730114, 24714983)		Loss-of-function (15935710, 15956209, 16457665, 24714983)		Likely Pathogenic	Ferroportin disease

5	c.469G>A	p.Asp157Asn	TM4	2 (18177470, 29154924)		Deleterious	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
5	c.470A>C	p.Asp157Ala	TM4	3 (20230395, 20533066, 26183747)		Deleterious	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
5	c.474G>T c.474G>C	p.Trp158Cys	TM4	2 (21396368, 28110135)	Loss-of-function (21396368)		Pathogenic	Ferroportin disease
5	c.479T>C	p.Val160Ala	TM4	1 (34828384)			VUS	Unexplained hyperferritinemia
				20 (12091366, 12091367, 15692071, 15935710, 12123233, 12406098, 15956209, 17729390, 15671438, 15753550, 28681497, 19846751, 15986403, 17052926, 16457665, 24714983)	Loss-of-function		Pathogenic	Ferroportin disease
5	c.484_486del	p.Val162del	TM4	31689754)				
				3 (16135412, 16885049)	Loss-of-function (24767627, 23784628, 16885049, 29154924)		Likely Pathogenic	Ferroportin disease
6	c.521A>T	p.Asn174Ile	TM5					
6	c.533G>A	p.Arg178Gln	TM5	9 (17997113, 17951290, 30002125, 32450003)	Loss-of-function (30002125, 32450003)		Pathogenic	Ferroportin disease
6	c.536G>C	p.Arg179Thr	TM5	1 (34828384)			VUS	Unexplained hyperferritinemia
6	c.539T>C	p.Ile180Thr	TM5	3 (16257244, 22890139, 24714983)	Neutral (24714983)		Likely Benign	Unexplained hyperferritinemia
6	c.541G>A	p.Asp181Asn	TM5	1 (29154924)	Loss-of-function (29154924)		Pathogenic	Ferroportin disease

7	c.1051A>G	p.Ile351Val	TM8	1 (24714983)	Neutral (24714983)	Likely Benign	Unexplained hyperferritinemia
7	c.1328C>T	p.Pro443Leu	EC5	1 (24714983)	Neutral (24714983)	Benign	Unexplained hyperferritinemia
7	c.1402G>A	p.Gly468Ser	TM10	1 (18160816)	Loss-of-function (Splicing defect) (33341511)	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
8	c.1467A>C	p.Arg489Ser	TM11	1 (16258219)	Deleterious	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
8	c.1466G>A	p.Arg489Lys	TM11	1 (19937651)	Loss-of-function (19937651)	Pathogenic	Ferroportin disease
8	c.1468G>A	p.Gly490Ser	TM11	3 (17951290, 24714983)	Loss-of-function (24714983)	Pathogenic	Ferroportin disease
8	c.1469G>A	p.Gly490Asp	TM11	9 (12873829, 24714983)	Loss-of-function (15692071, 15956209, 24714983)	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
8	c.1481G>A	p.Gly494Asp	TM11	1 (34828384)	Deleterious	Likely Pathogenic	Ferroportin disease
8	c.1502A>G	p.Tyr501Cys	TM11	1 (19709084)	Gain-of-function (19709084, 24767627, 29237594)	Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
8	c.1510G>A	p.Asp504Asn	TM11	1 (24714983)	Gain-of-function (24714983, 29237594)	Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
8	c.1520A>G	p.His507Arg	TM11	3 (21396368, 27629970, 33673803)	Gain-of-function (21396368, 29237594)	Likely Pathogenic	Hemochromatosis type 4
8	c.1531G>A	p.Val511Ile	TM11	1 (30500107)		VUS	Unexplained hyperferritinemia

8	c.1592T>C	p.Val531Ala	TM11	1 (34828384)			VUS	Unexplained hyperferritinemia
8	c.1681A>G	p.Arg561Gly	C-ter	2 (19066423, 24714983)	Neutral (24714983)		Benign	Unexplained hyperferritinemia

Index Cases

	FD (n=96)	HC4 (n=27)	UH (n=22)	FD vs HC4 p	FD vs UH p	HC4 vs UH p
Age (years) Median (min-max)	n=95 45 (9-77)	n=27 48 (24-72)	n=21 53 (25-74)	0.217	0.053	0.467
Gender (n)	n=95	n=27	n=22			
Female	39	6	5		0.144	1
Male	56	21	17			
Ferritin (µg/l) Median (min-max)	n=96 2258 (255-12405)	n=27 2195 (353-15000)	n=22 1008 (585-3600)	0.811	<0.0001	0.0085
Transferrin saturation (%) Median (min-max)	n=85 33 (7-93)	n=26 91 (16-100)	n=21 39.4 (23.7-100)	< 0.0001	0.193	< 0.0001
HIC (µmol/g) Median (min-max)	n=30 215 (20-2920)	n=6 265.35 (85-925)	n=4 170 (106-693)	0.748	0.786	0.695
Hb (g/dl) Median (min-max)	n=56 14.1 (10.9-17)	n=12 14.9 (7.5-16.5)	n=13 14.5 (9.5-16.1)	0.383	0.608	0.799
MCV (fl) Median (min-max)	n=34 91 (70-97)	n=11 96.9 (87-108)	n=7 90.5 (78.3-101)	0.007	0.628	0.028
ASAT (U/l) Median (min-max)	n=33 27 (13-50)	n=14 47 (1-322.1)	n=7 40 (15-145)	0.003	0.201	0.476
ALAT (U/l) Median (min-max)	n=36 31 (11-114)	n=15 83 (14-538.8)	n=7 48 (14-84)	0.002	0.545	0.087

GGT (U/l)	n=24	n=10	n=6	0.145	0.067	0.655
Median (min-max)	22.5 (10-61)	23 (6-345)	42.5 (16.6-582)			
Tissue iron deposition (n)						
Hepatocyte	0	6	1			
Macrophage	20	0	0			
Mixed	23	10				

Supplementary figures and Tables

Figure S1. Multiple species sequence alignment of ferroportin. Residues that correspond to missense variations that have been analyzed in vitro and recognized as either LoF or GoF mutations are boxed in grey, whereas residues that correspond to substitutions with no functional data are boxed in orange.

Figure S2. Comparison of CADD and REVEL scores between patients' and gnomAD variants. (A) Box plots show the median and range of REVEL (left panel) and CADD (right panel) scores between patients' variants (UMD, in green) and variants from gnomAD V2.2.1 (with minor allele frequency > 0.00001, in grey). (B) Scatter plot visualisation of CADD and REVEL scores for each pathogenic (red), neutral (blue), VUS (orange) and gnomAD (grey) variants. Dot lines represent the cutoffs for REVEL (horizontal) and CADD (vertical) scores.

Figure S3. Iron overload profiles of the patients with hemochromatosis type 4 (HC4; A, B), ferroportin disease (FD; C,D) or unexplained hyperferritinemia (UH; E, F). Box plots show median and range of the transferrin saturation (TSAT) (A) and age (B) values for patients with HC4, according to the location of the variant in the N-terminus lobe (Nter) or C-terminus lobe (Cter) of FPN1. (C, D) Relationship between TSAT and age (C) or ferritin (D) in FD patients. Linear regression lines with 95% confidence interval have been fitted to the values from FD patients. The Pearson's correlation coefficients (r) are provided. (E, F) Violin plots show the values of TSAT (E) and ferritin (F) in UH patients according to the classification of the variant. VUS=variant of uncertain significance. LB_B= likely benign and benign variants. P values were calculated on Student t-test; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Table S1. Comparison of in silico predictors in a subset of 56 SLC40A1 missense variants.

Table S2. Clinical and biological data of the patients. FD= ferroportin disease, HC4= hemochromatosis type 4, UH= unexplained hyperferritinemia, HIC= hepatic iron concentration, MCV= mean corpuscular volume, Hb=hemoglobin, ASAT= aspartate aminotransferase, ALAT= alanine aminotransferase, GGT= gamma glutamyl transpeptidase.

Figure S2

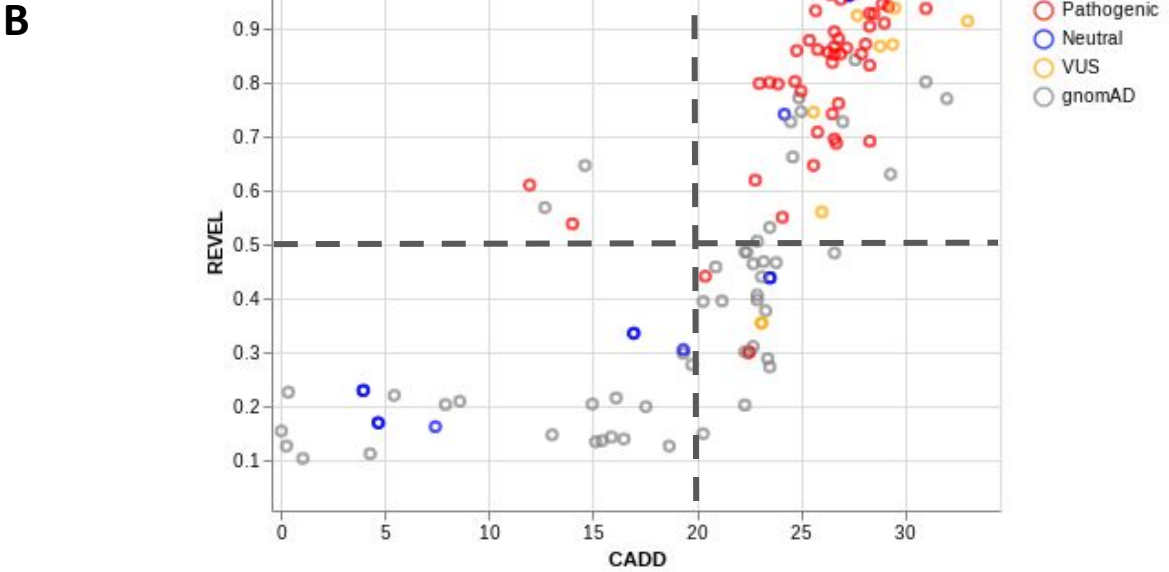
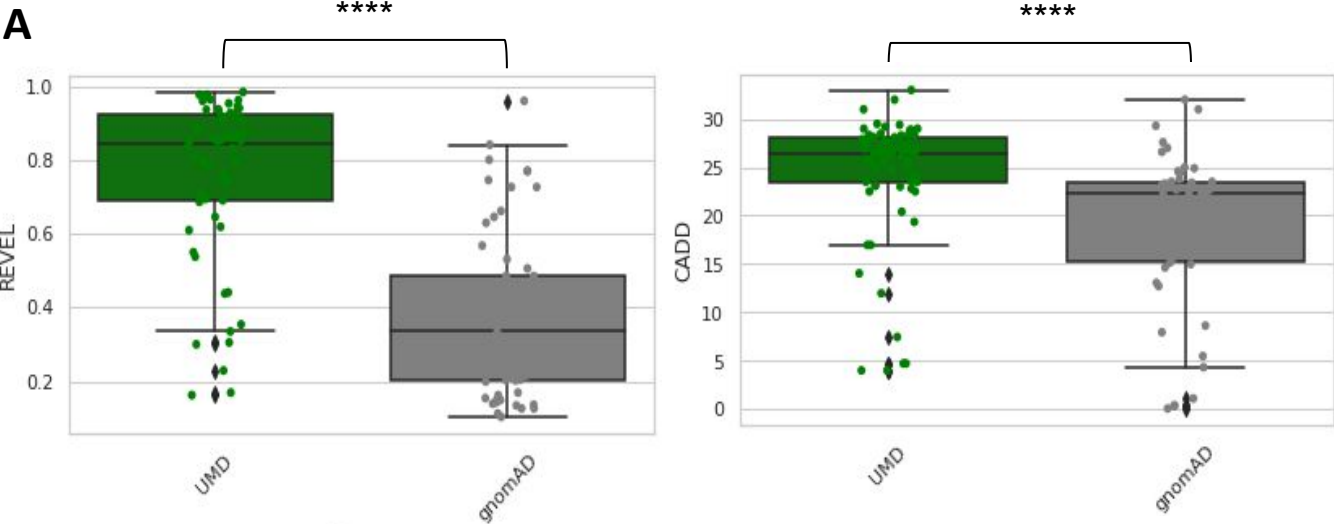


Figure S3

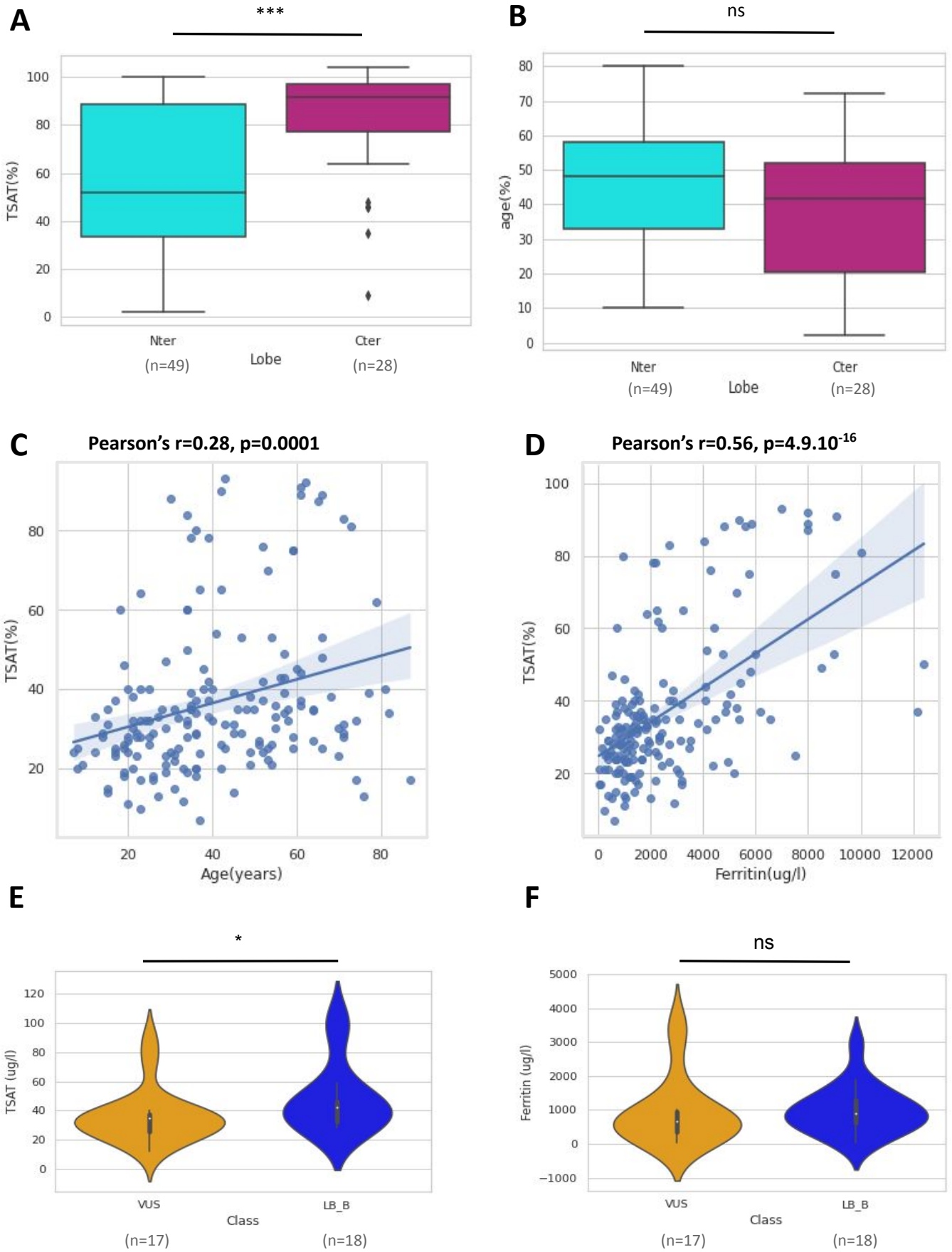


Table S1

Evidence	Variant C.	Simple Predictors				Meta-predictor			Neural Network					
		PolyPhen-2	SIFT	Mutation Taster	GERP++	MetaLR	MetaSVM	UMD-Predictor	REVEL	Threshold=0.5	CADD	Threshold=20	DANN	Threshold=0.96
LOF	in vitro	p.Ala77Asp	probably_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.853	26.1	0.9975	
		p.Gly80Ser	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.954	26.9	0.9988	
		c.252C>G	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Benign	Deleterious	Deleterious	Probably pathogenic	Pathogenic	0.798	22.1	0.9957	
		c.262A>G	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.946	27.1	0.9988	
		c.263G>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.977	26.1	0.9893	
		c.454A>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.965	26.1	0.9890	
		c.469G>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.978	32	0.9958	
		c.470A>G	possibly_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.941	29.2	0.9969	
		c.474G>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.937	31	0.9934	
		c.521A>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.927	27.1	0.9836	
		c.532G>A	probably_damaging	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.837	25.1	0.9994	
		c.541G>A	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.871	28.1	0.9993	
		c.542A>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.978	27.1	0.9942	
		c.553A>G	probably_damaging	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.784	24.1	0.9978	
		c.698T>C	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.975	27.1	0.9992	
c.887G>A	benign	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Probably pathogenic	Probably pathogenic	0.3	22.5	0.9956			
c.966G>T	probably_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.861	24.1	0.9975			
c.1466G>A	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Probably pathogenic	Probably pathogenic	0.852	25.1	0.9973			
c.1468G>A	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	Pathogenic	0.864	26.1	0.9984			
c.1469G>A	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	0.866	25.1	0.9985			
c.239G>T	p.Gly80Val	probably_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.933	24.1	0.9973		
c.263G>C	p.Arg88Thr	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.963	25.1	0.9858		
c.469G>A	p.Asp157Asn	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Probably pathogenic	0.881	25.1	0.9992		
c.470A>C	p.Asp157Ala	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.985	28.1	0.9957		
c.697C>G	p.Leu233Val	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Probably pathogenic	0.8	22.1	0.9986		
c.1467A>C	p.Arg489Ser	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.878	24.1	0.9974		
c.1481G>A	p.Gly494Asp	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.894	25.1	0.9985		
c.190T>A	p.Tyr64Asn	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.832	27.1	0.9900		
c.205G>A	p.Ala69Thr	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.687	25.1	0.9993		
c.214G>T	p.Val72Phe	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.856	25.1	0.9964		
c.430A>C	p.Asn144His	possibly_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.646	24.1	0.9936		
c.430A>G	p.Asn144Asp	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.691	27.1	0.9983		
c.431A>C	p.Asn144Thr	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.695	25.1	0.9966		
c.546G>T	p.Gln182His	probably_damaging	deleterious	Disease causing automatic	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.859	23.1	0.9974		
c.610G>C	p.Gly204Arg	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.853	25.1	0.9993		
c.610G>A	p.Gly204Ser	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.742	25.1	0.9989		
c.718A>G	p.Lys240Glu	benign	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.441	19.1	0.9960		
c.809A>T	p.Asp270Val	benign	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Probably polymorphism	0.538	14.02	0.9736		
c.977G>C	p.Cys326Ser	benign	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.619	21.1	0.9546		
c.977G>A	p.Cys326Trp	possibly_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.708	24.1	0.9882		
c.997T>C	p.Tyr333His	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.91	28.1	0.9985		
c.1014T>G	p.Ser338Arg	benign	tolerated	Disease causing	Benign	Tolerated	Tolerated	Tolerated	Pathogenic	0.61	10.1	0.9718		
c.1502A>G	p.Tyr501Cys	benign	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.797	22.1	0.9935		
c.1510G>A	p.Asp504Asn	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.904	28.3	0.9993		
c.15210A>G	p.His507Arg	probably_damaging	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.802	23.1	0.9982		
c.190T>C	p.Tyr64His	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.928	27.1	0.9985		
c.431A>G	p.Asn144Ser	probably_damaging	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.550	23.1	0.9987		
c.977G>T	p.Cys326Phe	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.761	26.8	0.9916		
c.539T>C	p.Ile180Thr	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.961	27.3	0.9987		
c.689C>A	p.Thr230Asn	possibly_damaging	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Tolerated	Tolerated	Pathogenic	0.438	22.1	0.9931		
c.744G>T	p.Gln248His	benign	tolerated	Disease causing	Benign	Tolerated	Tolerated	Tolerated	Pathogenic	0.335	16.96	0.9714		
c.797T>C	p.Met266Thr	benign	tolerated	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.305	19.35	0.7320		
c.1035G>C	p.Leu345Phe	probably_damaging	deleterious	Disease causing	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Pathogenic	0.741	23.1	0.9989		
c.1051A>G	p.Ile351Val	benign	tolerated	Disease causing	Benign	Tolerated	Tolerated	Tolerated	Pathogenic	0.229	3.975	0.5566		
c.1328C>T	p.Pro443Leu	benign	tolerated	Polymorphism	Deleterious	Deleterious	Tolerated	Tolerated	Polymorphism	0.169	4.695	0.2164		
c.1681A>G	p.Arg561Gly	benign	tolerated	Polymorphism	Benign	Tolerated	Tolerated	Tolerated	Probably polymorphism	0.162	7.436	0.9201		
Sensitivity (%)		87.5	79.2	100.0	95.8	95.8	93.8	95.8	95.8	75.0	62.5	95.8	97.9	
Specificity (%)		62.5	75.0	25.0	37.5	37.5	62.5	25.0	25.0	75.0	62.5	62.5	50.0	

Table S2.

	FD (n=227)	HC4 (n=81)	UH (n=35)	FD vs HC4 p	FD vs UH p	HC4 vs UH p
Age (years) Median (min-max)	n=214 37 (6-87)	n=78 46.5 (2-80)	n=26 50.5 (7-74)	0.124	0.003	0.09
Gender (n)	n=227	n=79	n=35			
Female	91	29	11		0.358	0.677
Male	136	50	25			
Ferritin (µg/l) Median (min-max)	n=227 1600 (38-12405)	n=81 750 (4-15000)	n=35 719 (23-3600)	<0.0001	<0.0001	0.842
Transferrin saturation (%) Median (min-max)	n=184 32 (7-93)	n=80 79 (2-104)	n=30 36 (12-100)	<0.0001	0.065	<0.0001
HfC (µmol/g) Median (min-max)	n=52 205 (20-2920)	n=9 210.7 (85-925)	n=4 170 (106-693)	0.55	0.969	0.629
Hb (g/dl) Median (min-max)	n=106 14.1 (10.9-18.4)	n=29 14.5 (7.5-16.5)	n=18 14.4 (9.5-16.7)	0.196	0.407	0.841
MCV (fl) Median (min-max)	n=57 91 (70-98)	n=24 95.6 (74-108)	n=7 90.5 (78.3-101)	0.005	0.579	0.107
ASAT (UI/l) Median (min-max)	n=49 25 (12-54)	n=29 32.5 (14-322.1)	n=7 40 (15-145)	0.026	0.107	0.99

ALAT (U/l)	n=54	n=31	n=7	0.012	0.414	0.19
Median (min-max)	30 (6-114)	62 (14-538.8)	48 (14-84)			
GGT (U/l)	n=41	n=21	n=6	0.539	0.053	0.17
Median (min-max)	23 (8-61)	23 (6-345)	42.5 (16.6-582)			
Tissue iron deposition (n)						
Hepatocyte	0	8	1			
Macrophage	26	0	0			
Mixed	40	11	4			

Article 2

Article 2 : The dual loss and gain of function of the SLC40A1 iron exporter results in the classic Ferroportin Disease phenotype

Nous venons de voir que dans la littérature, les données fonctionnelles sont d'importance majeure dans l'interprétation des variations faux-sens du gène *SLC40A1*. Nous savons également que, couplées à des données structurales, ces analyses permettent de mieux comprendre la biologie de la ferroportine, et les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie de la ferroportine ou de l'hémochromatose de type 4.

J'ai réalisé ma thèse au sein d'une équipe qui travaille depuis plusieurs années à l'analyse fonctionnelle et, grâce au travail conjoint avec le Dr Isabelle Callebaut, à l'interprétation structurale de ces variations et à la meilleure compréhension de la biologie de FPN1. Cette collaboration de longue date a déjà permis la description de nombreuses variations du gène *SLC40A1* d'un point de vue fonctionnel et structural (Le Gac et al., 2013; Callebaut et al., 2014), décrivant même un mécanisme physiopathologique inédit qui expliquerait plus de la moitié des variations perte de fonction décrites à ce jour (Ka et al., 2018; Guellec et al., 2019).

J'ai intégré l'équipe dans le but de mener des travaux sur les mécanismes de résistance à l'hepcidine. Les mises au points techniques que j'ai réalisées pour mieux caractériser ces mécanismes ont permis de mettre en évidence différents degrés de résistance à l'hepcidine, et surtout la description de variations ambivalentes, à la fois perte et gain de fonction. Cette notion, parfois évoquée dans la littérature mais peu explorée à ce jour, est d'autant plus intéressante que les analyses structurales permettent d'expliquer cette ambivalence et nous permettent de mieux comprendre l'interaction hepcidine-ferroportine.

Nous allons maintenant illustrer ce travail à travers deux articles :

- le premier décrit entre autres deux variations : p.Arg40Gln et p.Ser47Phe, nouvellement identifiées, et présentant une résistance à l'hepcidine tout en étant également perte de fonction. Les analyses structurales expliqueront leur lien avec le site de liaison du fer mais surtout mettront en lumière l'importance du lobe N-terminal dans l'interaction hepcidine-ferroportine. Cet article est rédigé en vue d'une soumission sous peu dans la revue *American Journal of Hematology*.
- le second mettra en avant une nouvelle variation : p.Ala350Val, qui présente également une ambivalence fonctionnelle, mais beaucoup plus drastique, que ça soit en termes de perte ou de gain de fonction. Nous allons découvrir au niveau structural que cette position est en fait une position clé de FPN1, à la fois pour la fixation de l'hepcidine dans la cavité hydrophobe, mais également pour son rôle de pivot à l'interface entre les lobes N et C-terminaux.

The dual loss and gain of function of the SLC40A1 iron exporter results in the classic Ferroportin Disease phenotype

Short title: *Missense variations cause mixed FPN1 dysfunction.*

Kévin Uguen,^{1,2} Marlène Le Tertre,^{1,2} Dimitri Tchernitchko,^{3,4} Ahmad Elbahnsi,⁵ Isabelle Gourlaouen,¹ Claude Férec,^{1,2,6} Chandran Ka^{1,2,7}, Isabelle Callebaut,^{5*} Gérald Le Gac^{1,2,7*}

*: These authors contributed equally to this work.

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

²CHU de Brest, F-29200 Brest, France

³CHU Paris Nord-Val de Seine – Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard, F-75018 Paris, France

⁴Centre de Recherche sur l'Inflammation, Inserm U1149, F-75018 Paris, France

⁵Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, IRD, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France

⁶Association Gaétan Saleün, F-29200, France

⁷Laboratory of Excellence GR-Ex, F-75015, France

Corresponding Author: Gerald Le Gac, Institut Brestois de Recherche en Bio-Santé, UFR Médecine et Sciences de la Santé, UMR1078, 22 rue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France. Tel: (+33) 2 98 01 79 69; E-mail: gerald.legac@univ-brest.fr; ORCID Id: 0000-0003-3236-7280

Fundings: This work was supported by grants from the French Hospital Clinical Research Program (Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2009; Brest University Hospital UF0857), the Gaetan Saleun Association and the GR-Ex Laboratory of Excellence (reference ANR-11-LABX-0051). The GR-Ex label is funded by the IdEx "Investissements d'avenir" program of the French National Research Agency (reference ANR-18-IDEX-0001).

Authorship contributions

G. Le Gac and I. Callebaut designed the study. K. Uguen, M. Le Tertre, C. KA, I. Gourlaouen, A. Elbahnsi and I. Callebaut conducted experiments. D. Tchernitchko provided genetic and phenotypic data. G. Le Gac, I. Callebaut, K. Uguen, C. Ka, D. Tchernitchko and C. Férec analyzed data. G. Le Gac wrote the manuscript. All authors contributed to the editing of the final manuscript.

Abstract

Heterozygous mutations in the ferroportin 1 (FPN1) encoding gene are responsible for two distinct iron overload diseases: Ferroportin Disease caused by inactivating FPN1 mutations and Hemochromatosis type 4 caused by resistant to hepcidin FPN1 mutations. So far, these entities have been regarded as antithetic. The present study identified the functional and structural relevance of the two p.Arg40Gln and p.Ser47Phe missense variations, which are located in the transmembrane helix 1 of the major facilitator superfamily-type iron exporter. In cultured cells, the two TM1 substitutions displayed a fairly similar mixed behavior in the sense that they reduced the ability of FPN1 to export iron out the cell, although they did not cause FPN1 mislocalization, and they also reduced the sensitivity of FPN1 to hepcidin, although they did not obviously alter the FPN1/hepcidin interaction. Structural analyses helped to differentiate the Ser47 residue, which forms an interaction network with two critical residues of the primary FPN1 iron-binding site and the N-terminal part of hepcidin, from the Arg40 residue, which is considered a key element for stabilizing FPN1 in an inwardly oriented state prior to iron binding but is not thought to interact directly with hepcidin. While the two variants result in a co-association of gain-of-function and loss-of-function properties, the phenotypic traits observed in a total of 11 patients invariably correspond to the ferroportin disease. These findings dismantle the classical dualism of FPN1 loss- versus gain-of-function, further highlighting some specific and unexpected functions for TM1 in the molecular mechanism of iron export and its regulation by hepcidin.

Keywords: Ferroportin disease, gain- and loss-of-function duality, pathogenicity of missense variations, structure-function relationship.

Introduction

Ferroportin 1 (FPN1), also referred to as solute-carrier family 40 member 1 (SLC40A1; Uniprot #Q9NP59), is the sole iron export protein found in mammals (1). It is expressed in cells highly specialized in iron metabolism, including macrophages, hepatocytes, duodenal enterocytes, placenta syncytiotrophoblasts, and enterocytes (2–4). FPN1 activity is predominantly regulated by the hepatic hepcidermic hormone hepcidine which, depending on the cell type, induces internalization and degradation of FPN1 or blocks the FPN1-related iron export mechanism (5,6). The hepcidin-FPN1 axis plays an important role in the pathogenesis of inherited and acquired iron metabolism disorders, including iron overload diseases and iron-restricted anemia (7,8).

FPN1 belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS), which is the largest family of secondary active transporters (9). MFS proteins control the transport of a huge variety of substrates (inorganic ions, metabolites, neurotransmitters, toxins, drugs and other substrates) across biological membranes, according to the so-called “alternative access” mechanism (10,11). MFS proteins have a conserved 12 transmembrane (TM) helix fold that is comprised of two 6-TM helices bundles (N-domain: TM1-TM6; C-domain: TM7-TM12) that are related by twofold pseudosymmetry. The two bundles interact and orchestrate transitions between (at least) three conformational states: outward open, occluded, and inward open. During the structural transitions, the substrate sits in a central cavity between the two bundles and is not accessible to either side of the membrane (11). Several 3D structures of ferroportin 1 have been captured in different organisms and in different conformational states, with various divalent cations mimicking the cognate substrate (Fe^{2+}) in the binding sites of the N- and C-lobes (12–14). These structures provide us with the opportunity to better understand the molecular basis of the iron transport cycle and to identify mammalian or human specificities, and in particular those related to hepcidin regulation (13,14).

Numerous heterozygous FPN1 pathogenic variants have now been reported in patients of different origin. These mutations fall into two functional categories (loss- and gain-of-function) and are responsible for two distinct human diseases. Ferroportin Disease (FD) is caused by germline mutations reducing the ability of FPN1 to export iron through variable molecular mechanisms. The disease phenotype can include elevated plasma iron and parenchymal iron deposition (in older patients) but is mainly characterized by iron accumulation in reticuloendothelial cells, correlating with elevated serum ferritin and low to normal transferrin saturation. Clinical manifestations appear to be rare judging from the reports available in the literature. Hemochromatosis type 4 (HC4) is caused by germline mutations that more or less protect FPN1 from the effects of hepcidin downregulation. This leads to excessive iron export to the bloodstream, increased transferrin saturation and progressive iron accumulation in parenchymal cells (primarily hepatocytes). When observed, hyperferritinemia correlates with the degree of iron overload and its progression. Clinical symptoms are similar to those seen in patients with *HFE*-related hemochromatosis (15–17).

So far, the molecular and physiopathological bases of FD and HC have been regarded as antithetic. Nevertheless, we have previously shown that the non-clinical (*i.e.* not described in a patient, nor in the Genome Aggregation Database gnomAD) Trp42Ala TM1 mutant displays a mixed behavior *in vitro* with a very substantial effect on the ability of FPN1 to export iron out of the cell, but also a partial resistance to hepcidin (18). Herein, we characterize the newly identified p.Arg40Gln and p.Ser47Phe missense variations, which modify other TM1 residues and have been observed in 11 patients presenting with a classical FD phenotype. We demonstrate that these two new variants also result in a co-association of loss-of-function (LoF) and gain-of-function (GoF) properties, while suggesting some specific effects on iron binding and interaction with hepcidin. On the contrary, we confirm that the previously reported and recurrent p.Gly204Ser missense variation (TM2) is responsible for low hepcidin resistance, but not for a defect in the iron export function.

Methods

Plasmid constructs

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

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

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

Generation of stable HEK293T cells exhibiting tetracycline-inducible expression of FPN1

HEK293T cells stably expressing the WT and mutant FPN1 were generated through the Flp-In T-Rex system (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. This construction enables a stable

and tetracycline-inducible expression of the protein of interest. HEK293T-T-Rex cells were transfected with the different pcDNA5-FRT-TO plasmid constructs and pOG44 vector (ThermoFisher Scientific) using the TransIT2020 protocol (Mirus Bio LLC), and selected in the presence of blasticidin (150µg/mL) and hygromycin (300µg/mL) for 3 weeks. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and propagated in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, blasticidin (150µg/mL) and hygromycin (300µg/mL). *SLC40A1* cDNA integration was verified by Sanger sequencing, while FPN1 expression was assessed by Western-Blotting.

⁵⁵Fe release measurements

⁵⁵Fe loading of human apotransferrin was performed as previously described. Briefly, HEK293T cells were seeded at 1 x 10⁵ cells per well in 12-well plates, grown for 24h in supplemented DMEM, and preloaded with 20 µg/ml ⁵⁵Fe-transferrin for 24h before transfection with wild-type or mutated FPN1-V5 plasmid constructs. Fifteen hours post-transfection cells were washed once with PBS and cultured in Pro293a-CDM serum-free medium (BioWhittaker) for up to 36h. ⁵⁵Fe exported into the supernatant was collected, mixed with liquid scintillation fluid (Ultima Gold MV, Packard Bioscience) and counted for 10min in a TRICARB 1600 CA scintillation counter (Packard). Percentage of ⁵⁵Fe export was calculated using the following formula: (⁵⁵Fe in the supernatant at end point, divided by cellular ⁵⁵Fe at time zero) x 100.

Intracellular ⁵⁵Fe measurements

HEK293T cells were transfected with WT or mutated pcDNA3.1_FPN-V5 constructs for 24 h, before being cultured in Pro293a-CDM serum-free medium (Lonza) and preloaded with 20 µg/ml ⁵⁵Fe-transferrin for 16 h. Each pcDNA3.1_FPN-V5 construct was codelivered with the pSV-β-galactosidase (β-gal) vector (Promega, Madison, WI, USA). Cells were harvested with trypsin, mixed with liquid scintillation fluid (Ultima Gold MV; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) and counted for 2 min in a TRI-CARB 1600 CA scintillation counter (PerkinElmer). ⁵⁵Fe radioactivity was normalized on total protein content and β-gal activity.

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

Human HAMP cDNA was amplified with reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from total ribonucleic acid (RNA) isolated from human liver hepatocellular carcinoma HepG2 cells (ATCC). The PCR product was cloned into the PCR2.1 vector using the TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), subcloned into the pcDNA4TM/TO tetracycline-regulated mammalian expression vector (Thermo Fisher Scientific), and checked by sequencing. T-Rex-293 cells (Thermo Fisher Scientific) were stably transfected with calcium phosphate, and colonies were selected in the presence of 1.5 mg/ml blasticidin and 100 mg/ml zeocin for four weeks. Tetracycline (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to induce expression of the 84 amino acids hepcidin pre-propeptide from 1.10⁶ T-Rex-293 cells. After 48h the cell supernatant was collected, filtered through a hydrophilic nylon membrane (pore size: 0.2 µm), and measured for hepcidin-25 levels using a

commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA; Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA, USA). The supernatant was stored at -20°C until used.

Flow cytometry analysis

HEK293T cells were seeded at 1.75×10^5 cells per well in 12-well plates and grown for 8h in supplemented DMEM before transfection. 24h after transfection with the pIRES_FPN1-V5_CD8 constructs, cells were treated (or not) with 4,3nM of human-25 hepcidin for 16 hours. Then, cells were trypsinised, transferred in hemolyse tubes and pelleted at 500g for 5 minutes at 4°C. Cells were resuspended in 100 μ l of PBS-EDTA (Lonza) supplemented with 10% of fetal bovine serum (i.e. flow cytometry buffer), and exposed to anti-V5-FITC (1.13 μ g/tube) (ThermoFisher Scientific) and anti-CD8-APC (Miltenyi Biotec) (2 μ l/tube) antibodies for 20 minutes at 4°C in the dark. After the addition of 1ml of flow cytometry buffer, cells were pelleted at 500g for 5 minutes at 4°C and resuspended in 400 μ l of flow cytometry buffer. Fluorescence intensities were analysed using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and the FlowLogic™ software (Miltenyi Biotec).

Hepcidin binding analysis

Flp-In T-Rex cells expressing different FPN1 mutants were seeded at 4×10^5 cells per well in 6-well plates for 24h before FPN1 expression induction with 1 μ g/mL of tetracyclin. 24h after induction, cells were treated with 10 μ g/mL of C-terminus biotinylated hepcidin (Bachem) for 30 minutes at 37°C. Proteins were extracted using RIPA buffer (Boston BioProducts, Ashland, MA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche), and protein concentration determined by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Protein lysates were co-immunoprecipitated using the Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific). The membranes were revealed as described above.

Detection of FPN1 ubiquitination

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

3D structure modeling and analysis

3D structures were extracted from the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) and manipulated using Chimera 1.13.1. (19). We also considered a model of the global organization of mammalian ferroportin in the inward-facing state (20); this one was based on the superimposition of the N- and C-lobes of the outward-facing 3D structures of mammalian ferroportin proteins on the inward-facing 3D structures of BbFpn.

Results

Clinical data and segregation analysis

Three heterozygous *SLC40A1* missense variations were identified in 15 individuals (5 females, 10 males; Table 1). All these individuals were negative for genotypes known to cause hemochromatosis types 1-3 (in the *HFE*, *HJV*, *HAMP* and *TFR2* genes), hyperferritinemia-cataract (*FTL* – 5' untranslated region) or benign hyperferritinemia in absence of cataract (*FTL* – exon 1). They were also negative for the few *BMP6* variants (p.Pro95Leu, p.Leu96Pro and p.Gln113Glu) that have been associated with mild to moderate late-onset iron overload (21,22).

The previously known p.Gly204Ser variation (23,24); GnomAD global allele frequency of 0.000008) was found in two unrelated patients with high serum ferritin levels (> 800µg/L) and elevated transferrin saturation levels (> 60%). Hepatic iron concentration was evaluated using the Gandon's magnetic resonance imaging (MRI) method in the two patients with values greater than 250 µmol/g.

The p.Arg40Gln variation was identified in a 68-year old man presenting with very high serum ferritin (2000µg/L) and moderately elevated transferrin saturation (55%). It had not been reported in patients with iron overload before, but is described in the Genome Aggregation Database with a global allele frequency of 0.000004 (one identified heterozygous female from an undefined population; *i.e.* the "other" category of GnomAD).

The p.Ser47Phe (NM_014585.5: c.140C>T) variation was newly identified in a pedigree originating from northeast France (Figure 1). It co-segregated with high serum ferritin ($\geq 1000\mu\text{g/L}$) in four family members (cases II.2, II.4, III.5, III.6 and III.9) and was absent in three non-affected members of the third generation (subjects III.1, III.7 and III.8). Incomplete penetrance was suggested to explain normal iron indices in a 53-year-old woman (subject III.3). The situation was less obvious in a 83-year-old man and his 78-year sister who presented with elevated serum ferritin levels (subject II.1: 804 µg/L; subject II.3: 377 µg/L;) while being negative for the p.Ser47Phe variant.

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

Overall, the phenotypes observed in the 11 p.Arg40Gln or p.Ser47Phe positive patients were suggestive of a loss of FPN1 function, whereas those observed in the p.Gly204Ser positive patients were indicative of a gain of FPN1 function.

Functional characterization of the FPN1 p.Arg40Gln, p.Ser47Phe and p.Gly204Ser mutants

Cell surface expression and iron export ability

A bicistronic construct was used to evaluate the concurrent plasma membrane expression of human FPN1 (conjugated with a V5 epitope) and cluster of differentiation 8 (CD8) in transiently transfected HEK293T cells on flow cytometry, as previously reported (25). The p.Val162del single amino acid deletion, which is known to prevent cell surface localization (26), was used as negative control. An important difference was observed in the proportions of FPN1-WT⁺/CD8⁺ and FPN1-V162del⁺/CD8⁺ cells ($p < 0.001$), confirming that the Val162del mutant causes FPN1 mislocalization, whereas no differences were observed between cells transfected with the FPN1-WT/CD8, FPN1-Arg40Gln/CD8, FPN1-Ser47Phe/CD8 or FPN1-Gly204Ser/CD8 constructs (Figure 2A). A second series of experiments was performed using a cell-surface proteins biotinylation and isolation protocol, leading to similar results (Supplementary Figure 1).

The *in vitro* activity of the FPN1 p.Arg40Gln, p.Ser47Phe and p.Gly204Ser mutants was assessed using radioactively labeled iron, in experiments measuring either the export of iron (Figure 2B) or its cellular retention (Figure 2C) according to previously validated protocols (25,27). As shown in Figure 2B, HEK293T cells transiently transfected with a pcDNA3.1 plasmid encoding the wild type FPN1-V5 fusion protein displayed a 3-fold increase in iron release than cells transfected with the commercial pcDNA3.1-V5-His empty vector (No FPN1). The p.Ser47Phe mutant was not able to export ⁵⁵Fe in amounts comparable with WT FPN1 ($p < 0.01$), but was more active than the well-known LoF mutant p.Ala77Asp ($p < 0.0001$). The p.Gly204Ser variant did not alter the exporting function of FPN1. In the inverse experiment, cells transiently transfected with the WT FPN1-V5 fusion protein displayed 2- to 3-fold lower iron accumulation than cells transiently transfected with the pcDNA3.1-V5-His empty vector (No FPN1), or a pcDNA3.1 plasmid encoding the mutated FPN1-A77D-V5 fusion protein ($p < 0.001$). Similar to the p.Ser47Phe mutant, the p.Arg40Gln mutant was not able to export ⁵⁵Fe in amounts comparable with WT FPN1 ($p < 0.001$), but was more active than the p.Ala77Asp mutant ($p < 0.001$).

These results indicate that the p.Gly204Ser mutant retains a full capacity to export iron out of cell, whereas this function is partially lost with the p.Arg40Gln and p.Ser47Phe mutants that reach the cell surface correctly.

Resistance to hepcidin

To investigate whether the p.Arg40Gln, p.Ser47Phe and p.Gly204Ser missense mutations could modify response to hepcidin, transiently transfected HEK293T cells were cultured for 16h with conditioned media derived from T-Rex-293 cells stably expressing the full-length human *HAMP* cDNA. Two known FPN1 GoF mutants served as positive controls: p.Asn144His, which shows partial resistance to hepcidin inhibition, and p.Cys326Tyr, which abolishes hepcidin binding to FPN1 and is responsible for complete resistance (28,29).

As expected, the addition of hepcidin to cells expressing WT FPN1 resulted in the disappearance of the iron exporter from the plasma membrane. The flow cytometry pattern of the p.Gly204Ser mutant was quite similar to that of WT FPN1, whereas the p.Arg40Gly and p.Ser47Phe mutants showed intermediate resistance between the p.Asn144His and p.Cys326Tyr controls (Figure 2A).

Flow cytometry was additionally used to test lower concentrations of native human hepcidin-25 and try to detect differences between the p.Asn144His and p.Gly204Ser mutants. As shown in Figure 3B, expression of WT FPN1 at the plasma membrane of HEK293T cells decreased as a function of hepcidin concentrations. The p.Gly204Ser variant decreased less than WT FPN1 for all hepcidin concentrations, but still more than the p.Asn144His control ($p < 0.05$); the largest differences being observed at 0.54nM hepcidin (Figure 3C).

Fernandes and collaborators demonstrated that the cysteine to serine (p.Cys326Ser) and cysteine to threonine (p.Cys326Tyr) changes at position 326 of the human FPN1 C-lobe prevent hepcidin binding, whereas the p.Asn144Asp and p.Asn144Thr missense mutations do not (29). We obtained comparable results using stably transfected T-Rex-293 cells expressing, upon induction by tetracycline, either the wild type FPN1-V5 fusion protein or the FPN1-C326Y-V5 and FPN1-N144H-V5 mutants (Figure 4A). We reproduced these findings in transiently transfected HEK293T cells, where we further tested the p.Arg40Gln, p.Ser47Phe and p.Gly204Ser mutants. As shown in Figure 4B, the three FPN1 mutants co-purified with hepcidin in amounts similar to that of WT FPN1.

Ubiquitination is a necessary condition for internalization and degradation of FPN1 after exposure to hepcidin in various cells, including the HEK293 cell line (30). We studied the ubiquitination of the iron transporter before and after hepcidin treatment in stably transfected T-Rex-293 cells, as well as in transiently transfected HEK293T cells. Cells over-expressing different FPN1-V5 fusion proteins were treated with human native hepcidin-25 and, after V5-tagged protein purification, the ubiquitination was revealed by Western blotting with an anti-poly/mono ubiquitin (FK2) antibody. As described previously (30), we detected ubiquitination after 30 minutes of hepcidin treatment on the wild type protein. The ubiquitinated species of the human FPN1-V5 fusion protein migrated in SDS-PAGE with an apparent mass of between 140 and 180 kDa, which was indicative of the addition of about ten ubiquitin molecules (Figure 5A). Compared to FPN1 WT, the ubiquitination of the FPN1-C326Y-V5 and FPN1-S47F-V5 mutants was very low to undetectable, while that of the FPN1-G204S-V5 mutant appeared similar and that of FPN1-R40Q-V5 somewhat intermediate.

These results indicate that p.Arg40Gln, p.Ser47Phe and p.Gly204Ser reduce the sensitivity of FPN1 to hepcidin, without profoundly altering the FPN1/hepcidin interaction, but with possible differences in the underlying mechanism of internalization and degradation.

3D structure analysis

In primate proteins (human: HsFPN1; Philippine tarsier: TsFpn), which so far have only been solved in Outward-Facing (OF) states, a primary site for cation-binding has been located on TM1, with two essential

coordinating residues: Asp39 and His43 (13,14). This contrasts with the results obtained with the prokaryotic ortholog BbFpn, where the divalent cation binding site in the N-lobe is thought to also involve a few residues in TM6 (including Asn196, Ser215 and Phe200; corresponding to Asn212, Ser215 and Met216 in human FPN1) (12,31). In fact, in HsFPN1 and TsFpn TM6 is further away from TM1 and Asp39 has a different rotamer conformation, which should not allow the residues identified in TM6 to participate in the formation of a metal binding site. In the OF structure of HsFPN1 recently solved by Billesbølle *et al.* in the presence of cobalt and hepcidin ((14); pdb 6WBV), Arg40 and Ser47 emerge in the close vicinity of Asp39 and His43, whereas Gly204 is positioned at the extracellular end of TM6 (Figure 6A). One hydrogen bond is formed between the side chain of Ser47 and the main-chain oxygen atom of His43, which may stabilize the N-lobe metal binding site. Arg40, instead, is not in position to directly interact with Asp39, His43 or the metal ion.

A second metal-binding site has been identified in both HsFPN1 and TsFpn within the C-lobe (13,14). This second site is different from the first one in that it exploits a structural feature that is not observed in other MFS proteins: a non-helical stretch of six residues in the center of TM7 that separates the helix into a longer TM7a and a shorter TM7b. This unique feature, which is also observed in the crystal structures of BbFpn (12), has been posited to be important in both iron and hepcidin binding (13,14,31). In all-atom molecular dynamic simulations of HsFPN1 with and without Fe^{2+} , Billesbølle *et al.* actually observed mobility of TM7b with considerable fluctuations of Asp325 (located at the C-terminal extremity of the unwound TM7 region, at the base of TM7b). Asp325 and TM7b were less mobile in simulations with iron bounds at the C-lobe site, a situation that was subsequently associated with the formation of an interaction network between Asp325 (TM7b), Cys326(TM7b), His507(TM11), Co^{2+} , and the carboxy terminus of hepcidin (14). As shown in Figure 6A, the sulfur atom of Cys326 interacts with the main-chain oxygen atoms (O and OXT) of hepcidin Thr25, which itself directly contacts Co^{2+} . In this HsFPN1-hepcidin complex, His507 interacts with Cys326, Co^{2+} , and Asp325 by means of a water molecule. A tetrahedral coordination geometry (no observed in TsFpn) is finally achieved by Asp325 that forms a hydrogen bond with Cys326 and is also indirectly linked to the divalent metal, His507 and Thr25 (via the water molecule). What is remarkable, and has not been revealed before, is that Ser47 also forms a hydrogen bond with the main chain oxygen atom of hepcidin Pro5. Ser47 thus forms a second interaction network with His43 and Asp39 in the center of helix TM1 of HsFPN1 and the N-terminal part of hepcidin, which faces the metal- and hepcidin-binding site within the HsFPN1 C-lobe (Figure 6A).

The 6WBV outward-facing state structure solved by Billesbølle *et al.* also helps to realize that hepcidin contacts HsFPN1 over a relatively large area involving different helices of the extracellular side of the N- and C-lobes. As shown in Figure 6B, the side chains of Ser47 (in red), but also Arg40 (in blue), are accessible in the deepest buried surface area of the central cavity, in which hepcidin is inserted. Interestingly, several contacts extend along the TM5 helix (in yellow) up to the terminal methionine 196, which faces glycine 204 and permits a tight packing with the TM6 helix (Figure 6A).

A fundamental aspect of the transport mechanism of MFS proteins lies in concerted switch between the two N- and C-lobes over a rotation axis that crosses a central cavity, where the substrate sits. The conformational transitions are accompanied by the formation of non-covalent inter and intra-lobes interactions, forming the so-called intracellular and extracellular gates. It is suggested that the MFS extracellular gate is mainly achieved through the bending of the extracellular ends of helices TM1 and TM7, and occasionally the flanking helices TM2 and TM8 (11,32). Based on the possible arrangement of the HsFPN1 and TsFpn N- and C-lobes in the inward-facing state, we previously suggested that Asp325 may form an inter-lobe salt-bridge with Arg40 when not interacting with Cys326. This interaction may be a key feature of the extracellular gate, being involved in the conformational switch when iron sits in the core of the transporter awaiting translocation (20).

Taken together, these observations suggest that Ser47 is indirectly involved in iron coordination within the HsFPN1 N-lobe, while interacting directly with hepcidin. The serine-to-phenylalanine 47 substitution in such an environment is predicted to cause local instability, with consequences on both the iron export function and sensitivity to hepcidin. Arg40 may play a critical role in the extracellular gate architecture of HsFPN1, and the p.Arg40Gln missense variation could prevent the putative interaction between TM1 and TM7b helices with a possible direct impact on the conformational dynamics of HsFPN1 and its ability to export iron out of the cell. Arg40 also emerges from deeply buried positions of HsFPN1 that participate in the formation of a hepcidin-binding site within the N-lobe. The change by a glutamine could alter the overall polar and hydrophobic properties of this secondary hepcidin-binding site. The trickiest thing to understand is the subtle effect of the p.Gly204Ser variation in the helix TM6, which results in only weak resistance to hepcidin. It could be the result of a default in packing between the extracellular ends of TM5 and TM6, with more notable consequences when the N- and C-lobes move away from each other upon binding to hepcidin and intra-lobe conformational are thought to facilitate ubiquitination of the large intracellular loop between TM6 and TM7.

Discussion

The alternating access mechanism of MFS transporters is achieved through the rigid-body motion of the N-domain and the C-domain around the centrally located substrate binding site(s). This rigid body motion results in switching between inward-open and outward-open conformational states. In these two end states, the N- and the C-lobes are further connected by intermediate conformations, which correspond to the so-called “cytoplasmic” and “periplasmic gates” and are formed by the tight packing of the intracellular (outward-facing state) or extracellular (inward-facing state) ends of several transmembrane helices. It is furthermore speculated that substrate binding has a key role in eliciting the conformational changes (10,11,32). In the MFS transporters, TM1 is invariably involved in the formation of the extracellular gate with TM7, and occasionally TM2 and TM8. In the ferroportin proteins (bacteria, Philippine tarsier and human), it holds residues that are important for iron binding, and actually participate to the posited primary site for iron export within the N-lobe (12–14,31). Exploring the structural architecture of human FPN1, we

reveal here that TM1 also contacts hepcidin in a manner that can help to overcome the classic dichotomy between loss-of-function and gain-of-function *SLC40A1* disease-causing mutations.

Our functional analyses reveal that the two missense variations p.Arg40Gln and p.Ser47Phe of TM1 are fairly similar in the sense that : i) they reduce the ability of FPN1 to export iron out the cell, although they do not cause FPN1 mislocalization as we have previously reported for numerous missense variations altering the intracellular gate (25,33), and ii) they reduce the sensitivity of FPN1 to hepcidin, although they do not obviously alter the FPN1/hepcidin interaction as it has been previously reported by Fernandes *et al.* for other missense variations located in the TM2 or TM4 helices of the N-domain (29). Our structural analyses, on the other hand, make it possible to distinguish two molecular mechanisms. The Ser47Phe novel missense variation is very likely to disrupt a previously unreported H-bond interaction network that associates Ser47 with both the two key iron coordinating residues Asp35 and His43 and the N-terminus moiety of hepcidin. That the primary binding site of hepcidin, at the Cys326 position and flanking positions in the TM7b and TM11 helices of the C-domain (14), is not altered may serve to explain that we had not observed a marked decrease in the FPN1/hepcidin interaction in Figure 4. It is worth noting that the double mutant Asp39Ala-His43Ala in TsFpn has been documented as defective in iron transport but insensitive to hepcidin (13). The consequences of the p.Arg40Gln missense variation appear in a more indirect way. The 40Gln mutant is thought to prevent an inter-domain salt bridge within TM1 and TM7b in the inward-facing state before iron binding, which could be a key element for stabilizing FPN1 in this conformation (20). This salt-bridge, which is supposed to be formed between the critical Asp39 and His43 positions (with Asp325 in TM7b), could also play an essential role in the local conformation of the primary iron binding site within the central cavity. The topology and accessibility of TM1 and TM7b around the Arg40 and Asp325 residues in the predicted inward-facing state are such that they suggest an additional role for Ser47 in the formation of the extracellular gate (with a partner in TM7b that remains to be identified). Why the p.Arg40Gln substitution affects downregulation by hepcidin is even more subtle. As observed for the 47Phe mutant, the 40Gln mutant does not clearly affect hepcidin binding. It is however, but may be to a lesser extent, also associated with reduced ubiquitination upon hepcidin binding (Figure 5). This suggest that TM1 plays a particular role in the conformational changes of the N-lobe that must happen as a result of hepcidin binding, and especially those which must facilitate the access of the large intracellular loop between TM6 and TM7 for ubiquitination (30). Such a role has been proposed by Billesbølle *et al.* for the flanking TM2 helix where the Tyr64 residue has been identified as interacting with the hepcidin Phe4 and Ile6 residues (14). It is also worth noting that the p.Tyr64Asn hemochromatosis type 4 causing mutation has been consistently reported to reduce FPN1 ubiquitination and prevent its intracellular degradation, without altering hepcidin binding (29,34).

The p.Arg40Gln and p.Ser47Phe are the first missense variations to be reported in the transmembrane helix 1 of FPN1 in patients with iron overload (Uguen *et al.* in preparation). In total, we identified 13 mutation carriers: 2 with p.Arg40Gln and 11 with p.Ser47Phe. In most of the patients,

hyperferritinemia contrasted with normal or low transferrin saturation levels. A 53-year-old woman and her 22-year-old son had normal iron indices. Only two men displayed serum ferritin concentrations > 1500 µg/L and transferrin saturation levels > 60%. The two considered patients also had very important increases in hepatic iron store (HIC ≥ 300 µmol/g). All these findings recapitulate the particular features of FD, which are: cellular iron accumulation without evidence of plasma iron overload, lack of penetrance (especially in women), and the likelihood of mixed iron overload in elderly patients (15–17). The observed phenotypes do not appear to be the result of a balance between loss- and gain-of-function properties. Rather, they are consistent with the unique iron export function of FPN1, which is considered as a permanent action in different specialized cells of iron metabolism (primarily the macrophages) to fulfill the daily needs of erythropoiesis (among others), and the fact that hepcidin synthesis is closely related to circulating iron levels (2,3,35). Basically, the less FPN1 is able to export iron, the less the liver is expected to produce hepcidin to regulate the concentration of iron in plasma and its subsequent distribution in various preferred tissues. It should also be remembered that hepcidin binding to FPN1 is iron dependent (14). It therefore seems appropriate to ascribe the phenotypic expression of the ambivalent *SLC40A1* missense mutations to the permanent state of FPN1 inactivation and, in turn, to consider the gain-of-function situation as clinically negligible (if not only observable in *in vitro* models). Further observations are however warranted to draw a more definitive conclusion.

In conclusion, while FD is typically considered a *SLC40A1* loss-of-function disease and HC4 a *SLC40A1* gain-of-function disease, our results situate the two recurrent p.Arg40Gln and p.Ser47Phe missense variations in an intermediate set of FD disease-causing mutations with both loss- and gain-of-function properties. These two atypical mutations are located in the transmembrane helix 1 of the major facilitator superfamily-type iron exporter FPN1, remotely to the previously reported p.Gly204Ser substitution (TM6) that does not produce more than a weak resistance to hepcidin. Clarifying the molecular mechanisms by which the TM1 missense mutations affect the iron export function and responsiveness to hepcidin will improve our knowledge of the structural and molecular biology of the FPN1 protein.

References

1. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* mars 2005;1(3):191-200.
2. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 9 juill 2010;142(1):24-38.
3. Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 3 nov 2015;22(5):777-87.
4. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* déc 2017;106(Suppl 6):1559S-1566S.
5. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 17 déc

2004;306(5704):2090-3.

6. Zhang DL, Ghosh MC, Ollivierre H, Li Y, Rouault TA. Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. *Blood*. 8 nov 2018;132(19):2078-87.
7. Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:538-42.
8. Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood*. 9 juin 2016;127(23):2809-13.
9. Marger MD, Saier MH. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci*. janv 1993;18(1):13-20.
10. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(2):123-32.
11. Drew D, North RA, Nagarathinam K, Tanabe M. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chem Rev*. 22 avr 2021;
12. Taniguchi R, Kato HE, Font J, Deshpande CN, Wada M, Ito K, et al. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat Commun*. 2015;6:8545.
13. Pan Y, Ren Z, Gao S, Shen J, Wang L, Xu Z, et al. Structural basis of ion transport and inhibition in ferroportin. *Nat Commun*. 10 nov 2020;11(1):5686.
14. Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, Powers AS, Gonen S, Schneider S, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*. 19 août 2020;
15. Vlasveld LT, Janssen R, Bardou-Jacquet E, Venselaar H, Hamdi-Roze H, Drakesmith H, et al. Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features. *Pharmaceuticals (Basel)*. 9 sept 2019;12(3).
16. Piperno A, Pelucchi S, Mariani R. Inherited iron overload disorders. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:25.
17. Pietrangelo A. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica*. déc 2017;102(12):1972-84.
18. Le Gac G, Ka C, Joubrel R, Gourlaouen I, Lehn P, Mornon JP, et al. Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Hum Mutat*. oct 2013;34(10):1371-80.
19. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. oct 2004;25(13):1605-12.
20. Le Tertre M, Elbahsi A, Ka C, Callebaut I, Le Gac G. Insights into the Role of the Discontinuous TM7 Helix of Human Ferroportin through the Prism of the Asp325 Residue. *Int J Mol Sci*. 15 juin 2021;22(12):6412.
21. Daher R, Kannengiesser C, Houamel D, Lefebvre T, Bardou-Jacquet E, Ducrot N, et al. Heterozygous

Mutations in BMP6 Pro-peptide Lead to Inappropriate Hepcidin Synthesis and Moderate Iron Overload in Humans. *Gastroenterology*. 12 nov 2015;

22. Le Gac G, Gourlaouen I, Ka C, Férec C. The p.Leu96Pro Missense Mutation in the BMP6 Gene Is Repeatedly Associated With Hyperferritinemia in Patients of French Origin. *Gastroenterology*. oct 2016;151(4):769-70.

23. Santos PCJL, Cançado RD, Pereira AC, Schettert IT, Soares RAG, Pagliusi RA, et al. Hereditary hemochromatosis: mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis*. 15 avr 2011;46(4):302-7.

24. Détiavaud L, Island ML, Jouanolle AM, Ropert M, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, et al. Ferroportin Diseases: Functional Studies, a Link Between Genetic and Clinical Phenotype. *Hum Mutat*. 13 août 2013;

25. Guellec J, Elbahnsi A, Le Tertre M, Uguen K, Gourlaouen I, Férec C, et al. Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB J*. déc 2019;33(12):14625-35.

26. Schimanski LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, et al. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood*. 15 mai 2005;105(10):4096-102.

27. Létocart E, Le Gac G, Majore S, Ka C, Radio FC, Gourlaouen I, et al. A novel missense mutation in SLC40A1 results in resistance to hepcidin and confirms the existence of two ferroportin-associated iron overload diseases. *Br J Haematol*. nov 2009;147(3):379-85.

28. Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, et al. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 1 août 2005;106(3):1092-7.

29. Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T, et al. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*. 9 juill 2009;114(2):437-43.

30. Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez MJ, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab*. 6 juin 2012;15(6):918-24.

31. Deshpande CN, Ruwe TA, Shawki A, Xin V, Vieth KR, Valore EV, et al. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat Commun*. 6 août 2018;9(1):3075.

32. Fowler PW, Orwick-Rydmark M, Radestock S, Solcan N, Dijkman PM, Lyons JA, et al. Gating topology of the proton-coupled oligopeptide symporters. *Structure*. 3 févr 2015;23(2):290-301.

33. Ka C, Guellec J, Perpermans X, Kannengiesser C, Ged C, Wuyts W, et al. The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica*. 12 juill 2018;

34. Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, et al. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood*. 22 2018;131(8):899-910.

35. Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev.* oct 2013;93(4):1721-41.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Figure and Table legends

Figure 1. Pedigree of the French iron overload family in which the *SLC40A1* p.Ser47Phe missense variation was identified. The arrow indicates the index case. Hyperferritinemia: ≥ 300 $\mu\text{g/L}$ in men and ≥ 200 $\mu\text{g/L}$ in pre-menopausal women. Elevated transferrin saturation: $\geq 60\%$ in men 50% in women. NA: data not available.

Figure 2. The p.Ser47Phe and p.Arg40Gln variants show normal surface expression but loss of iron export.

A) HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1-V5 and CD8. After 36 h, cells were double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. B) HEK293T cells were grown in 20 $\mu\text{g/mL}$ ^{55}Fe -transferrin for 24h before being washed and transiently transfected with wild-type or mutated *SLC40A1*-V5 expression plasmids. After 15 h, cells were washed and then serum-starved. The ^{55}Fe exported into the supernatant was collected at 36h. Data are presented as percentage of cellular radioactivity at time zero. *P* values were calculated by a Student's *t* test. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$. C) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and then fed with 20 $\mu\text{g/ml}$ ^{55}Fe -transferrin for 16 h. Cells were then washed and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -gal activity. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. ***.

Figure 3. The p.Ser47Phe, p.Arg40Gln and p.Gly204Ser variants show different levels of hepcidin resistance.

HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1-V5 and CD8 24 hours before being treated with 4.3 (A), [0-1.08] (B) or 0.54nM (C) of native hepcidin for 16 hours. Cells were then double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Figure 4. The p.Ser47Phe, p.Arg40Gln and p.Gly204Ser variants do not impair hepcidin binding.

HEK293 cells stably expressing tetracycline inducible FPN1-WT-V5, FPN1-Cys326Tyr-V5 or FPN1-Asn144His-V5 proteins (A), or HEK293T cells transiently transfected with pcDNA3.1_FPN1-V5 constructs (either pcDNA3.1_FPN1-WT-V5, pcDNA3.1_FPN1-Cys326Tyr-V5, pcDNA3.1_FPN1-Asn144His-V5, pcDNA3.1_FPN1-Arg40Gln-V5, pcDNA3.1_FPN1-Ser47Phe-V5 or pcDNA3.1_FPN1-Gly204Ser-V5) (B), were treated with a C-ter biotinylated hepcidin-25 for 30 min, before being washed and lysed. The FPN1-hepcidin

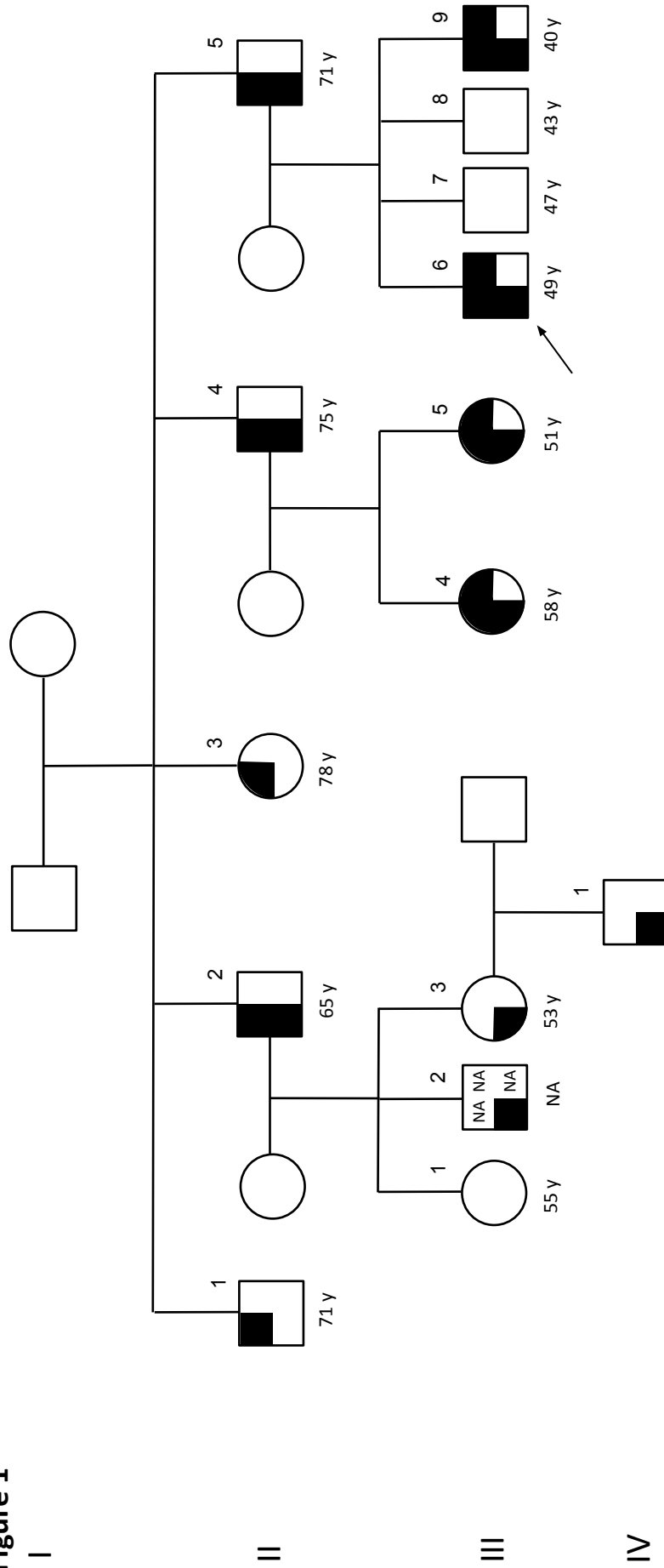
complexes were purified on streptavidin beads and revealed by western blot analysis with V5 antibody (Eluate); the fraction of FPN1-V5 not bound to hepcidin in each lysate is shown for comparison (flow-through).

Figure 5. The p.Ser47Phe, p.Arg40Gln and p.Gly204Ser variants show different degrees of ubiquitination after exposure to hepcidin. (A) HEK293 stably transfected with a tetracycline-inducible wild type FPN1-V5 fusion protein were treated with 4.3 nM native hepcidine for up to 120 min. Cells lysates were immunoprecipitated with anti-V5 and blotted with anti-poly/mono ubiquitin antibody (FK2). The blot was reblotted with the anti-V5 antibody to confirm FPN1-V5 protein expression. (B) Transiently transfected HEK293T cells (pcDNA3.1_FPN1-WT-V5, pcDNA3.1_FPN1-Cys326Tyr-V5, pcDNA3.1_FPN1-Arg40Gln-V5, pcDNA3.1_FPN1-Ser47Phe-V5 or pcDNA3.1_FPN1-Gly204Ser-V5) were treated with 4.3 nM native hepcidine for 30 min. Cells lysates were processed as described in (A). The data presented are representative of two independent experiments.

Figure 6. Close-up views of the iron- and-hepcidin binding sites within the HsFPN1 N- and C-lobes in an outward-facing conformation. Ribbon (A) and surface (B) representations of human FPN1 are shown, in complex with hepcidin (blue ribbon) (pdb:6WBV). Amino acids discussed in the text are shown with atomic details. The cobalt ions are represented as pink spheres, while a water molecule is shown in red in the ion binding site of the C-lobe.

Table 1. Description of the study sample: SLC40A1 missense variations, family relationships, biological and clinical data. *Age at diagnosis. **Occasional: less than 1 drink per day for women and 2 drinks per day for men; Daily: At least than 1 drink per day for women and 2 drinks per day for men. TS: transferrin saturation (normal value \leq 50% in females, \leq 60% in males); SF: serum ferritin (normal value \leq 200 μ g/L in females, \leq 300 in males); ASAT: aspartate aminotransferase (normal range 5-50 IU/L); ALT: alanine aminotransferase (normal range 5-50 IU/L); GGT: gamma-glutamyl transferase (normal range 5-55 IU/L); Alkaline phosphatase: (normal range 44-147 IU/L); RBC: Red Blood Cells (normal range 4.0-5.7 x 10¹²/L); Hb: hemoglobin (normal range 12.0- 18.0 g/dL); Ht: hematocrit (normal range 37-52%); MCV: mean corpuscular volume (normal range 80-95 fL); HIC: hepatic iron concentration (normal value < 36 μ mol/g).

Figure 1



Hyperferritinemia

Elevated transferrin Saturation

Heterozygous for the p.Ser47Phe missense variation

Figure 2

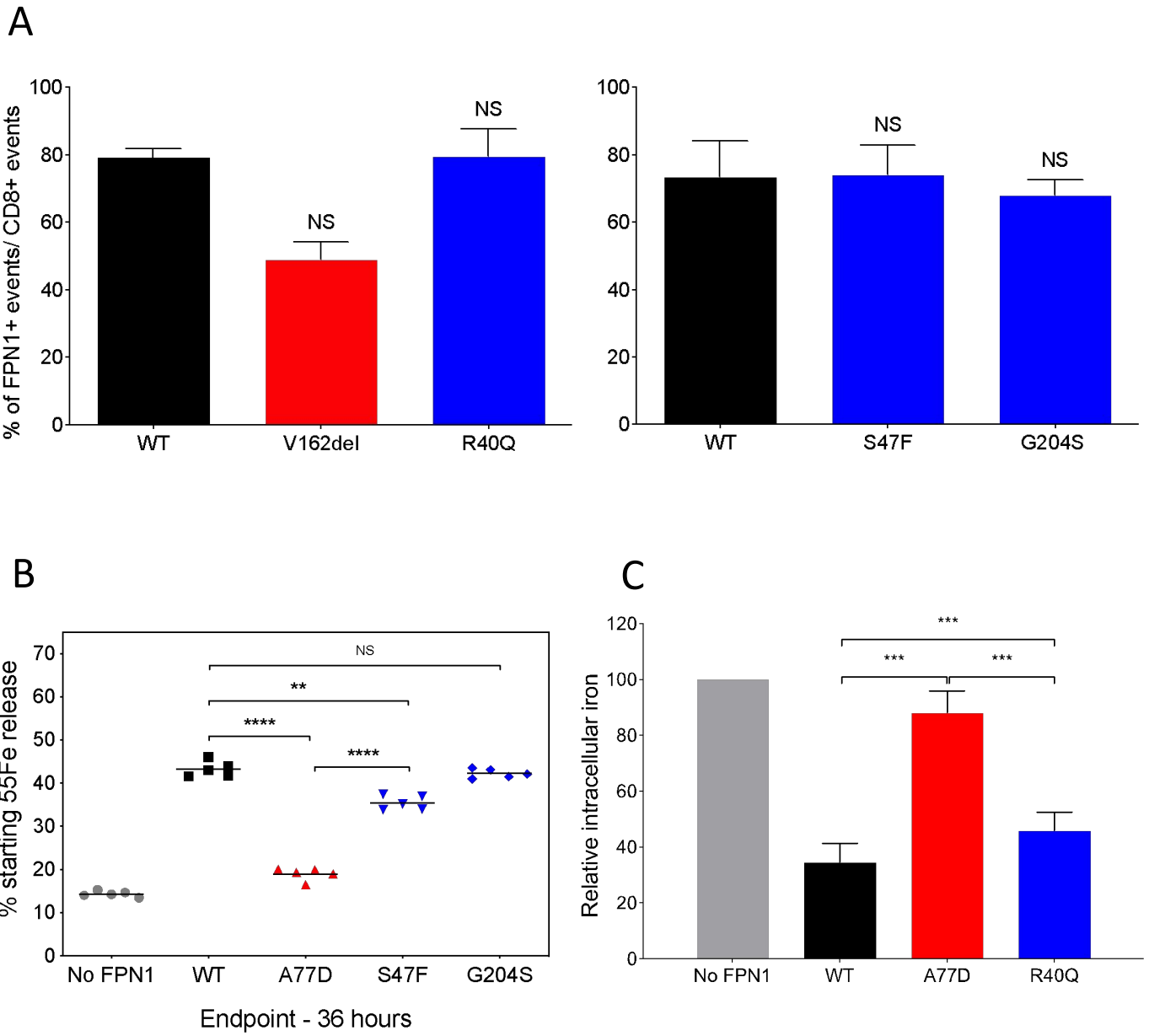
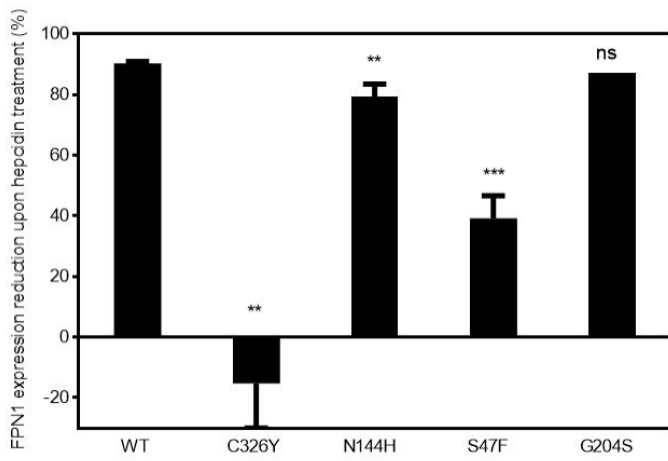
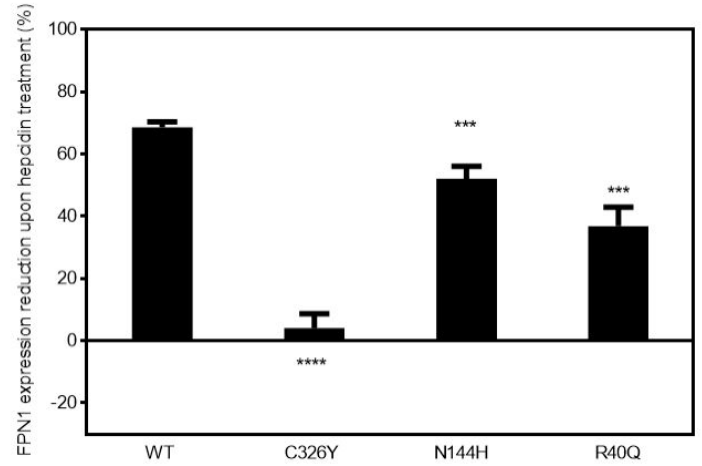


Figure 3

A

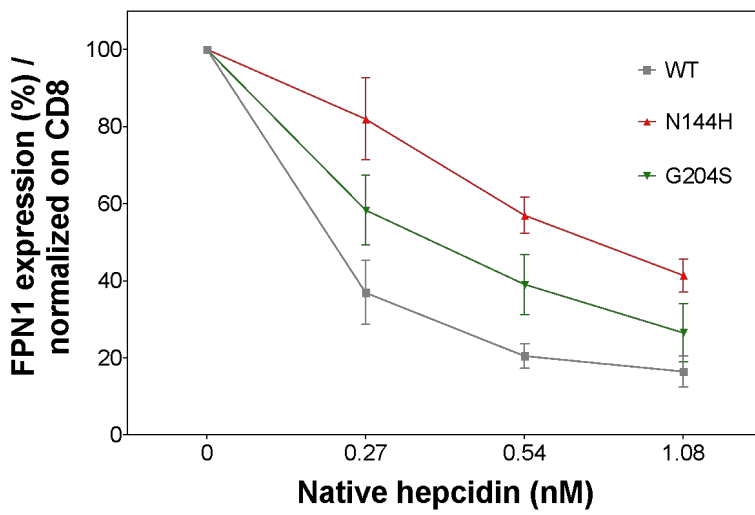


Native hepcidin (4.3 nM)

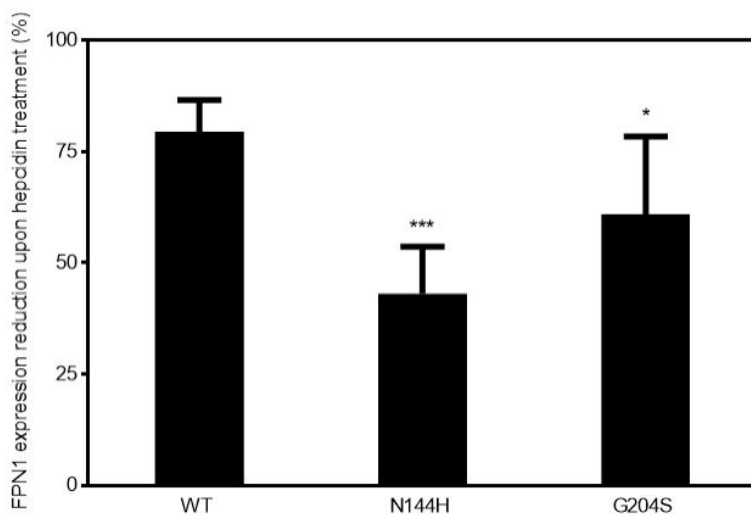


Native hepcidin (4.3 nM)

B



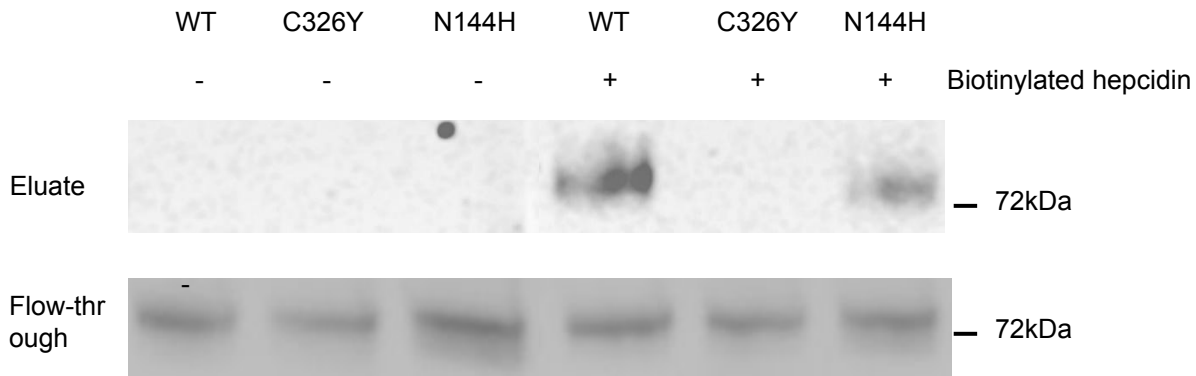
C



Native hepcidin (0.54 nM)

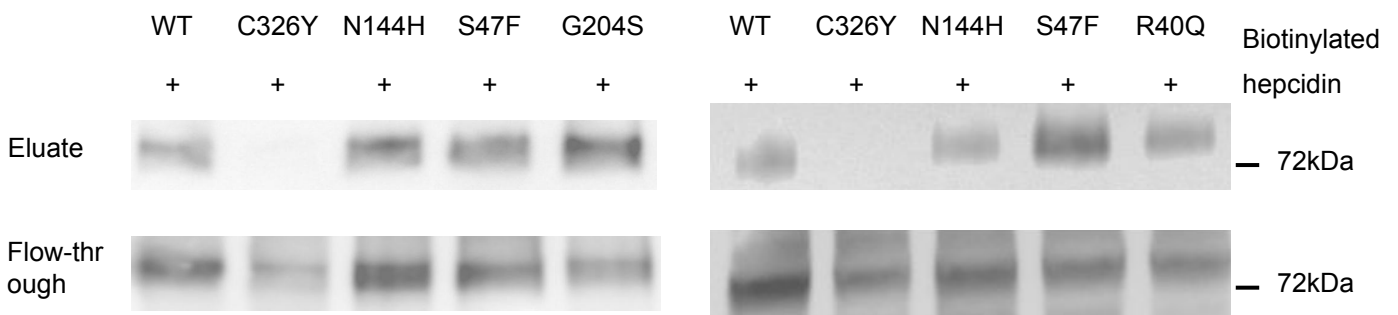
Figure 4

A



B

Experiment 1



Experiment 2

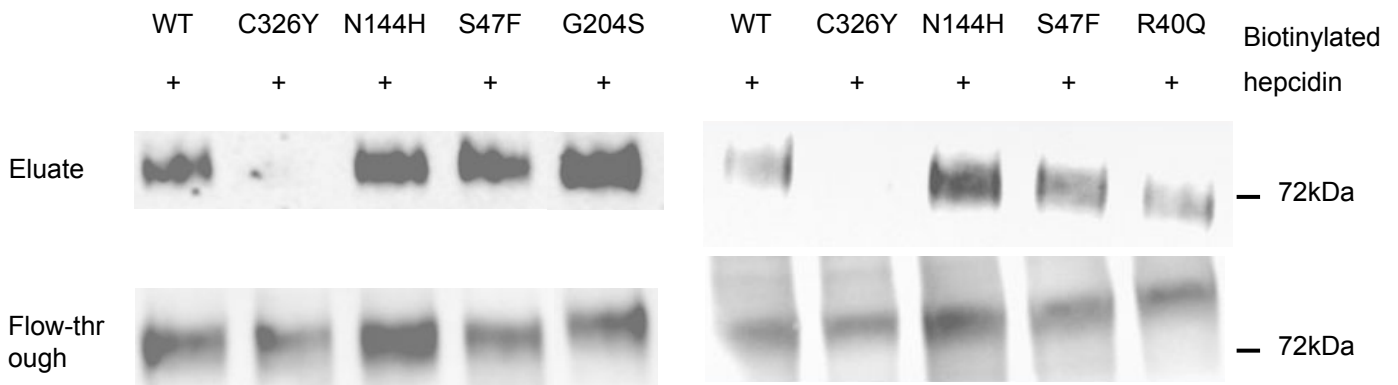
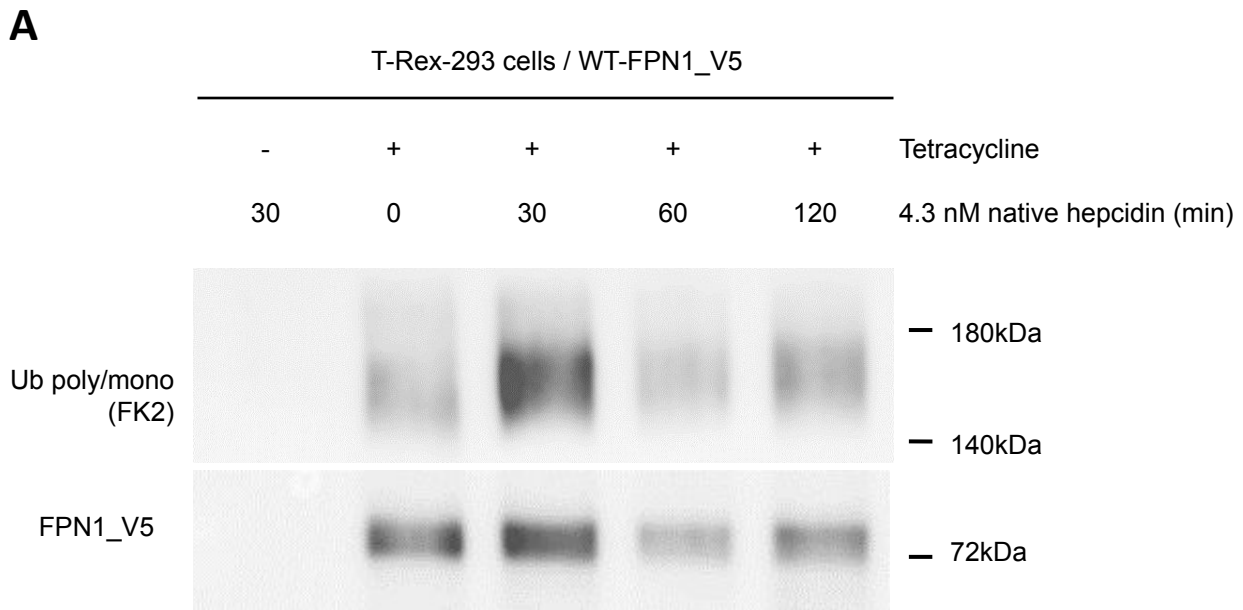


Figure 5



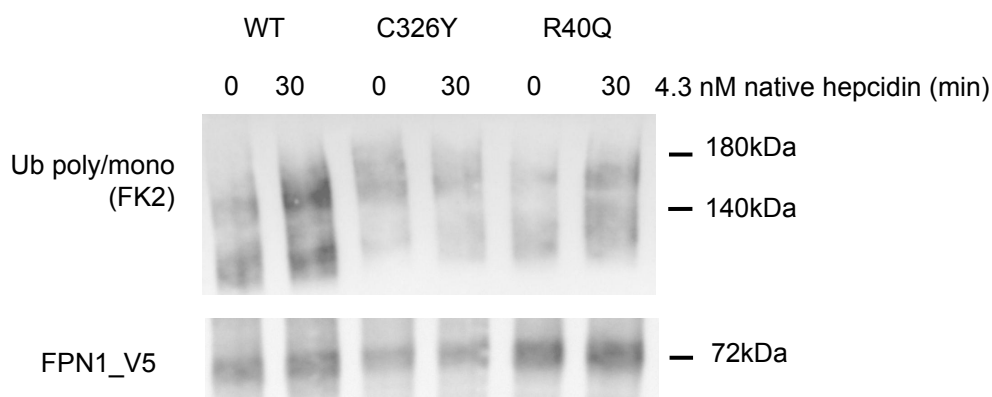
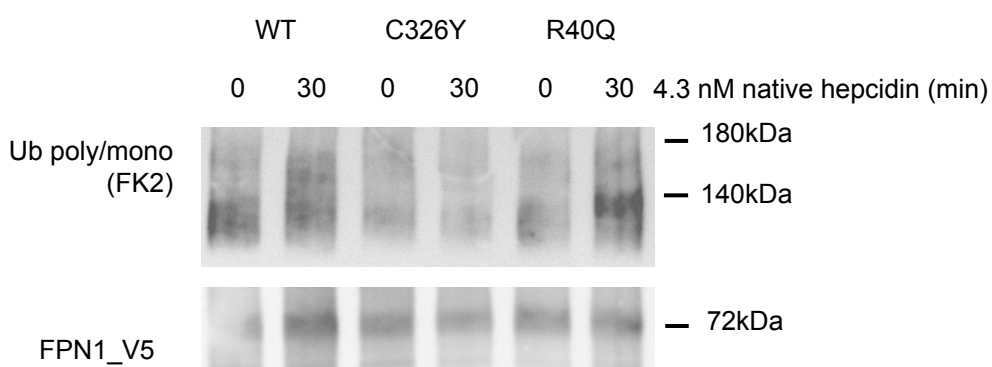
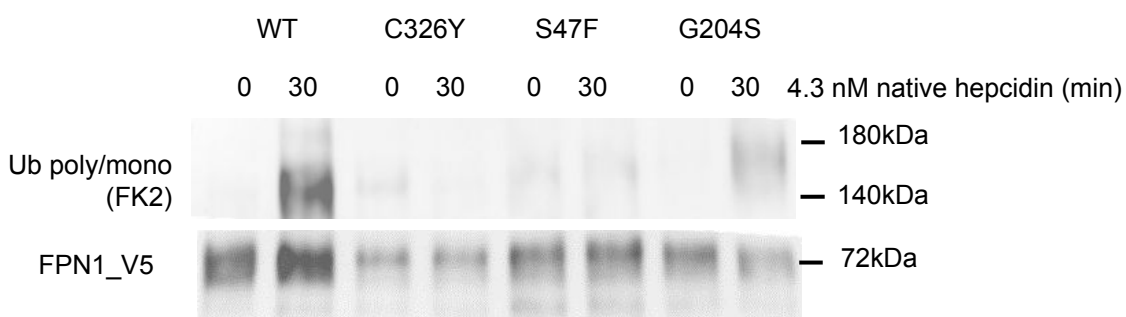
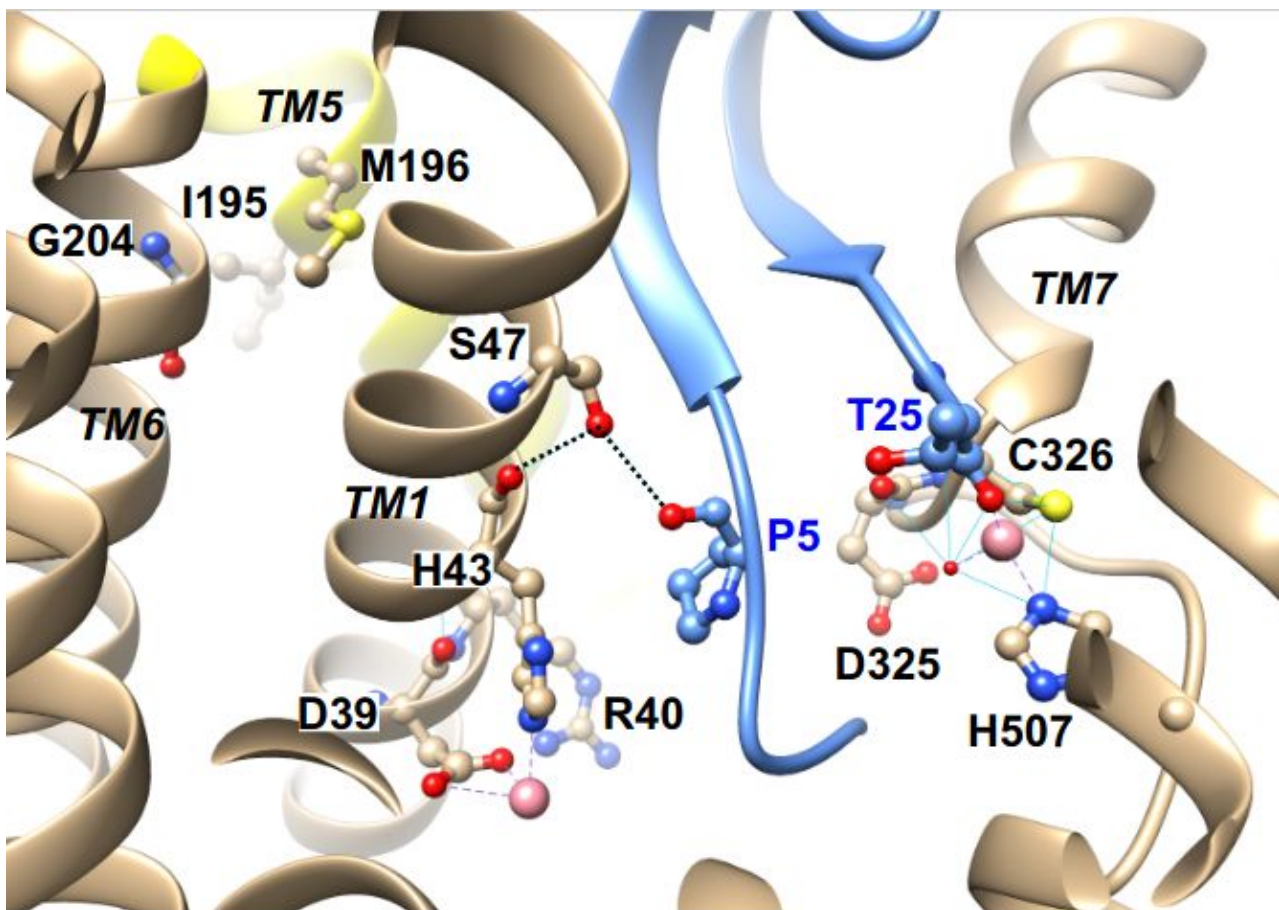
B**Experiment 1****Experiment 2****Experiment 1****Experiment 2**

Figure 6

A



B

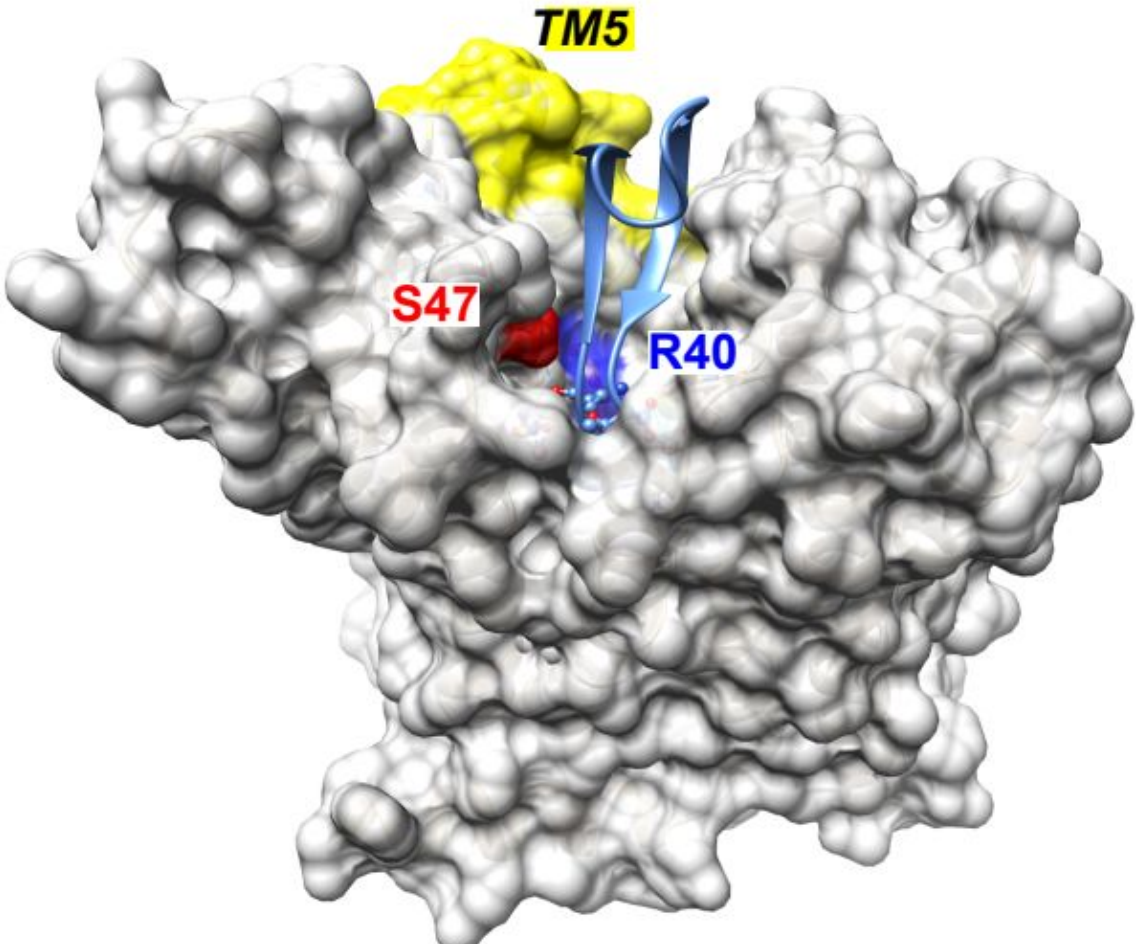


Table 1. Description of the study sample: SLC40A1 missense variations, family relationships, biological and clinical data.

Variant	Gender	Family Relationships	Age* (years)	TS (%)	SF (µg/L)	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)	GGT (UI/L)	ALP (UI/L)	RBC (Tera/L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	HIC (µmol/g)	Clinical observations	Alcohol consumption**
p.Arg40Gln	M	Index case	68	55	2000									230		
p.Ser47Phe	M	Index case (III.6)	49	66	2000		25			5.0	16.0	46.0	90.0	300		Daily
p.Ser47Phe	M	Brother (III.9)	40	67	1769	22	35							340		Daily
p.Ser47Phe	M	Father (II.5)	71	50	944								96.0		Fatigue	Occasional
p.Ser47Phe	M	Uncle (II.4)	75	58	1166											
p.Ser47Phe	F	First cousin (III.4)	58	67	439									128		
p.Ser47Phe	F	First cousin (III.5)	51	52	922									77		
p.Ser47Phe	M	Uncle (II.2)	65	59	1000			18			14.8		96.9	80	Cataract	Occasional
p.Ser47Phe	F	First cousin (III.3)	53	14	36	15	16	29	84	4.5	12.7	38.2	84.0		coronopathy, high blood pressure	Abstinent
p.Ser47Phe	M	Son of first cousin (IV.1)	22	25	182											
p.Ser47Phe	F	Index case	50	52	609	16	18	21		4.0	12.7	37.0	92.4	100		Occasional
p.Ser47Phe	M	Index case	70	50	944	21	12	13					96.0		Fatigue	Occasional
p.Ser47Phe	M	Index case	33	24	889	77	36	14					93.0			Abstinent
p.Gly204Ser	M	Index case	60	66	842	32	50	24	61	4.8	14.4	43.9	92.0	280	Arthralgia	Abstinent
p.Gly204Ser	F	Index case	47	100	1170	36	59	19	81	4.4	14.3	42.0	95.0	320		Abstinent

*Age at diagnosis.

**Occasional: less than 1 drink per day for women and 2 drinks per day for men; Daily: At least than 1 drink per day for women and 2 drinks per day for men.

TS: transferrin saturation (normal value $\leq 50\%$ in females, $\leq 60\%$ in males); SF: serum ferritin (normal value ≤ 200 µg/L in females, ≤ 300 in males); ASAT: aspartate aminotransferase (normal range 5-50 IU/L); ALT: alanine aminotransferase (normal range 5-50 IU/L); GGT: gamma-glutamyl transferase (normal range 5-55 IU/L); Alkaline phosphatase: (normal range 44-147 IU/L); RBC: Red Blood Cells (normal range 4.0-5.7 x 10¹²/L); Hb: hemoglobin (normal range 12.0- 18.0 g/dL); Ht: hematocrit (normal range 37-52%); MCV: mean corpuscular volume (normal range 80-95 fL); HIC: hepatic iron concentration (normal value < 36 µmol/g).

Article 3

Article 3 : Ferroportin-1 structure and function: description of a new ambivalent variation highlighting the role of the Ala350 residue in conformational switching.

Ce troisième article se base sur l'analyse fonctionnelle de cinq variations décrites, chacune à une seule reprise, chez des patients présentant une surcharge en fer. L'analyse fonctionnelle complète, évaluant la perte et le gain de fonction, nous a amené à considérer de plus près la variation p.Ala350Val, qui présente une ambivalence fonctionnelle, que nous pouvons expliquer sur des bases structurales. L'article présentant ces résultats est en cours de rédaction.

Ferroportin-1 structure and function: description of a new ambivalent variation highlighting the role of the Ala350 residue in conformational switching.

Kevin Uguen,^{1,2} Chandran Ka,^{1,2,3} Marlène Le Tertre,^{1,2} Isabelle Gourlaouen,¹ Claude Férec,^{1,2} Isabelle Callebaut,^{4*} Gérald Le Gac.^{1,2,3*}

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

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

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

⁴Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, F-75005 Paris, France

* Authors share co-last authorship.

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

METHODS

Patients

Patients' blood samples were sent to the laboratory of molecular genetics of the university hospital of Brest for the genetic diagnosis of Mendelian disorders of iron metabolism. After ruling out the main secondary cause of hyperferritinemia or hemochromatosis type 1 (i.e. homozygosity for the *HFE* p.Cys282Tyr mutation), a targeted sequencing approach was applied, targeting the coding sequences and intron/exon junctions of the *HFE*, *HAMP*, *HJV*, *TFR2*, *SLC40A1*, *FTL* and *BMP6* genes.

Plasmid constructs

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

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

HEK293T cells, from the American Type Culture Collection, were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions, and a 3:1 transfection reagent (μL)/plasmid DNA (μg) ratio.

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

We used T-Rex-293 cells stably expressing the human HAMP cDNA under the induction of tetracyclin (Uguen et al. *in prep*). Tetracycline (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to induce expression of the 84 amino acids hepcidin pre-propeptide from 1.10^6 T-Rex-293 cells. After 48h the cell supernatant was collected, filtered through a hydrophilic nylon membrane (pore size: 0.2 μ m), and measured for hepcidin-25 levels using a commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA; Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA, USA). The supernatant was stored at -20°C until used.

Flow cytometry analysis

HEK293T cells were seeded at 1.75×10^5 cells per well in 12-well plates and grown for 8h in supplemented DMEM before transfection. 24h after transfection with the pIRES_FPN1-V5_CD8 constructs, cells were treated (or not) with 2,2nM or 0.14nM of human-25 hepcidin for 16 hours. Then, cells were trypsinized, transferred in hemolyse tubes and pelleted at 500g for 5 minutes at 4°C . Cells were resuspended in 100 μ l of PBS-EDTA (Lonza) supplemented with 10% of fetal bovine serum (i.e. flow cytometry buffer), and exposed to anti-V5-FITC (1.13 μ g/tube) (ThermoFisher Scientific) and anti-CD8-APC (Miltenyi Biotec) (2 μ l/tube) antibodies for 20 minutes at 4°C in the dark. After the addition of 1ml of flow cytometry buffer, cells were pelleted at 500g for 5 minutes at 4°C and resuspended in 400 μ l of flow cytometry buffer. Fluorescence intensities were analyzed using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and the FlowLogic™ software (Miltenyi Biotec).

Hepcidin binding analysis

HEK293T cells were seeded at $3,5 \times 10^5$ cells per well in 6-well plates for 24h before transfection with the pcDNA3.1-SLC40A1/V5 constructs. 24h after transfection, cells were treated with 10 μ g/mL of C-terminus biotinylated hepcidin (Bachem) for 30 minutes at 37°C . Proteins were extracted using RIPA buffer (Boston BioProducts, Ashland, MA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche), and protein concentration determined by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Protein lysates were co-immunoprecipitated using the Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific). The membranes were incubated with the Luminata Forte substrate, according to the manufacturer's instructions (Merck-Millipore), and digitized for pattern analysis using the GeneGnome system (Syngene).

Immunoprecipitation and Western-Blot for ubiquitination

HEK293T cells were seeded at $3,5 \times 10^5$ cells per well in 6-well plates for 24h before transfection with the pcDNA3.1-SLC40A1/V5 constructs. 24h after transfection, cells were treated with $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ of human-25 hepcidin for 30 minutes. Proteins were extracted using RIPA buffer supplemented with protease inhibitor cocktail, and protein concentration determined by the BCA assay. V5-tagged proteins were purified using the V5- tagged Protein Purification Kit Ver.2 (MBL International Corporation) according to the manufacturer's instructions. Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific), or primary anti-Ubiquitin (P37) antibody (Cell Signaling Technologies) followed by HRP-coupled secondary antibody. The membranes were revealed as described above.

Structural analysis

Multi-species alignment of FPN1 sequence was performed using Uniprot (<https://www.uniprot.org/align>) with sequences from human (Uniprot Q9NP59), chimpanzee (Uniprot H2QJ48), dog (Uniprot E2RFJ3), mouse (Uniprot Q9JHI9), chicken (Uniprot G1N357), xenopus (Uniprot Q6DDN2), zebrafish (Uniprot Q9I9R3) and *Bdellovibrio bacteriovorus* (BbFPN, Uniprot Q6MLJ0).

3D structures were visualized and analyzed using the UCSF Chimera program (Pettersen et al., 2004). Coordinates of the experimental 3D structures were extracted from PDB (<https://www.rcsb.org>) and correspond to (i) human FPN1 in the outward-facing state in an apo state (pdb 6W4S) or in presence of Co^{2+} and hepcidin (pdb 6WBV), (ii) BbFPN in an outward-facing state, in presence of K^+ (N-lobe, pdb 5AYO), and BbFPN in an inward-facing state in presence of K^+ (N-lobe, pdb 5AYO).

RESULTS

Patients

Clinical and biological data of the five patients are presented in Table 1. All patients were males, with various ages at diagnosis, ranging from 20 to 71 years. Ferritin levels were more than twice the upper limit (300µg/L in men), and transferrin saturation was above the limit of 45% in three patients. None of them exhibited clinical features evocating a ferroportin disease or hemochromatosis (i.e. asthenia, arthralgia, hepatomegaly, skin pigmentation, impotence). Family history of iron overload was noticed for two patients.

Genetic testing

Five heterozygous *SLC40A1* missense variations were identified, one in each patient (Table 1). All patients were negative for genotypes known to cause hemochromatosis types 1 – 3 (in the *HFE*, *HJV*, *HAMP* and *TFR2* genes) and for mutations in the *FTL* gene 5' untranslated region (hyperferritinemia-cataract syndrome; OMIM#600886) and exon 1 (hyperferritinemia without iron overload and cataract; OMIM#134790). The five variations were absent (or present at a very low frequency, i.e. minor allele frequency $<10^{-3}$) in the gnomAD population database (V2.2.1), and have never been associated with iron overload in literature, except for the p.Ala350Val variation described in a patient but without individual phenotypical data available (Landemaine et al., 2021). Almost all variations are predicted as pathogenic by *in silico* prediction algorithms, with CADD (Rentzsch et al., 2019) and REVEL (Ioannidis et al., 2016) scores above 20 and 0.5 respectively (Uguen et al. *in prep*) (Table 2).

In vitro assessment

Both loss and gain-of-function consequences of the variations have been assessed, testing the cell surface expression of human FPN1, its iron export capacity and its hepcidin sensitivity.

Cell surface expression and iron export ability

The cell surface expression of all variants was assayed in transiently transfected HEK293T cells using a bicistronic construct that enables the co-expression of FPN1 (conjugated with a V5 epitope) and the cluster of differentiation CD8, as previously reported (Guellec et al., 2019). As expected, the exogenous expression of WT FPN1 resulted in cell surface localization, whereas the well known p.Val162del loss-of-function mutant showed markedly mislocalization (Figure 1A). The five tested FPN1 variants did not cause obvious mislocalization of the iron transporter

The impact of the variations on the iron-export function was assessed using radioactively labeled iron. HEK293T cells were transiently transfected with pcDNA3.1 plasmids encoding FPN1-V5 fusion protein, and 24 hours after transfection, cells were cultured in 20 µg/L ⁵⁵Fe-transferrin for 16 hours, washed, and placed in a serum-free medium. The cell lysates were assayed for ⁵⁵Fe quantity, β-gal activity (to correct for differences in transfection efficiency) and total protein concentration (to correct for differences in final cell number). As shown in Figure 1B, cells transfected with WT ferroportin 1-V5 displayed more than 60% decrease in iron accumulation compared to the empty vector (EV). The p.Ala77Asp variant, known to display a loss of iron export, was used as a negative control. The p.Ala350Val was not able to export ⁵⁵Fe in amounts comparable with WT FPN1 (p<0.01). The four other variants (p.Val113Ala, p.Leu120Pro, p.Thr361Pro, p.Arg364Cys) were able to export iron in amounts comparable to the WT protein.

Taken together, these results demonstrate that the p.Ala350Val variation is a loss-of-function mutation without impairing cell surface expression, whereas the other new variations do not exhibit a loss-of-function effect.

Resistance to hepcidin

We assessed the ability of hepcidin, the known FPN1 post-translational repressor, to reduce the cell surface expression of the iron transporter. Using flow-cytometry analyses and the same bicistronic plasmids as described above, we compared the expression of FPN1 in HEK293T transiently transfected and cultured in presence or absence of a natural human hepcidin-25 produced as previously described (Uguen et al. *in prep*) for 16 hours. The concentration of hepcidin was measured using an ELISA assay at 2.2nmol/l. As controls, we used the p.Cys326Tyr mutation, known to confer a total resistance to hepcidin (Drakesmith et al., 2005), and the p.Asn144His variant, described as a partial resistant mutation (Fernandes et al., 2009). As expected and shown in Figure 2A-B, hepcidin treatment led to the decrease in WT FPN1 surface expression, with 75% of expression reduction, whereas for the p.Cys326Tyr control, no change in cell surface expression was noticed, and for the p.Asn144His variant, the reduction in cell surface expression was reduced in intermediate amounts (~50%). The p.Ala350Val variant exhibited a total resistance to hepcidin, whereas for the p.Leu120Pro variant, we noted an expression reduction in the same amounts as p.Asn144His. Finally, for the p.Val113Ala, p.Thr361Pro and p.Arg364Cys substitutions, levels of reduction in cell surface expression seemed to be comparable to the WT condition.

For these last three variants, we aimed to reveal a more subtle hepcidin resistance, as we already described for the p.Gly204Ser variant (Uguen et al. *in prep*). We evaluated the FPN1 expression upon treatment of a decreased concentration of hepcidin (0.14nM). The p.Asn144His and p.Gly204Ser variants served as controls, exhibiting a partial and a weak resistance, respectively (Uguen et al. *in prep*). As expected, a weak hepcidin resistance was revealed for the p.Gly204Ser variant. The p.Val113Ala variant was the only tested variant where the decrease in FPN1 expression was significantly different from the WT protein.

Based on these results, we can classify the p.Ala350Asp as a complete resistant variant, the p.Leu120Pro variant as partially resistant, p.Val113Ala as a weak resistant variant, and p.Thr361Pro and p.Arg364Cys as hepcidin-sensitive variants.

FPN1 resistance to hepcidin can result from a hepcidin-binding impairment, like the p.Cys326Tyr well known mutation (Drakesmith et al., 2005), whereas for the p.Asn144His the interaction is preserved (Fernandes et al., 2009). We tested the ability of hepcidin to bind WT and mutant FPN1 using a C-ter biotinylated hepcidin followed by a streptavidin pull-down (Uguen et al. *in prep*). Briefly, HEK293T cells were transiently transfected with pcDNA3.1 plasmids encoding FPN1-V5 fusion protein for 24 hours, and treated with C-ter biotinylated hepcidin-25 for 30 minutes before being washed and lysed. The FPN1-hepcidin complexes were purified on streptavidin beads and revealed by western blot analysis with V5 antibody. As expected, we revealed the hepcidin-FPN1 complexes for the WT and p.Asn144His conditions, whereas no signal was present for the p.Cys326Tyr variant. Among the new variants, the p.Ala350Val variant was the only variant exhibiting a complete loss of hepcidin binding (Figure 3A and Supp Figure 1).

Ubiquitination is a requirement for internalization and degradation of FPN1 following exposure to hepcidin (Qiao et al., 2012). We studied the ubiquitination of the iron transporter before and after hepcidin treatment. HEK293T cells were transiently transfected with pcDNA3.1 plasmids encoding FPN1-V5 fusion protein for 24 hours, before being treated with human native hepcidin-25, and after V5-tagged protein purification the ubiquitination was revealed by Western blotting with an anti-poly/mono ubiquitin (FK2, Cell Signaling) antibody. We used the p.Cys326Tyr mutant as a control. As displayed in Figure 3B (and Supp Figure 2), the p.Ala350Val variant showed no increased amounts of ubiquitination after hepcidin treatment, like the p.Cys326Tyr variant, while the p.Leu120Pro variant showed lower amounts of ubiquitination than the WT FPN1. Finally, we did not notice an increase of ubiquitination of the p.Val113Ala upon hepcidin treatment, but with a surprisingly high amount of ubiquitination in the absence of hepcidin. Apart from this last variant, these results are in concordance with flow cytometry experiments.

Taken together, all these results enabled to classify the variations as exposed in Table 3: p.Leu120Pro and p.Val113Ala as gain-of-function mutations, with partial and weak hepcidin resistant variants, respectively, and normal iron export function, whereas p.Ala350Val is classified as an ambivalent variation, with a decrease in iron export function and hepcidin resistance. Finally, the p.Thr361Pro and p.Arg364Cys can be classified as neutral variations, with normal iron export function and sensibility to hepcidin.

Structural overview of the ambivalent p.Ala350Val variation

The belonging of FPN1 to the Major Facilitator Superfamily (MFS) implies tight interactions between N- and C-termini lobes during the switch between the two extreme configurations, *i.e.* outward and inward-facing. MFS proteins are composed of four (two per lobe) inverted repeats of three transmembrane (TM) helices (namely A, B and C) (Quistgaard et al., 2016; Radestock & Forrest, 2011) (Supp Figure 3). In 2016, Quistgaard and collaborators summarized the structural bases of MFS proteins transport mechanism, highlighting the role of the B-helices (TM2, TM5, TM8 and TM11) in the so called “rocker-switch” model (Quistgaard et al., 2016). More precisely, the movements between the two lobes are, among others, permitted by the bending of these helices.

TM5 and TM8 face each other at the interface between the two lobes, as presented in the 3D structure of human FPN1 in the outward-facing state (Figure 4A and Supp Figure 3, pdb 6WBV), and the structure of BbFPN in the outward-facing (Figure 4B, pdb 5AYN) and inward-facing states (Figure 4C, pdb 5AYO). As shown in figure 4D, the structure of TM8 is slightly bent. On the other hand, TM5 is of particular interest. Like a substantial rate of TM helices (Kneissl et al., 2011), TM5 presents a kink. The exact definition of a kinked helix is not consensual, but a bending angle greater than 20° and the presence of a proline in its vicinity are two frequently used characteristics (Kneissl et al., 2011; Langelaan et al., 2010). Using the 3D structure of human FPN1, we measured the angle value between the two axes formed by the two portions of TM5 at 32.7°, and a highly conserved proline was found at position 189 (Supp. Figure 3). This bending is also found in BbFPN, and is preserved between in both outward- (PDB 5AYN) and inward-facing (PDB 5AYN) conformations, with angle values of 39.3° and 37.4°, respectively (Figure 4E). The Ile186 residue is localized at the center of this bending, and is conserved in vertebrates but not in BbFPN, where a valine, another hydrophobic amino acid, is found at position 167 (Supp. Figure 3). This kinked conformation and the localisation of TM5 at the interface between N- and C-termini lobes makes it an important player in conformational switching of MFS proteins (Holyoake & Sansom, 2007; Nagarathinam et al., 2018; Quistgaard et al., 2016).

The position of Ala350 (Ala288 in BbFPN) at the interface between TM8 and the bending angle of TM5 led us to speculate a putative role of this residue in the dynamic of conformational switching. Because the IF structure of HsFPN is not available, we used BbFPN OF and IF structures to explore this hypothesis. Figure 4F shows the superimposition of TM5 and TM8 in OF and IF structures of BbFPN, matched on TM5. Val167 appears to engage a rotation around Ala288 during the conformational change, keeping a relative short distance with the residue (3.5 Å in the OF state vs 3.7 Å in the IF state). More importantly, the surface analysis shows that the two residues are interlocking, like a gear, in the IF state, when TM5 and TM8 are close in their extracellular portion, to let the intracellular cavity open (Figure 4F).

Based on these observations, we investigate the impact of the substitution of Ala250 with valine. Using the HsFPN structure, we highlighted that this substitution would lead to a steric clash with Ile186 (the equivalent of Val167 in BbFPN), due to the too short distance between the second γ carbon of Val350 mutated residue and the second γ carbon of Ile186 in TM5 (Figure 5A-B).

The structural basis of the hepcidin resistance conferred by the p.Ala350Val variation is more subtle. It is known that hepcidin and its disulfide cage bind into a hydrophobic pocket at the center of FPN1 (Aschemeyer et al., 2018; Billesbølle et al., 2020). As shown in figure 5C-D, the Ala350 residue faces the central hydrophobic cavity, where hepcidin sits, in the vicinity of Cys326. The substitution of alanine with valine would lead to a modification of the surface of this cavity, possibly impairing the binding of hepcidin.

The two other functionally relevant variations of our study, i.e. p.Val113Ala and p.Leu120Pro, are both located at the end of TM3, at the extracellular side of the helix (Figure 7C). Their gain-of-function effect raises the question of their role in the interaction with hepcidin. They are not thought to directly interact with hepcidin, which is in concordance with the preserved interaction with hepcidin in our experiments, and the partial, even weak for the p.Val113Ala variation, hepcidin resistance. Val113 and Leu120 are not strictly conserved across species (Figure 5), but Leu120 is located in the extracellular loop between TM3 and TM4, and it is likely that the substitution of leucine with proline in this loop could destabilize the conformation of TM3. More studies are needed to characterize this effect. The effect of valine to alanine substitution at position 113 is hard to explain, and we could speculate that the effect is likely to be subtle, as we observe a weak resistance to hepcidin.

LEGENDS OF FIGURES AND TABLES

Figure 1. Cell surface expression and iron export ability of wild type and mutant FPN1 proteins. A) HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1-V5 and CD8. After 36 h, cells were double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. B) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and then fed with 20 μ g/ml ^{55}Fe -transferrin for 16 h. Cells were then washed and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -gal activity. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Figure 2. Hepcidin resistance assessment of the different mutant FPN1 proteins. HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1-V5 and CD8 24 hours before being treated with A) 2.2nM or B) 0.14nM of native hepcidin for 16 hours. Cells were then double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Figure 3. Hepcidin abilities to bind and induce ubiquitination of wild-type and mutant FPN1 proteins. A) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and treated with 10 μ g/mL of C-terminus biotinylated hepcidin (Bachem) for 30 minutes. Cells were lysed and protein lysates were pulled down using the Dynabeads[®] MyOne[™] Streptavidin T1 kit (ThermoFisher Scientific), before western blotting using the mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5. B) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and treated with 2.2nM of native hepcidin for 30 minutes. Proteins were extracted and V5-tagged proteins were purified using the V5- tagged Protein Purification Kit Ver.2 (MBL International Corporation). Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific), or primary primary anti-Ubiquitin (P37) antibody (Cell Signaling Technologies) followed by HRP-coupled secondary antibody. FT= flowthrough.

Figure 4. Structural analysis of HsFPN and BbFPN. A-C) Overview of the tridimensional structure of human FPN1 (HsFPN) (A), in the outward-facing (OF) state in presence of hepcidin (purple), described by Billesbølle et al. (pdb 6WBV), and of BbFPN, in the OF (B, pdb 5AYN) and inward-facing (IF) (C, pdb 5AYO) states. D and E) Superimposition of TM8 (D) and TM5 (E) between HsFPN in the OF state (gold) and BbFPN in the OF (green) and IF (red) states. F) Superimposition of BbFPN structures in the OF (green) and IF (red) states, matched on TM8. The Val167 in TM5 turns around the Ala288 in TM8. Pro170 is a critical residue for the kinked conformation, and Gly285 is primordial in the packing of the two helices. G and H) Surface visualization of TM5 (green) and TM8 (orange and red) in the OF (G) and IF (H) states of BbFPN, showing the “nesting” of Ala288 and Val167 in the IF state.

Figure 5. Impact of the p.Ala350Val variation on human FPN1 structure. A and B) Visualization of the impact of the substitution of alanine (A) to valine (B) at position 350 on HsFPN structure in the OF state. The p.Ala350Val substitution leads to a steric clash (red line) due to too short distance with Ile186. C and D) Surface analysis of the Ala350 and Val350 residues. From the tridimensional structure of human FPN1 without hepcidin (PDB 6W4S). The substitution of alanine (C) with valine (D) at position 350 (orange) leads to a modification of the surface of the central hydrophobic cavity in the vicinity of the Cys326 residue (red) which binds to hepcidin. E) Representation of the position of the Val113 and Leu120 residues (orange), in the TM3 (green) of HsFPN. Transparent red lines represent the plasma membrane.

Table 1. Clinical and biological data of the five patients in this study. TSAT, transferrin saturation; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HIC, hepatic iron concentration.

Table 2. Population frequencies and *in silico* predictions (CADD and REVEL) of the five variants.

Table 3. Summary of the functional consequences of the tested substitutions.

Supp. Figure 1. Representation of the three independent experiments of hepcidin binding. HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and treated with 10 µg/mL of C-terminus biotinylated hepcidin (Bachem) for 30 minutes. Cells were lysed and protein lysates were pulled down using the Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 kit (ThermoFisher Scientific), before western blotting using the mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5. The asterix (*) represent variants tested but not discussed in this study. FT= flowthrough.

Supp. Figure 2. Representation of the three independent experiments of ferroportin ubiquitination. HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h,

and treated with 2.2nM of native hepcidin for 30 minutes. Proteins were extracted and V5-tagged proteins were purified using the V5- tagged Protein Purification Kit Ver.2 (MBL International Corporation). Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific), or primary anti-Ubiquitin (P37) antibody (Cell Signaling Technologies) followed by HRP-coupled secondary antibody. The asterix (*) represent variants tested but not discussed in this study. FT= flowthrough.

Supp. Figure 3. Extracellular view of HsFPN in the IF state (pdb 6WBV). The different helices are named with their numbers and the letter A, B and C. The dashed line represents the limit between the N- and C-lobes.

Supp. Figure 4. Multispecies sequence alignment of ferroportin, focused on TM3, TM4, TM5, TM7b and TM8. Transmembrane helices and residues are colored according to the 3D structure of HsFPN on figure 4.

References

- Aschemeyer, S., Qiao, B., Stefanova, D., Valore, E. V., Sek, A. C., Ruwe, T. A., Vieth, K. R., Jung, G., Casu, C., Rivella, S., Jormakka, M., Mackenzie, B., Ganz, T., & Nemeth, E. (2018). Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood*, *131*(8), 899–910. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786590>
- Billesbølle, C. B., Azumaya, C. M., Kretsch, R. C., Powers, A. S., Gonen, S., Schneider, S., Arvedson, T., Dror, R. O., Cheng, Y., & Manglik, A. (2020). Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2668-z>
- Bonaccorsi di Patti, M. C., Polticelli, F., Cece, G., Cutone, A., Felici, F., Persichini, T., & Musci, G. (2014). A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *FEBS Journal*, *281*(12), 2851–2860. <https://doi.org/10.1111/febs.12825>
- Drakesmith, H., Schimanski, L. M., Ormerod, E., Merryweather-Clarke, A. T., Viprakasit, V., Edwards, J. P., Sweetland, E., Bastin, J. M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K. J. H., & Townsend, A. R. M. (2005). Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*, *106*(3), 1092–1097. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0561>
- Fernandes, A., Preza, G. C., Phung, Y., De Domenico, I., Kaplan, J., Ganz, T., & Nemeth, E. (2009). The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*, *114*(2), 437–443. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146134>
- Guellec, J., Elbahsi, A., Le Tertre, M., Uguen, K., Gourlaouen, I., Férec, C., Ka, C., Callebaut, I., & Le Gac, G. (2019). Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj201901857R. <https://doi.org/10.1096/fj.201901857R>
- Holyoake, J., & Sansom, M. S. P. (2007). Conformational Change in an MFS Protein: MD Simulations of LacY. *Structure*, *15*(7), 873–884.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2007.06.004>

- Ioannidis, N. M., Rothstein, J. H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S. K., Baheti, S., Musolf, A., Li, Q., Holzinger, E., Karyadi, D., Cannon-Albright, L. A., Teerlink, C. C., Stanford, J. L., Isaacs, W. B., Xu, J., Cooney, K. A., Lange, E. M., Schleutker, J., Carpten, J. D., ... Sieh, W. (2016). REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *The American Journal of Human Genetics*, 99(4), 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.016>
- Kneissl, B., Mueller, S. C., Tautermann, C. S., & Hildebrandt, A. (2011, October 26). *String Kernels and High-Quality Data Set for Improved Prediction of Kinked Helices in α -Helical Membrane Proteins* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ci200278w>
- Landemaine, A., Hamdi-Roze, H., Cunat, S., Loustaud-Ratti, V., Causse, X., Si Ahmed, S. N., Drenou, B., Bureau, C., Pelletier, G., De Kerguenec, C., Ganne-Carrie, N., Durupt, S., Laine, F., Loréal, O., Ropert, M., Detivaud, L., Morcet, J., Aguilar-Martinez, P., Deugnier, Y. M., & Bardou-Jacquet, E. (2021). A simple clinical score to promote and enhance ferroportin disease screening. *Journal of Hepatology*, S0168-8278(21)02163-2. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.10.022>
- Langelaan, D. N., Wieczorek, M., Blouin, C., & Rainey, J. K. (2010). Improved helix and kink characterization in membrane proteins allows evaluation of kink sequence predictors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(12), 2213–2220. <https://doi.org/10.1021/ci100324n>
- Le Gac, G., Ka, C., Joubrel, R., Gourlaouen, I., Lehn, P., Mornon, J.-P., Férec, C., & Callebaut, I. (2013). Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): Effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Human Mutation*, 34(10), 1371–1380. <https://doi.org/10.1002/humu.22369>
- Nagarathinam, K., Nakada-Nakura, Y., Parthier, C., Terada, T., Juge, N., Jaenecke, F., Liu, K., Hotta, Y., Miyaji, T., Omote, H., Iwata, S., Nomura, N., Stubbs, M. T., & Tanabe, M.

- (2018). Outward open conformation of a Major Facilitator Superfamily multidrug/H⁺ antiporter provides insights into switching mechanism. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06306-x>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Qiao, B., Sugianto, P., Fung, E., Del-Castillo-Rueda, A., Moran-Jimenez, M.-J., Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Heparin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metabolism*, 15(6), 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.018>
- Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., & Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(2), 123–132. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>
- Radestock, S., & Forrest, L. R. (2011). The Alternating-Access Mechanism of MFS Transporters Arises from Inverted-Topology Repeats. *Journal of Molecular Biology*, 407(5), 698–715. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.008>
- Ravasi, G., Pelucchi, S., Bertola, F., Capelletti, M. M., Mariani, R., & Piperno, A. (2021). Identification of Novel Mutations by Targeted NGS Panel in Patients with Hyperferritinemia. *Genes*, 12(11), 1778. <https://doi.org/10.3390/genes12111778>
- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., & Kircher, M. (2019). CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D886–D894. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>
- Taniguchi, R., Kato, H. E., Font, J., Deshpande, C. N., Wada, M., Ito, K., Ishitani, R., Jormakka, M., & Nureki, O. (2015). Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nature Communications*, 6, 8545. <https://doi.org/10.1038/ncomms9545>
- Wallace, D. F., Harris, J. M., & Subramaniam, V. N. (2010). Functional analysis and

theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 298(1), C75–C84.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00621.2008>

Figure 1

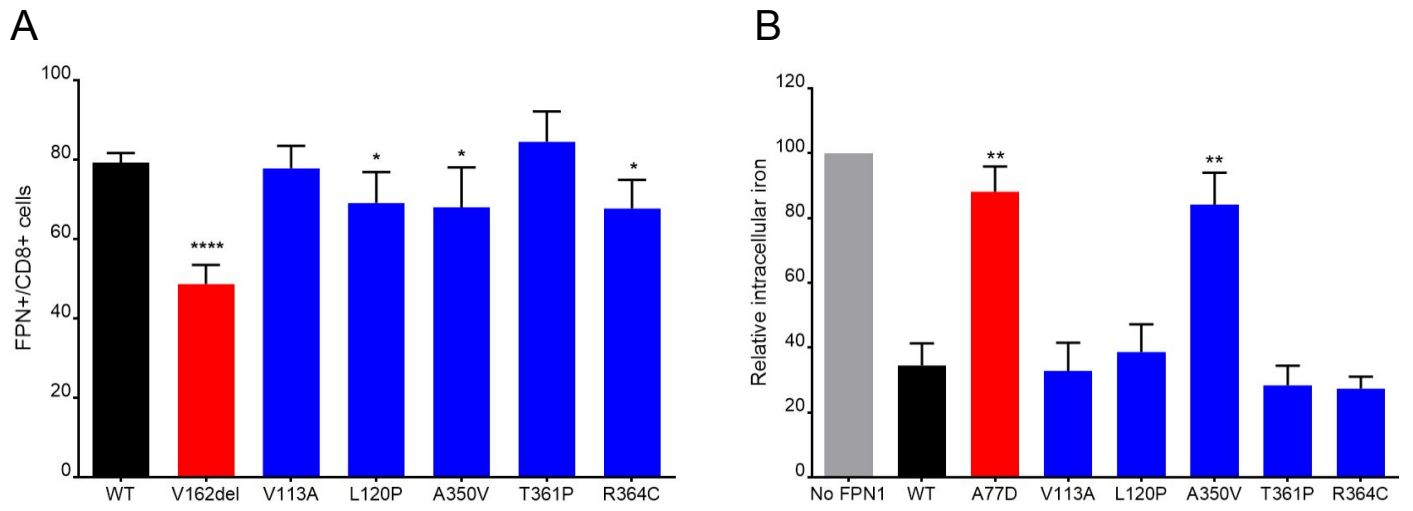


Figure 2

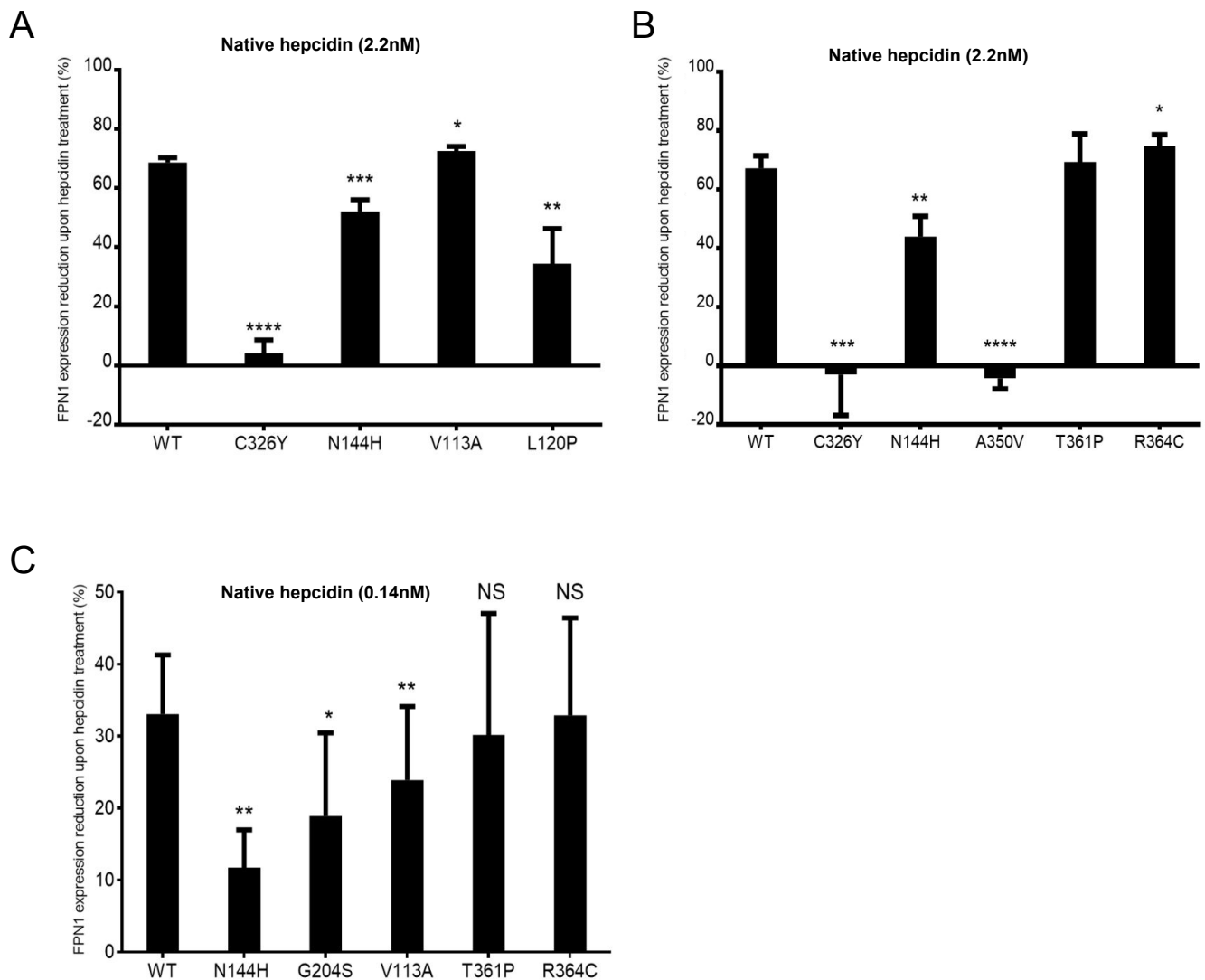
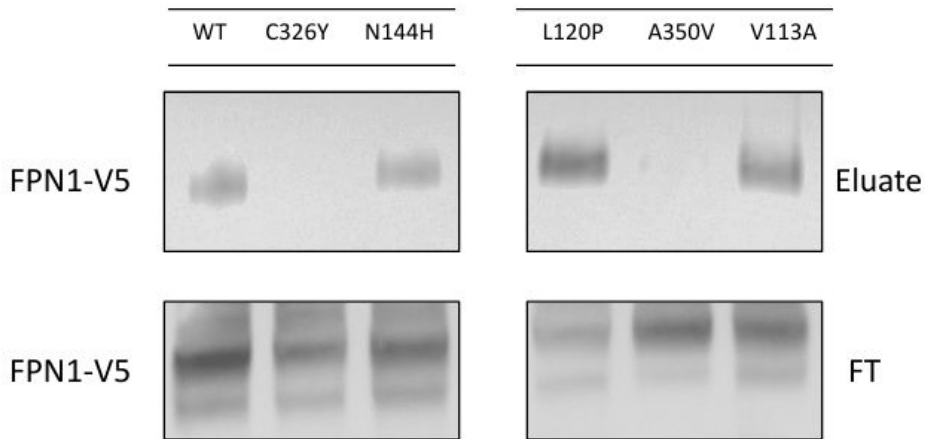


Figure 3

A



B

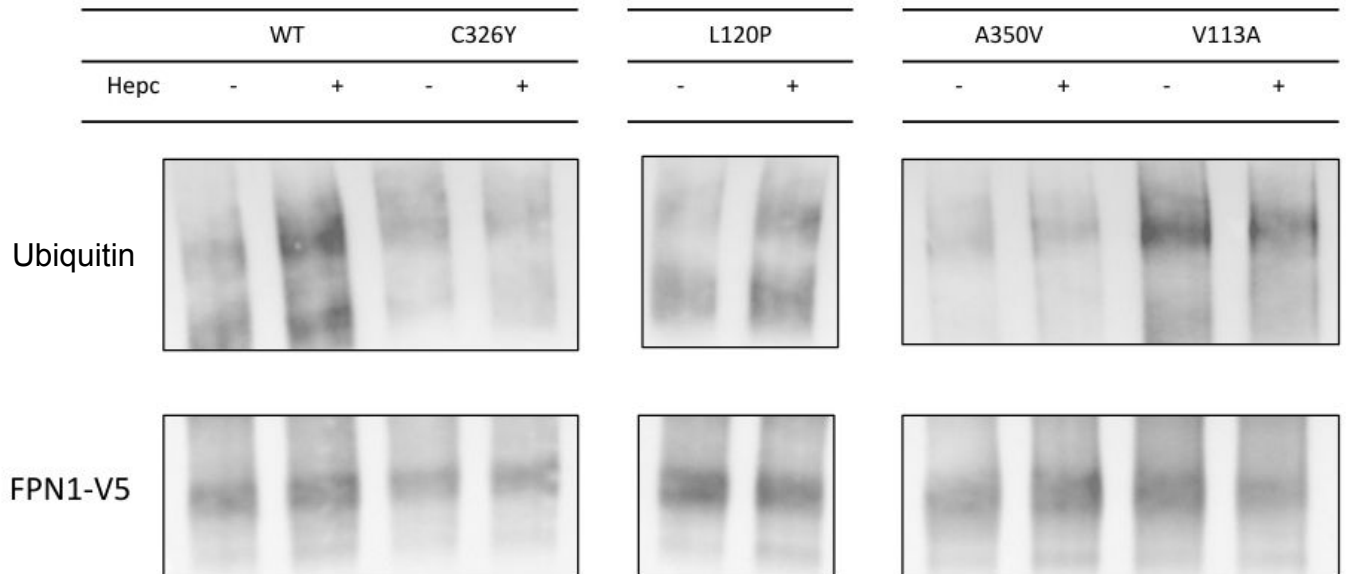


Figure 4

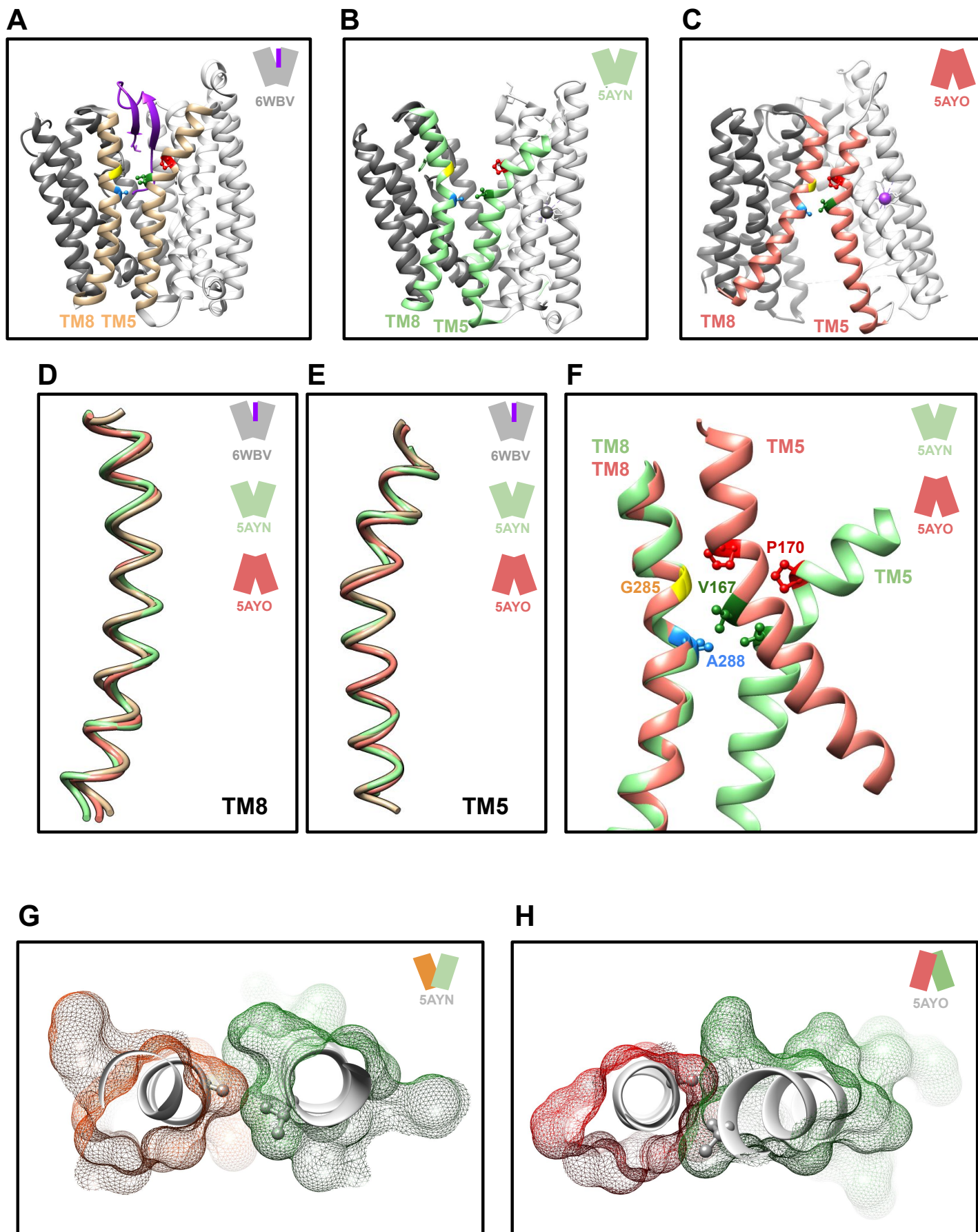
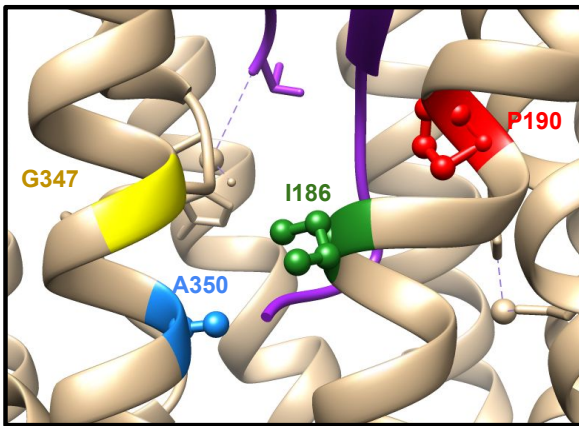
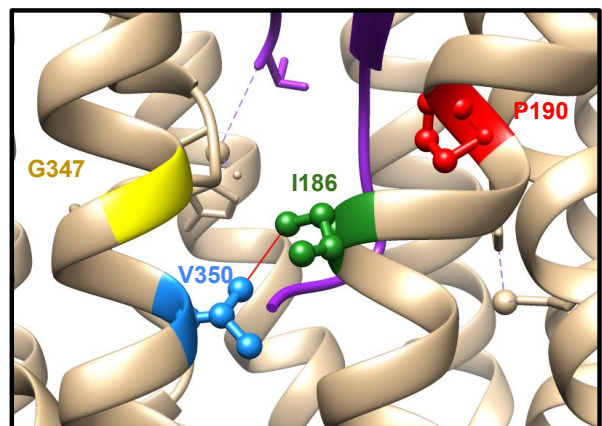


Figure 5

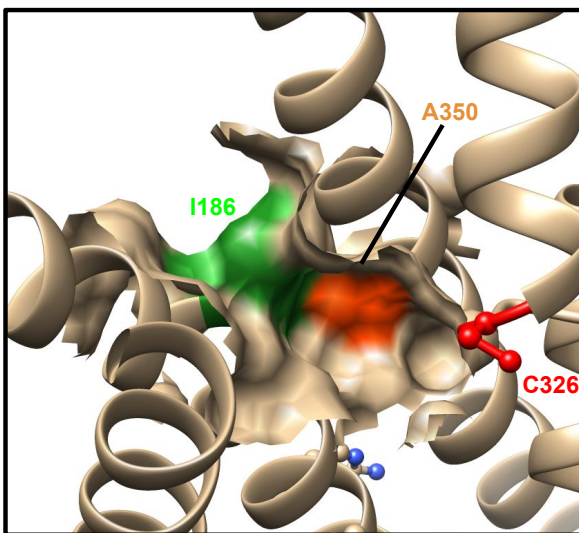
A



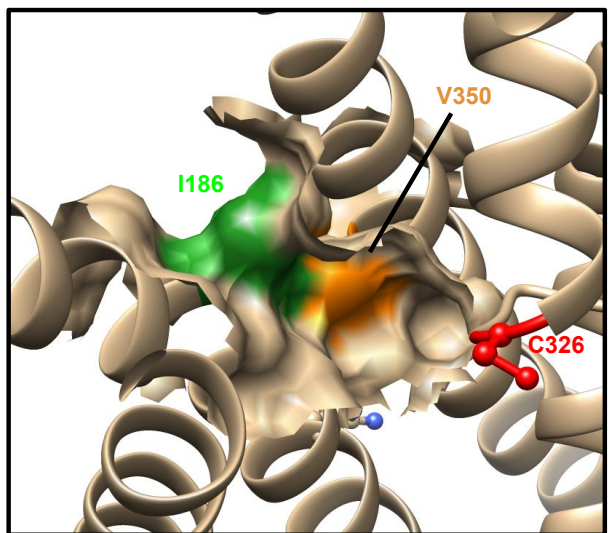
B



C



D



E

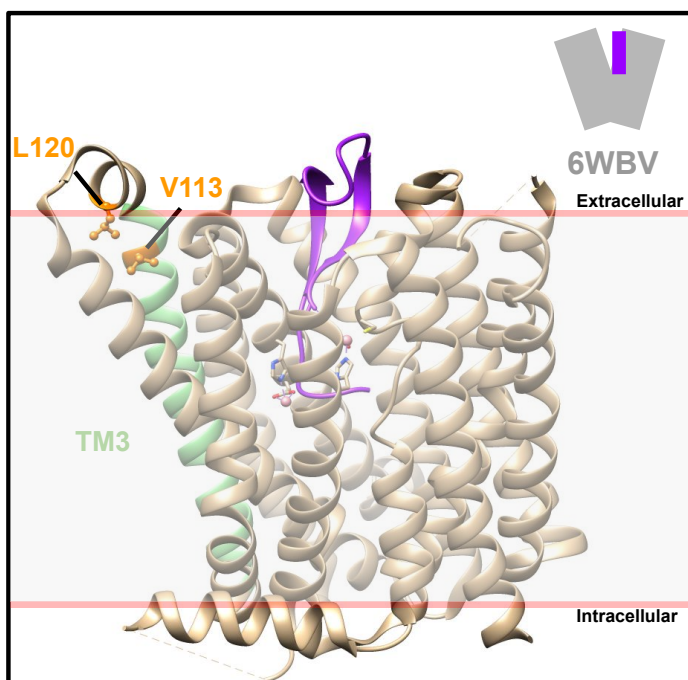


Table 1. Clinical and biological data of the five patients in this study.

Patient	Variant	Gender	Age (years)	Ferritin (µg/l)	TSAT (%)	AST (U/l)	ALT (U/l)	HIC (µmol/g)	Alcohol consumption (g/week)	Clinical features	Family history
1	p.Val113Ala	M	71	1825	68	45	38	N/A	N/A	No	No
2	p.Leu120Pro	M	29	819	66	22	25	N/A	N/A	No	Yes
3	p.Ala350Val	M	20	1413	15	N/A	N/A	78	N/A	No	Yes
4	p.Thr361Pro	M	58	1536	38	17	23	70	<60	No	No
5	p.Arg364Cys	M	40	839	50	37	60	100	<60	No	No

TSAT, transferrin saturation; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HIC, hepatic iron concentration.

Table 2. Population frequencies and in silico predictions (CADD and REVEL) of the five variants.

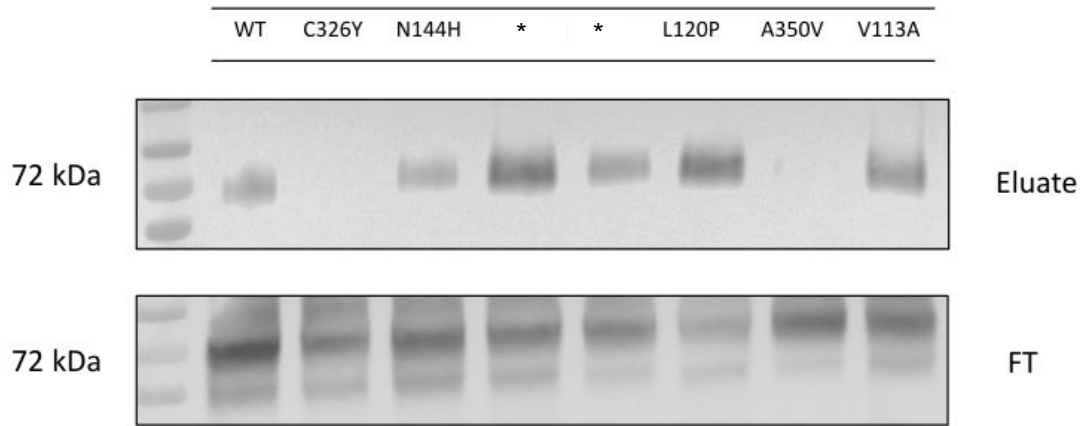
Variant c. (NM_014585.6)	Variant p.	gnomAD V2.1.1 AF	CADD	REVEL
c.338T>C	p.Val113Ala	Exomes: 1.2.10 ⁻⁵ Genomes: 2.10 ⁻⁵	27	0.727
c.359T>C	p.Leu120Pro	Exomes: 0 Genomes: 0	29.1	0.908
c.1049C>T	p.Ala350Val	Exomes: 0 Genomes: 0	29.4	0.771
c.1081A>C	p.Thr361Pro	Exomes: 0 Genomes: 0	24.6	0.546
c.1090C>T	p.Arg364Cys	Exomes: 6.10 ⁻⁵ Genomes: 2.8.10 ⁻⁵	29.3	0.63

Table 3. Summary of the functional consequences of the tested substitutions.

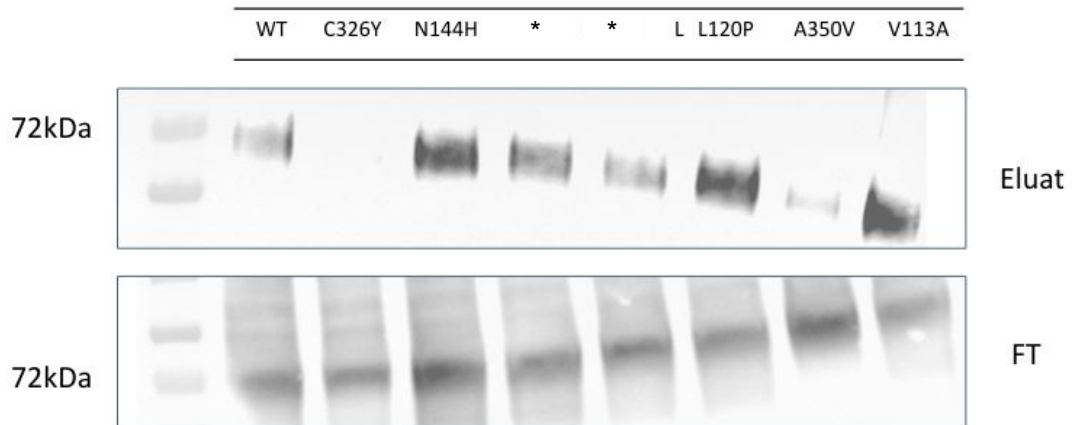
Variant p.	FPN1 surface expression	Iron export function	Hepcidin resistance	Hepcidin binding	Ubiquitination upon hepcidin	Conclusion
p.Val113Ala	Normal	Normal	Weak	Yes	Normal	Weak GOF
p.Leu120Pro	Normal/↘	Normal	Partial	Yes	↘	Partial GOF
p.Ala350Val	Normal/↘	↘↘	Total	No	↘↘	Ambivalent
p.Thr361Pro	Normal	Normal	No	Yes	Normal	Neutral
p.Arg364Cys	Normal/↘	Normal	No	Yes	Normal	Neutral

Supp. Figure 1

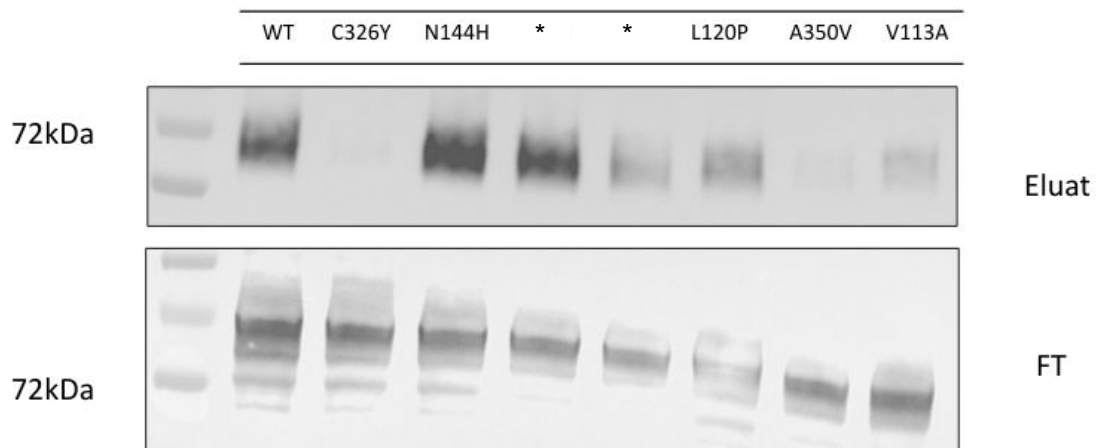
Experiment 1



Experiment 2

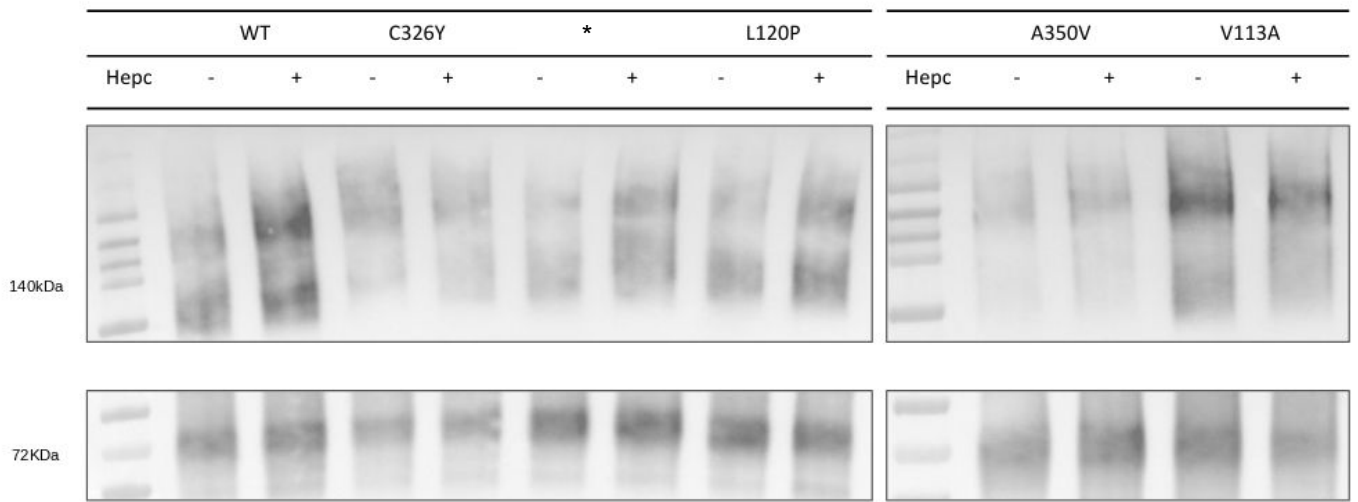


Experiment 3

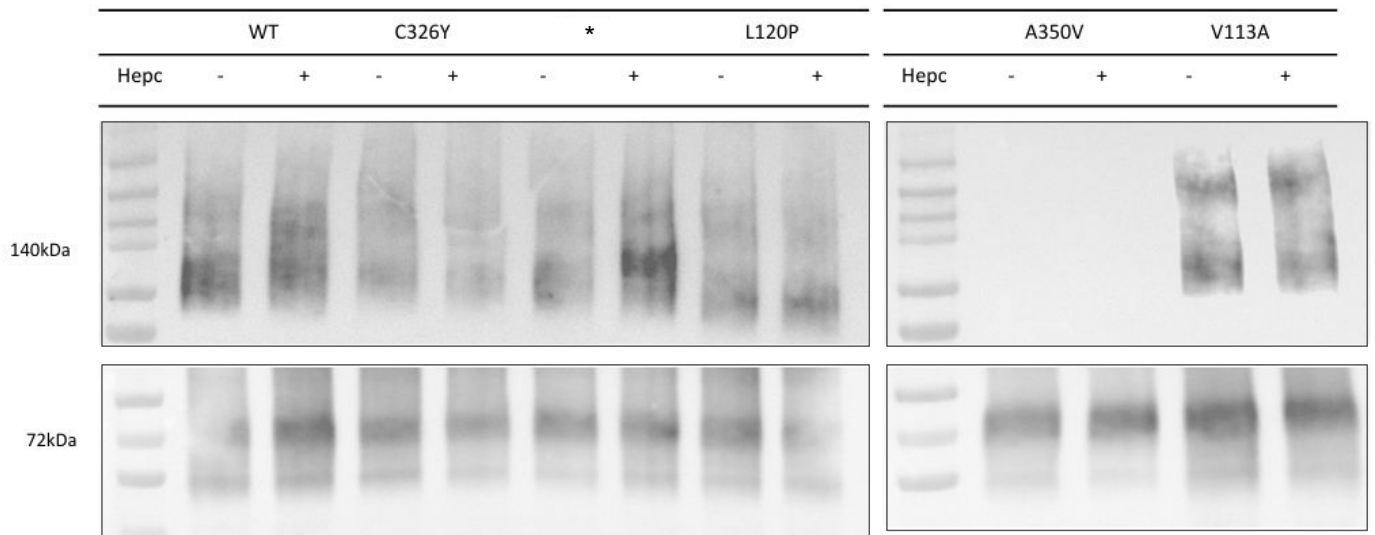


Supp. Figure 2

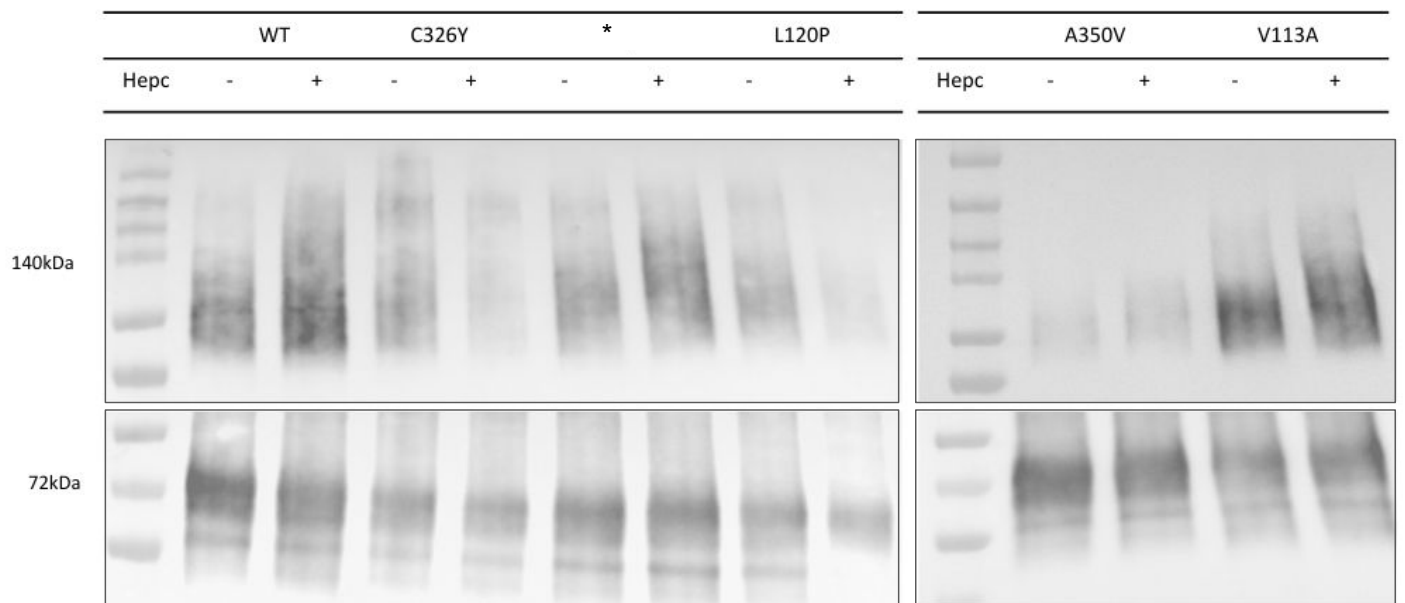
Experiment 1



Experiment 2



Experiment 3



Discussion

Discussion

La problématique de l'interprétation des variations faux-sens dans le domaine des maladies rares: des outils disponibles à l'expertise structurale et fonctionnelle

Nous venons de voir dans cette première partie que l'interprétation des variations faux-sens dans une pathologie rare est parfois difficile. L'avènement du séquençage haut débit a permis une amélioration sans précédents du rendement diagnostique et la découverte de nouvelles bases moléculaires de pathologies, voire des possibilités thérapeutiques (Boycott et al., 2013; Vissers et al., 2016), mais a aussi vu augmenter le nombre de variations de signification incertaine (Ream and Mikati, 2014; Timmermans et al., 2017; Vears et al., 2017). Il s'agit le plus souvent de variations faux-sens (changement d'un acide aminé), qui représentent environ dix milles des trois millions de variations retrouvées dans un génome humain (Ng et al., 2008; Lupski et al., 2010).

Du fait de la rareté de la pathologie et des variations, de la dichotomie fonctionnelle, des phénocopies et de la complexité de la biologie de la ferroportine, le cas des mutations faux-sens touchant le gène *SLC40A1* pourrait être qualifié de caricatural lorsque l'on évoque les difficultés d'interprétation des variations.

Le travail présenté ici a permis de montrer l'importance des données fonctionnelles mais également structurales dans l'interprétation des variations du gène *SLC40A1*, tout en proposant une aide au diagnostic pour tout biologiste pouvant être confronté à un variant rare dans ce gène.

a. Les analyses fonctionnelles : un pont entre l'interprétation des variations et la compréhension biologique de la protéine et de sa régulation

La majorité des variations décrites à ce jour dans le gène *SLC40A1* (47/65) ont été testées fonctionnellement, ce qui permet de mieux les classer selon la classification ACMG mais également distinguer les variations perte et gain de fonction (Schimanski et al., 2005; Détivaud et al., 2013; Callebaut et al., 2014). Cependant, les données fonctionnelles qui ont été prises en comptes dans ce travail sont hétérogènes, en termes de type cellulaire utilisé, de tests fonctionnels réalisés, et, pour certains variants, même en termes de conclusions. Nous pouvons, à titre d'exemple, revenir sur la situation du résidu Asn144, au niveau duquel quatre variations faux-sens ont été décrites : p.Asn144Asp, p.Asn144Thr, p.Asn144Ser et p.Asn144His. Les données fonctionnelles vont majoritairement dans le sens d'un gain de fonction avec une résistance à l'hepcidine et un export du fer préservé (Drakesmith et al., 2005; Fernandes et al., 2009; Callebaut et al., 2014), à l'exception de l'équipe de Schimanski, qui conclut que les variations p.Asn144His et p.Asn144Asp n'ont pas d'effet (Schimanski et al., 2005). De façon plus subtile, alors que certains considèrent que les variations p.Asn144His et p.Asn144Asp n'altèrent pas la fixation entre FPN1 et l'hepcidine (Fernandes et al., 2009), d'autres sont en désaccord, concluant que la position Asn144 est critique pour l'interaction entre le transporteur et son

régulateur, interaction cette fois décrite comme perdue avec le mutant p.Asn144Asp (Aschemeyer et al., 2018).

Un autre exemple est la variation p.Gln248His, variation présente à une fréquence particulièrement élevée dans la population africaine (Gordeuk et al., 2003; Albuquerque et al., 2011). Certaines équipes ont montré que cette variation réduisait l'export de fer (McGregor et al., 2005) et la sensibilité à l'hepcidine (Nekhai et al., 2013) alors que l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a conclu que cette variation était neutre (Callebaut et al., 2014). A noter que cette variation a un temps été associée à une protection contre la malaria (Zhang et al., 2018b), avant qu'une étude sur un plus grand échantillon ne vienne réfuter cette hypothèse (Muriuki et al., 2019).

Ces deux exemples illustrent le biais expérimental dans les études fonctionnelles liées à FPN1. L'idéal serait une harmonisation des tests fonctionnels, et l'utilisation de modèles cellulaires plus proches de la situation physiologique, nous en parlerons plus loin. Il est également utile de souligner que la plupart des tests de résistance à l'hepcidine ont été réalisés à partir d'une hepcidine synthétique et à des concentrations bien plus élevées que dans le corps humain (estimée à 7.8nM chez l'homme) (Galesloot et al., 2011). Ceci pourrait altérer la capacité à révéler des résistances partielles à l'hepcidine par exemple. L'approche que nous avons développée à partir d'une hepcidine native nous permet de nous rapprocher déjà des valeurs physiologiques et de mettre en évidence des résistances partielles. D'autres équipes ont utilisé les cellules HepG2 pour produire de l'hepcidine après stimulation par le facteur BMP6, permettant également de travailler sur une hepcidine native (Traeger et al., 2021).

Il a depuis longtemps été admis qu'il existait une dichotomie entre les variations perte de fonction, responsables de la maladie la ferroportine, et les mutations gain de fonction impliquées dans l'hémochromatose de type 4. Cette situation n'est pas rare en pathologie humaine, on peut par exemple citer le cas du gène *PMP22* où une duplication du gène entraîne sa surexpression et la neuropathie de Charcot Marie Tooth de type 1A, alors qu'une délétion du gène entraîne une neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression (Li et al., 2013). Cependant, il est important dans notre cas de bien définir le terme de gain de fonction. En effet, ce terme, utilisé en pathologie constitutionnelle ou en génétique somatique, cache en réalité plusieurs possibilités, pouvant désigner des variations entraînant une surexpression du gène, comme le cas de *PMP22*, la synthèse d'une protéine hyperactive, comme dans le cas des mutations de *FGFR3* et le spectre des hypochondroplasies/achondroplasies (Naski et al., 1996), ou encore la synthèse d'une protéine aux fonctionnalités différentes, comme la mutation p.Met358Arg du gène de l'alpha 1-antitrypsine (Owen et al., 1983). Dans notre cas, le gain de fonction représente la résistance de la protéine à son régulateur, l'hepcidine. Ainsi, alors que dans le cas de *PMP22* il est difficile d'imaginer la possibilité de la coexistence d'un effet ambivalent, cette hypothèse n'est pas exclue pour la ferroportine.

Plusieurs auteurs ont évoqué la possibilité que certaines mutations faux-sens du gène *SLC40A1* puis-

sent à la fois être associées à une perte et à un gain de fonction. Suivant les exemples choisis, les bases moléculaires sous-jacentes pouvaient être difficiles à comprendre (Détivaud et al., 2013; Prschberger et al., 2014; Wallace et al., 2017; Vlasveld et al., 2019). Un point intéressant concerne cependant les mutations à l'intérieur ou au voisinage direct des sites de liaison de cations divalents, et du fer en particulier, et de l'hepcidine au niveau des lobes N- et C-terminaux (Billesbølle et al., 2020).

Dans ce contexte, nous décrivons pour la première fois des mutants qui altèrent l'export du fer sans modification de la présence de la protéine en membrane, et une résistance à l'hepcidine. Nous expliquons cette ambivalence au niveau structural.

Pour le cas de la variation p.Ser47Phe, la proximité du site de liaison du fer pourrait expliquer l'effet perte de fonction, par la déstabilisation de l'environnement local de l'hélice transmembranaire 1, où est localisé le site de coordination du cation divalent au niveau du lobe N-terminal (Deshpande et al., 2018; Billesbølle et al., 2020). L'effet gain de fonction s'expliquerait quant à lui par la perte de la liaison hydrogène entre la chaîne latérale de la sérine 47 de la ferroportine et la proline 5 de l'hepcidine. Nos expériences n'ont en revanche pas mis en évidence de perturbation de l'interaction hepcidine-ferroportine, suggérant un mécanisme plus subtil qu'une perte totale d'interaction, ou un biais expérimental lié à l'utilisation d'une grande quantité d'hepcidine biotinylée.

Concernant la variation p.Arg40Gln, la perte de fonction pourrait être liée à la perte d'interaction entre le résidu Arg40, situé dans l'hélice TM1, et le résidu Asp325, dans l'hélice TM7. Les hélices TM1 et TM7 sont impliquées dans la "gate" extracellulaire, importante pour la stabilisation de la protéine en conformation "inward-facing" (Taniguchi et al., 2015; Drew et al., 2021), et l'interaction entre ces deux résidus (Arg40 et Asp325) a déjà été mise en évidence au niveau structural (Le Tertre et al., 2021a). Il est intéressant de noter toutefois que cette position a déjà été investiguée par l'équipe dans laquelle j'ai effectuée ma thèse, ainsi que par Bonaccorsi di Pati et al. (Le Gac et al., 2013; Bonaccorsi di Patti et al., 2014). Le résidu Arg40, très conservé au sein des espèces, a été substitué successivement en alanine et acide aspartique (Le Gac et al., 2013) et en méthionine (Bonaccorsi di Patti et al., 2014). La seule variation ayant montré un effet sur la fonction de la protéine est la substitution en acide aspartique, responsable d'un défaut d'adressage en membrane de la protéine. Ces résultats semblent en contradiction avec l'hypothèse du rôle de l'Arg40 dans la coordination du cation divalent *via* l'interaction avec Asp325. Les méthodes d'investigation fonctionnelles étaient en revanche différentes, et aucune de ces deux études n'ont recherché une résistance à l'hepcidine de ces variations. Une analyse plus fine de la surface accessible de la protéine a mis en évidence le rôle potentiel de la chaîne latérale de Arg40 dans la cavité de liaison à l'hepcidine.

Pour la variation p.Ala350Val, nous suggérons que la perte de fonction réside dans l'impact de la modification du résidu en position 350 dans la dynamique des hélices TM5 et TM8 lors des changements conformationnels indispensables à la fonction d'export du fer de FPN1. Il est intéressant de noter qu'une autre variation est retrouvée autour de ce site d'interaction entre les deux hélices, mais dans

l'hélice TM5 cette fois. Il s'agit de la variation p.Asn185Asp, décrite dans deux familles distinctes (Morris et al., 2005; Le Lan et al., 2011), et dont les données fonctionnelles concluent à une perte de fonction, sans résistance à l'hepcidine (Détivaud et al., 2013).

Le gain de fonction quant à lui résiderait dans la modification de la surface de la poche hydrophobe fixant l'hepcidine. Pourtant, la modification d'une alanine par une valine, résidu également hydrophobe, reste modeste et il est difficile de conclure que ce seul effet sur la surface soit à l'origine d'une résistance totale avec rupture d'interaction avec l'hepcidine. Cependant, une perturbation des changements entre les deux conformation extrême de la protéine induite par la variation pourraient altérer la stabilité de la protéine en conformation "outward-facing", la maintenant préférentiellement dans la conformation inverse, et l'empêchant ainsi d'interagir avec l'hepcidine. Cette hypothèse doit malgré tout prendre en compte que la conformation de base, la plus stable énergétiquement, est la conformation "outward-facing".

La variation p.Ala350Val a déjà été retrouvée chez un patient présentant une surcharge en fer par une équipe française, mais les données cliniques n'étaient pas disponibles (Landemaine et al., 2021). La même équipe a d'ailleurs décrit une autre variation à cette position, p.Ala350Thr. Enfin, une autre équipe a décrit un patient de 62 ans présentant une hyperferritinémie sévère (2600 $\mu\text{g/l}$) et un coefficient de saturation de la transferrine normal (23,7%). Une analyse du gène *SLC40A1* a révélé la présence de la variation p.Ala350Asp (Ravasi et al., 2021). Ces observations posent la question d'un potentiel hotspot mutationnel, révélant que ce mécanisme de perte de fonction n'est pas si rare.

Cliniquement, les patients que nous décrivons présentent une surcharge en fer évocatrice d'une perte de fonction, soit une hyperferritinémie sévère (>1000 $\mu\text{g/l}$) contrastant avec un coefficient de saturation de la transferrine normal ou légèrement augmenté. L'export du fer est une fonction permanente de la ferroportine, alors que la réponse à l'hepcidine n'intervient qu'en cas de sécrétion de cette dernière, pour faire face à une quantité trop importante de fer dans le compartiment sanguin. Ainsi, il est compréhensible qu'en cas d'ambivalence, la conséquence principale reste une accumulation de fer dans le compartiment intracellulaire. Néanmoins, il paraît légitime de se poser la question de la participation de la résistance à l'hepcidine dans les stades avancés de la pathologie, où une surcharge mixte apparaît. Il pourrait être intéressant d'évaluer l'évolution des patients présentant une variation ambivalente en comparaison de patients présentant une "simple" perte de fonction par exemple. Il faut cependant noter que le nombre de patients reste faible à ce jour, et qu'il existe de nombreux facteurs, génétiques ou environnementaux, qui peuvent aggraver ou ralentir la surcharge en fer.

b. Les prédictions *in silico*, un choix d'outils raisonné et une interprétation prudente

Les données fonctionnelles sont d'une importance cruciale dans l'interprétation des variations fausses, mais elles ne sont pas toujours disponibles et demandent une expertise sur le gène et sa protéine. Lors de l'interprétation d'une variation découverte à l'occasion, par exemple, d'un séquençage haut débit, l'absence de données fonctionnelles demande l'utilisation d'autres outils. Les recomman-

dations de l'ACMG (Richards et al., 2015) proposent un certain nombre de critères permettant d'aider à la classification des variations, et parmi eux les données des algorithmes de prédiction *in silico* ont leur place, bien qu'avec un poids plutôt faible. Nous avons vu qu'il existe beaucoup d'outils disponibles, qui se basent sur la conservation, comme GERP++ (Davydov et al., 2010), ou les propriétés physico-chimiques des acides aminés, comme SIFT (Ng and Henikoff, 2001). Les derniers outils disponibles utilisent des approches de réseaux de neurones ou de régression logistique pour intégrer plusieurs scores et améliorer la sensibilité et la spécificité de l'ensemble des prédictions, comme CADD (Kircher et al., 2014), REVEL (Ioannidis et al., 2016), MetaLR (Dong et al., 2015), DANN (Quang et al., 2015).

Il est recommandé d'utiliser au moins deux outils différents, mais le choix des outils est laissé à la discrétion de l'utilisateur. La difficulté dans ce choix réside dans les variants à utiliser pour comparer les performances des différents outils. En effet, la plupart des outils de prédiction utilisent les données disponibles, notamment dans la base de données Clinvar ou HGMD (Human Gene Mutation Database) (Stenson et al., 2017), pour entraîner les algorithmes. Mais, la meilleure solution reste l'utilisation de variants testés fonctionnellement, variants pathogènes et surtout variants bénins, pour déterminer quelle combinaison permet le meilleur compromis entre la sensibilité (peu de faux-négatifs) et la spécificité (peu de faux-positifs). La plupart des auteurs s'accordent aujourd'hui sur le fait que la combinaison des outils va dépendre de la protéine considérée (Oza et al., 2018; Luo et al., 2019; Jolly et al., 2020) et que les prédictions pourront être améliorées par une meilleure prise en compte de la structure 3D de la protéine.

Concernant le gène *SLC40A1*, l'équipe de Mayr s'était déjà posée la question en 2010, montrant que le score Polyphen-2 avait une sensibilité de 99% et une spécificité de 67% pour la classification de 32 variations classées pathogènes (Mayr et al., 2010). Entre temps, le nombre de variations décrites a augmenté, ce qui explique que, sur les 56 variants pris en compte dans notre étude, les valeurs sont différentes pour cet outil (87.5% de sensibilité, 62.5% de spécificité). De plus, les outils de prédiction se sont développés, donc nous avons souhaité réaliser une nouvelle comparaison, mettant en évidence que la concordance entre les outils CADD et REVEL présentaient le meilleur compromis sensibilité/spécificité. L'une des principales limites de notre travail restera le faible nombre de variations utilisées, en particulier pour le contingent des variants neutres qui pâtissent souvent d'un défaut de description. Un autre point de vigilance concerne la dichotomie fonctionnelle des mutations. Plus généralement, il est décrit que les variations gain de fonction ont une conséquence structurale moindre que les variations perte de fonction (Gerasimavicius et al., 2022), pouvant mettre en défaut les algorithmes de prédiction et classer à tort une variation gain de fonction comme neutre. Ce risque est d'autant plus important dans le cas de *FPN1* que la régulation par l'hepcidine est un mécanisme retrouvé uniquement chez les vertébrés. C'est d'ailleurs ce que l'on voit dans notre cas, où la sensibilité des outils de prédiction tend à être meilleure pour les variants perte de fonction que gain de fonction. Encore une fois, ces outils de prédiction sont à utiliser de façon raisonnée, et entrent dans une analyse plus globale de la variation.

Notre étude a montré la supériorité de l'expertise structurale sur les prédictions *in silico* pour l'interprétation de variations pour lesquelles il manque de données fonctionnelles. La mise au point d'outils de prédictions basés sur la structure de la protéine est une question à laquelle plusieurs équipes ont tenté de répondre ces dernières années. Une des limites de cette approche est qu'il faut connaître la structure tridimensionnelle de la protéine. La prédiction de la structure 3D d'une protéine en l'absence de données expérimentales est un défi que plusieurs équipes tentent de relever depuis plusieurs années, et récemment deux algorithmes semblent sortir du lot : AlphaFold2 développé par DeepMind de Google (Jumper et al., 2021) et RoseTTaFold (Baek et al., 2021). AlphaFold, par exemple, utilise les réseaux de neurones pour prédire la structure d'une protéine uniquement à partir de sa séquence. Bien que ces algorithmes aient montré des performances intéressantes pour la prédiction des structures 3D, leur utilisation dans le contexte de la prédiction de l'impact de variations faux-sens, qui rappelons-le n'est pas l'objectif de départ de ces outils, souffre encore de nombreuses limitations (Pak et al., 2021; Buel and Walters, 2022; Sen et al., 2022).

Il est intéressant ici de comparer la structure prédite par ces algorithmes et la structure expérimentale de FPN1. La structure prédite par AlphaFold étant disponible publiquement (PDB AF-Q9NP59-F1), je l'ai superposée à la structure proposée par Billesbølle et al., en l'absence d'hepcidine et en l'absence de cation divalent (PDB 6W4S). Cette comparaison permet de mettre en évidence que les structures semblent bien superposées (Figure 25). L'algorithme AlphaFold2 prédit également les grandes boucles extra et intracellulaires. En revanche, si on se focalise sur certains éléments de structure, on peut noter quelques différences. Par exemple, nous avons vu que, sur la structure expérimentale, il existe une liaison hydrogène faible entre les résidus Asn144 et Tyr501, pouvant en partie expliquer l'effet gain de fonction des variations touchant la position 144, la position 501 étant connue pour interagir directement avec l'hepcidine. La structure proposée par AlphaFold2 ne retrouve pas cette liaison hydrogène, probablement parce que la distance entre les atomes d'oxygène des chaînes latérales est plus importante (4.35 Å contre 3.46 Å pour la structure expérimentale). De même, il a été décrit par notre équipe que l'hélice TM7 a, par sa structure discontinue, un rôle important dans la stabilité de la protéine et sa fonction d'export du fer. AlphaFold2 prédit cette discontinuité au sein de l'hélice, mais ne retrouve pas la liaison hydrogène entre les résidus Asp325 et Cys326 qui est retrouvée dans la structure expérimentale, et qui pourrait jouer un rôle dans la stabilité de cette région déroulée entre les hélices TM7a et TM7b (Le Tertre et al., 2021a) (Figure 26).

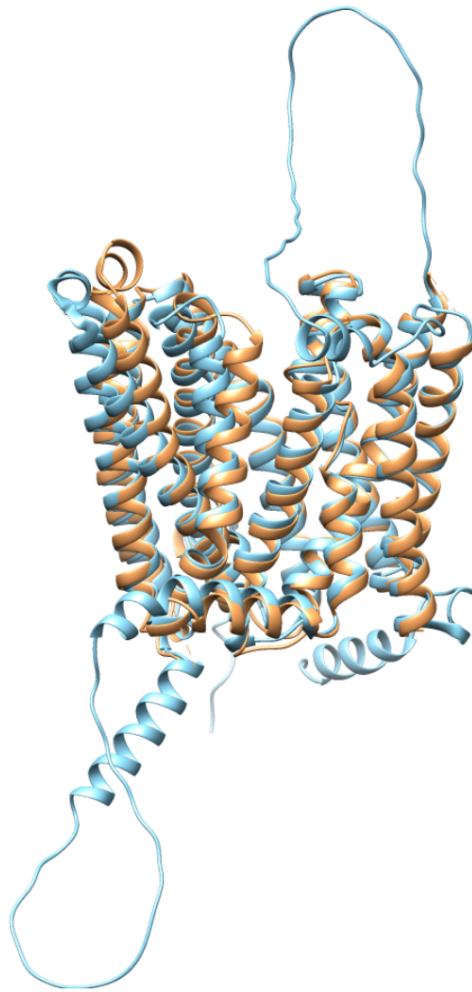


Figure 25: Superposition des structures expérimentale et prédite de FPN1. En orange, la structure proposée par Billesbølle et al., en l'absence de métal et d'hepcidine (pdb 6W4S). En bleu, la structure prédite par AlphaFold2 (AF-Q9NP59-F1).

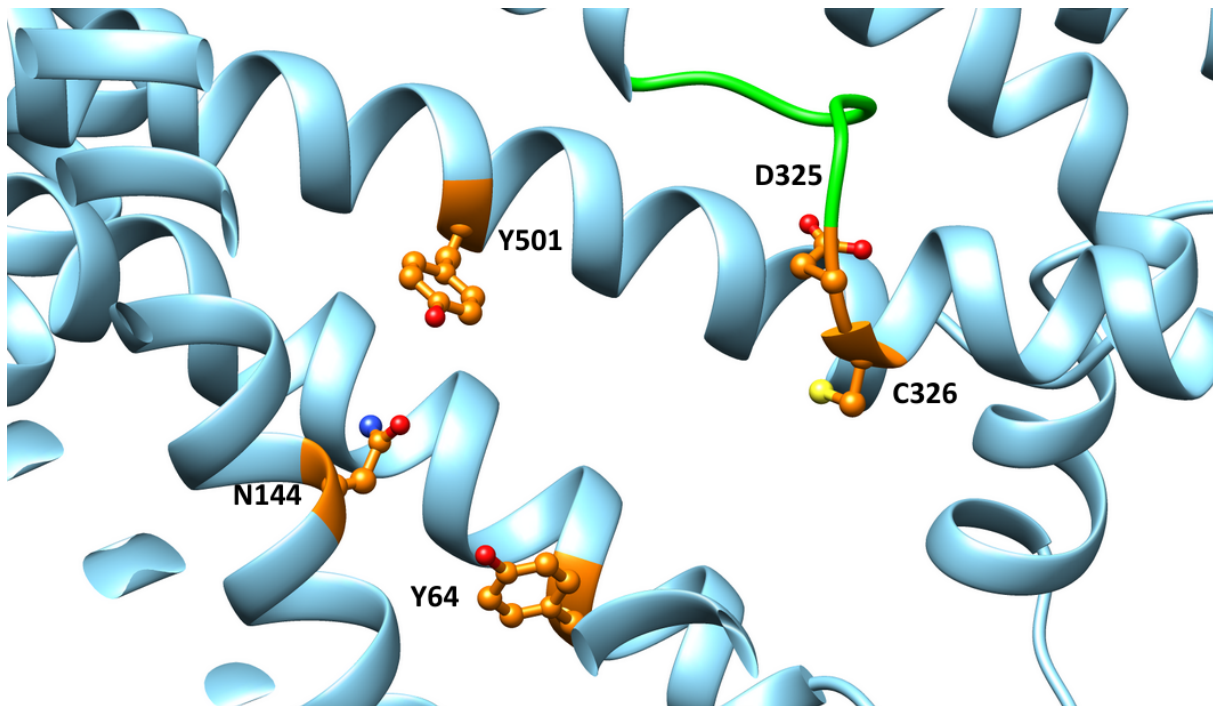


Figure 26: Focus sur la structure 3D prédite par AlphaFold2. En vert, la structure déroulée séparant l'hélice TM7 et TM7a et TM7b. Les résidus Y64, N144, C326 et Y201 correspondent à la discussion des résultats exposés dans l'article 1. Le résidu D325, avec son voisin C326, est représenté en comparaison avec les résultats publiés par notre équipe (Le Tertre et al. 2021). On note la plus grande distance entre les résidus N144 et Y501, empêchant l'établissement d'une liaison hydrogène, ainsi que l'absence de liaison hydrogène entre les résidus D325 et C326, pourtant importante pour la stabilité de la protéine en l'absence de métal.

Ici on devine tout de même un gain par rapport aux outils de prédiction plus habituels, qui n'exploitent pas ou très peu les données de structure. Le niveau de prédiction reste toutefois insuffisant pour une utilisation en clinique, à l'image des exemples choisis.

Un autre point important dans la prédiction de l'effet d'une variation sur la structure d'une protéine est la prise en compte du repliement de celle-ci. Certains outils comme I-mutant (Capriotti et al., 2005), DynaMut (Rodrigues et al., 2018), FoldX (Schymkowitz et al., 2005), MAESTRO (Laimer et al., 2015) ou encore DeepDDG (Cao et al., 2019) utilisent le principe du changement d'énergie libre. L'hypothèse de l'entonnoir de repliement suppose que l'état natif d'une protéine correspond à son minimum d'énergie libre dans les conditions de solution habituellement rencontrées dans les cellules (Onuchic and Wolynes, 2004) (Figure 27). L'énergie libre de Gibbs (ΔG) correspond à la balance énergétique entre l'état natif de la protéine et son état dénaturé. Une balance négative est en faveur de l'état natif de la protéine. Le remplacement d'un acide aminé au sein de la protéine

peut potentiellement faire varier cette balance énergétique (Gromiha et al., 1999). Le score $\Delta\Delta G$ correspond dès lors à la différence de balance énergétique entre la protéine sauvage et la protéine mutée. Un score négatif signifie que la mutation déstabilise la protéine, alors qu'un score positif favorise l'état natif de la protéine.

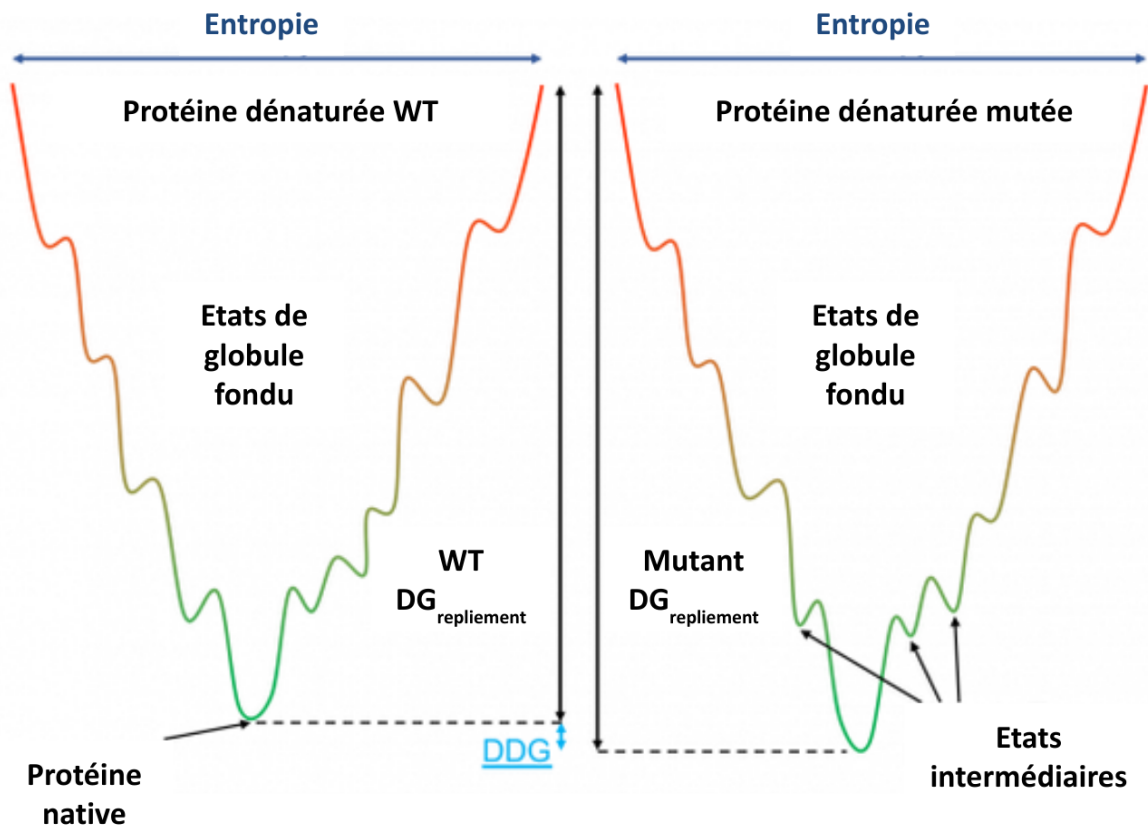


Figure 27: Représentation de l'entonnoir de repliement des protéines. Adapté de <https://support.cyrusbio.com/tools/ddg/>. En haut, la protéine est dénaturée, et représente l'état où le désordre (= entropie) est le plus important. En bas est représenté l'état de la protéine native, en passant par des états intermédiaires (globules fondus). La différence d'énergie entre les deux états est représenté par les flèches verticales au centre. Cette différence d'énergie peut être plus forte en cas de mutation (à droite) que pour la protéine sauvage (à gauche), indiquant que la mutation est susceptible d'altérer le repliement tridimensionnel de la protéine.

Pour tenter de rendre compte de l'intérêt de cette mesure pour la prédiction de la conséquence des mutations, nous pouvons prendre l'exemple de deux variations faux-sens du gène *SLC40A1*. On choisit par exemple p.Ala77Asp, une variation connue pour déstabiliser la présence de la protéine en membrane et être perte de fonction, et p.Ser47Phe que nous avons étudiée plus haut, avec des effets plus subtils sur l'export du fer et la sensibilité à l'hepcidine. Les données de $\Delta\Delta G$, prédites par différents

algorithmes (Pires et al., 2014a, 2014b; Pandurangan et al., 2017) à travers l'outil DynaMut, nous montrent que la variation p.Ala77Asp entraîne une déstabilisation de la protéine, devant conduire à une perte de fonction, alors que pour la variation p.Ser47Phe les résultats sont discordants entre les algorithmes, avec pour certains un $\Delta\Delta G$ positif et d'autres négatif (Tableau 3). Nous voyons ici les limites de cette approche, où des variations, comme p.Ser47Phe, peuvent être perte de fonction sans pour autant déstabiliser la protéine.

Algorithme	p.Ala77Asp	p.Ser47Phe
DynaMut	-0.888	0.565
mSCM	-2.355	-0.756
SDM	-3.150	0.800
DUET	-2.703	-0.392

Tableau 3. Valeurs de $\Delta\Delta G$ de différents algorithmes pour les variations p.Ala77Asp et p.Ser47Phe. Toutes les valeurs sont données en kcal/mol. Un score positif correspond à une stabilisation de la protéine, un score négatif à une déstabilisation.

Enfin, le cas de la ferroportine met en jeu un autre paramètre, qui est l'environnement lipidique dans lequel la protéine évolue à la membrane plasmique, indispensable à la stabilité et la fonction des protéines membranaires (Laganowsky et al., 2014; Sanders et al., 2018), et plus particulièrement des transporteurs secondaires (Martens et al., 2018). Une équipe a par ailleurs récemment mis en place un algorithme permettant d'identifier les résidus probablement en contact avec la bicouche lipidique, et donc potentiellement critiques pour la stabilisation de la protéine à la membrane et sa fonction (Wang et al., 2022).

Pour ce qui est de FPN1, l'importance de la bicouche lipidique dans la stabilité et la fonction du transporteur a déjà été soulevée. En 2010, les travaux de Auriac et al. permettaient de révéler la localisation préférentielle de FPN1 au niveau de radeaux lipidiques de macrophages, des structures membranaires riches en cholestérol et sphingolipides (Auriac et al., 2010). Cette localisation particulière aurait des conséquences sur le degré de sensibilité à l'hepcidine. Elle pourrait dépendre de la présence dans la séquence primaire de FPN1 de motifs de fixation au cholestérol CRAC ("Cholesterol Recognition Amino acid Consensus sequence") et son opposé CARC. La dépendance de FPN1 au cholestérol est en cours d'investigation dans notre équipe. C'est le travail d'une autre étudiante en thèse, Rim Debbiche, qui utilise différentes approches, dont :

- un criblage mutationnel ciblant les sites potentiels de liaison au cholestérol (dont CRAC et CARC),

-
- des expériences de déplétion/réplétion pour étudier l'impact d'une modulation des quantités de cholestérol à la membrane plasmique sur la fonction d'export du fer,
 - l'utilisation de molécules amphiphiles pouvant moduler la rigidité de microdomaines de la membrane plasmique et/ou l'interaction de protéines membranaires avec le cholestérol (Girault et al., 2011).

Chapitre II
Etude de la régulation à distance du gène
SLC40A1

CHAPITRE 2 : Etude de la régulation à distance du gène *SLC40A1*

Nous avons vu jusqu'ici que l'étude du gène *SLC40A1* fait partie de l'arbre diagnostique face à une surcharge en fer, qu'il y ait ou non une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine. Cet arbre diagnostique ne permet néanmoins pas de rendre compte de la totalité des situations de surcharge en fer. Ces situations, que l'on qualifiera dans la suite du propos d'hyperferritinémies inexplicables, peuvent résulter :

- d'une mauvaise appréciation des facteurs secondaires d'hyperferritinémie
- d'une cause génétique non encore connue, dans des gènes non décrits en pathologie
- d'une anomalie dans un gène déjà décrit en pathologie, mais dont le mécanisme physiopathologique n'est pas recherché ou pas connu.

La question posée ici est celle des mécanismes de régulation à distance du gène *SLC40A1*. Nous avons soulevé l'hypothèse que la maladie de la ferroportine peut être qualifiée de "cis-ruption disorder", autrement appelée "enhanceropathie". Ces termes de description récente regroupent des pathologies dont la base moléculaire est la perturbation d'un élément de régulation à distance d'un gène, à l'origine d'une modification de la transcription de ce dernier (Kleinjan and Coutinho, 2009) (voir paragraphe 1.2.2).

1. La régulation à distance des gènes

1.1 Structure tridimensionnelle du génome

Chez l'humain, chaque noyau contient six milliards de paires de bases (pb), qu'il faut faire tenir dans un noyau de quelques micromètres de diamètre, obligeant l'ADN à se condenser. Peu de temps après la découverte des acides nucléiques par F. Miescher en 1871 (Miescher, 1871), mais bien avant la description de la double hélice d'ADN par Watson et Crick en 1953 (Watson and Crick, 1953), Walther Flemming décrivait en 1882, durant ses travaux sur la division cellulaire, une structure nucléaire qu'il nomme chromatine (Flemming, 1882). En 1911, Kossel décrit pour la première fois les protéines composant la fibre de la chromatine, les histones (Kossel, 1911). Les principes de la condensation de l'ADN au sein de la chromatine sont aujourd'hui mieux connus, et cette condensation a un rôle à la fois structural et fonctionnel (Bonev and Cavalli, 2016).

1.1.1 Le rôle structural de la condensation de l'ADN : les nucléosomes

Le premier état de condensation de l'ADN correspond à l'enroulement régulier de l'ADN autour de petites protéines basiques organisées en octamères, les histones. Il en existe cinq classes : quatre his-

tones de coeur (H2A, H2B, H3, H4) et une histone de liaison (H1). Une boucle d'ADN de 147 nucléotides s'enroule autour d'un octamère contenant deux dimères H2A-H2B et deux dimères H3-H4 (Luger et al., 1997), et ces boucles se répètent tous les 200 nucléotides environ. L'histone H1 ne fait pas partie de cet octamère mais a un rôle de stabilisation de l'enroulement d'ADN en se liant aux points d'entrée et de sortie de l'ADN (Allan et al., 1980). La structure formée par l'enroulement de l'ADN autour des histones, appelée nucléosome, a un rôle important dans l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle, et donc dans l'expression des gènes. Les modifications des histones (acétylation, méthylation) font partie des modifications épigénétiques à l'origine de la régulation de la transcription.

L'organisation des nucléosomes au sein du noyau reste débattue aujourd'hui. Plusieurs théories coexistent, les plus plausibles étant un repliement en solénoïde de 33nm (Robinson et al., 2006) ou en zigzag (Schalch et al., 2005), qui s'assemblerait ensuite en chromonéma de 120nm, puis en chromatide de 300 à 700nm avant de former le chromosome (Figure 28). Une technique récente, la ChromEMT ("Chromatin Electron Microscopy Tomography"), permettant de visualiser la chromatine *in situ* au sein du noyau, remet en cause ce modèle, montrant un repliement désordonné en chaînes de 5 à 24nm de diamètre, elles-mêmes repliées ensemble selon des concentrations différentes (Ou et al., 2017) (Figure 29).

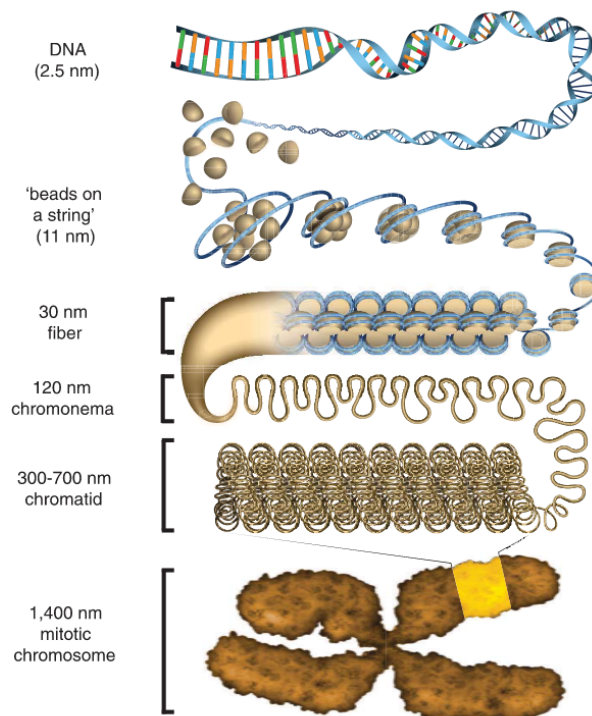


Figure 28: Organisation structurale de l'ADN et des histones au sein du chromosome. D'après Ou et al. 2014. L'ADN s'enroule autour des histones, formant les nucléosomes, qui s'assemblent en fibres de 30 nm, puis en chromonéma de 120 nm et en chromatide de 300 à 700 nm.

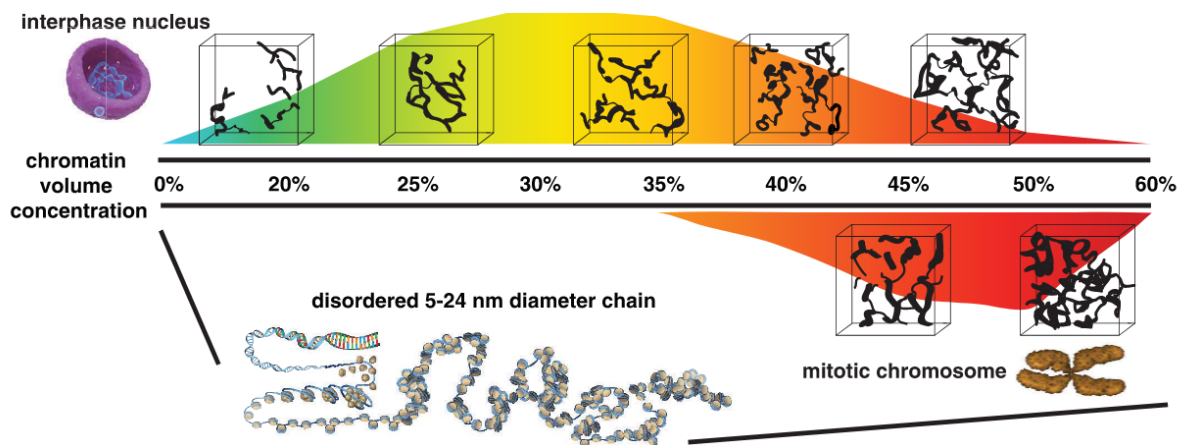


Figure 29: Modèle d'organisation de la chromatine d'après les données de ChromEMT. D'après Ou et al. 2014. L'organisation de la chromatine serait plus désordonnée, et différente entre l'interphase et la mitose.

L'organisation de la chromatine n'est pas seulement structurelle, elle est aussi fonctionnelle. Les états de condensation de la chromatine sont variables, et témoignent d'une activité transcriptionnelle plus ou moins intense.

1.1.2 La condensation de la chromatine

La condensation de la chromatine n'est pas fixe dans le temps ni homogène au sein du noyau. Temporellement, les états de condensation sont différents en fonction du cycle cellulaire, la condensation étant la plus élevée lors de la mitose, plus précisément durant la métaphase.

On distingue classiquement deux états de condensation de la chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. Les différences de condensation sont permises grâce à des modifications épigénétiques des histones et de l'ADN. Les histones sont riches en lysines et arginines, qui sont le siège de modifications post traductionnelles, principalement l'acétylation et la méthylation. Ces modifications, qui font partie du "code des histones", sont reconnues par des protéines régulatrices dont le rôle est de modifier l'état de condensation de la chromatine (Turner, 2002). En fonction du type de modification (acétylation ou méthylation), de l'acide aminé où intervient cette modification, et du nombre de groupements méthyl ajoutés, la chromatine est tantôt décondensée et donc accessible à la transcription, tantôt condensée et transcriptionnellement réprimée.

a. L'euchromatine

L'euchromatine représente les régions d'ADN à l'état décondensé, en général riches en gènes et plus actives transcriptionnellement. On les trouve de préférence au centre du noyau (Chen et al., 2018). Du point de vue épigénétique, les histones y sont majoritairement hyper-acétylés et hypo-méthylés, ce qui permet la décondensation de la chromatine.

b. L'hétérochromatine

A l'inverse, l'hétérochromatine est généralement pauvre en gènes, inactive transcriptionnellement, où les nucléosomes sont dans un état condensé, et où les histones sont préférentiellement méthylées, signe d'une moins bonne accessibilité pour la transcription. On les trouve en général en périphérie du noyau, notamment dans les domaines associés à la lamine ainsi qu'autour du nucléole (Guelen et al., 2008).

On distingue deux types d'hétérochromatine : l'hétérochromatine constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive est stable durant le cycle cellulaire, et retrouvée au niveau de régions répétées, comme le centromère ou le télomère. A l'inverse, certaines régions génomiques sont décrites comme étant de l'hétérochromatine facultative, où l'état de condensation peut varier en fonction de signaux cellulaires (Grewal and Jia, 2007).

L'organisation fonctionnelle de la chromatine au sein du noyau a été sujet à de nombreuses études et ne peut se réduire à la description de l'euchromatine et l'hétérochromatine. Cette organisation va être décrite dans la suite de cette introduction, en allant de la vision la plus large vers la plus fine, avec successivement :

- la structure des territoires chromosomiques
- les compartiments épigénomiques
- les domaines topologiquement associés

1.1.3 Les territoires chromosomiques

Les premiers éléments d'organisation de l'ADN au sein du noyau ont été décryptés tout d'abord grâce aux techniques de FISH ("Fluorescence In Situ Hybridization") puis de capture de la chromatine. Du point de vue le plus macroscopique, il a été décrit, grâce notamment aux travaux de Zorn et al. (Zorn et al., 1979), que la répartition des différents chromosomes au sein du noyau durant l'interphase n'était pas aléatoire, théorie confirmée par des études de FISH 3D sur des fibroblastes humains en phase G0 du cycle cellulaire (Bolzer et al., 2005). C'est ainsi que naît la notion de territoires chromosomiques, décrivant la place de chaque chromosome au sein du noyau et son rapport avec les autres chromosomes (Figure 30). A noter que cette répartition est spécifique d'un type cellulaire à l'autre et influe sur l'expression génique.



Figure 30: Organisation de la chromatine en territoires chromosomiques visualisée grâce à la technique FISH-3D. D'après Bolzer et al.

1.1.4 Les compartiments épigénomiques

Le développement des techniques de capture de la chromatine et notamment de la technique Hi-C (“High throughput 3C”, terme explicité plus loin), qui permet d’étudier l’ensemble des interactions physiques de l’ADN intra et interchromosomiques à une échelle pouvant aller jusqu’au kilobase, a permis d’aller plus loin dans l’étude de l’organisation chromatinienne. Ainsi, Lieberman-Aiden et al. vont classer les régions chromosomiques selon l’appartenance à deux compartiments, dénommés compartiments A ou B, au sein desquels les interactions intra et interchromosomiques seront préférentielles (Lieberman-Aiden et al., 2009a). Cette distinction A et B prend également naissance dans des différences épigénétiques au sein de ces compartiments, le compartiment A étant associé à un état accessible de la chromatine et une forte expression génique (actif), alors que le compartiment B est associé à l’hétérochromatine (inactif).

1.1.5 Les domaines topologiquement associés (ou TAD, “Topologically Associated Domains”)

Au sein de ces compartiments épigénomiques, on découvre grâce aux données de Hi-C l’existence de contacts chromatiniens organisés en domaines, appelés domaines topologiquement associés ou TAD (“Topologically Associated Domains”) (Dixon et al., 2012a) (Figure 31-B). Ces régions, de plusieurs centaines de kilobases à quelques mégabases (Rao et al., 2014), sont le siège de fréquentes interactions physiques de l’ADN, alors que ces interactions sont rares entre les TADs. Cette organisation est connue pour être stable lors des divisions cellulaires, conservée entre les types cellulaires ainsi qu’entre les espèces au sein de l’évolution (Vietri Rudan et al., 2015). Fonctionnellement, les TADs sont des domaines de régulation, limitant les interactions entre des éléments régulateurs et les promoteurs des gènes cibles au sein du TAD.

Des études plus fines ont montré au sein des TADs des signaux se démarquant du bruit de fond en Hi-C, correspondant à des boucles d’ADN, permettant le rapprochement du promoteur avec un élément de régulation (Rao et al., 2014) (Figure 31-A). Les TADs peuvent ainsi être subdivisés en plusieurs sous-unités, les sous-TADs, eux-mêmes divisés en boucles d’ADN. Alors que les TADs sont décrits comme conservés, il apparaît que les sous-TADs et les boucles d’ADN le sont moins et peuvent être spécifiques d’un type cellulaire (Bonev and Cavalli, 2016).

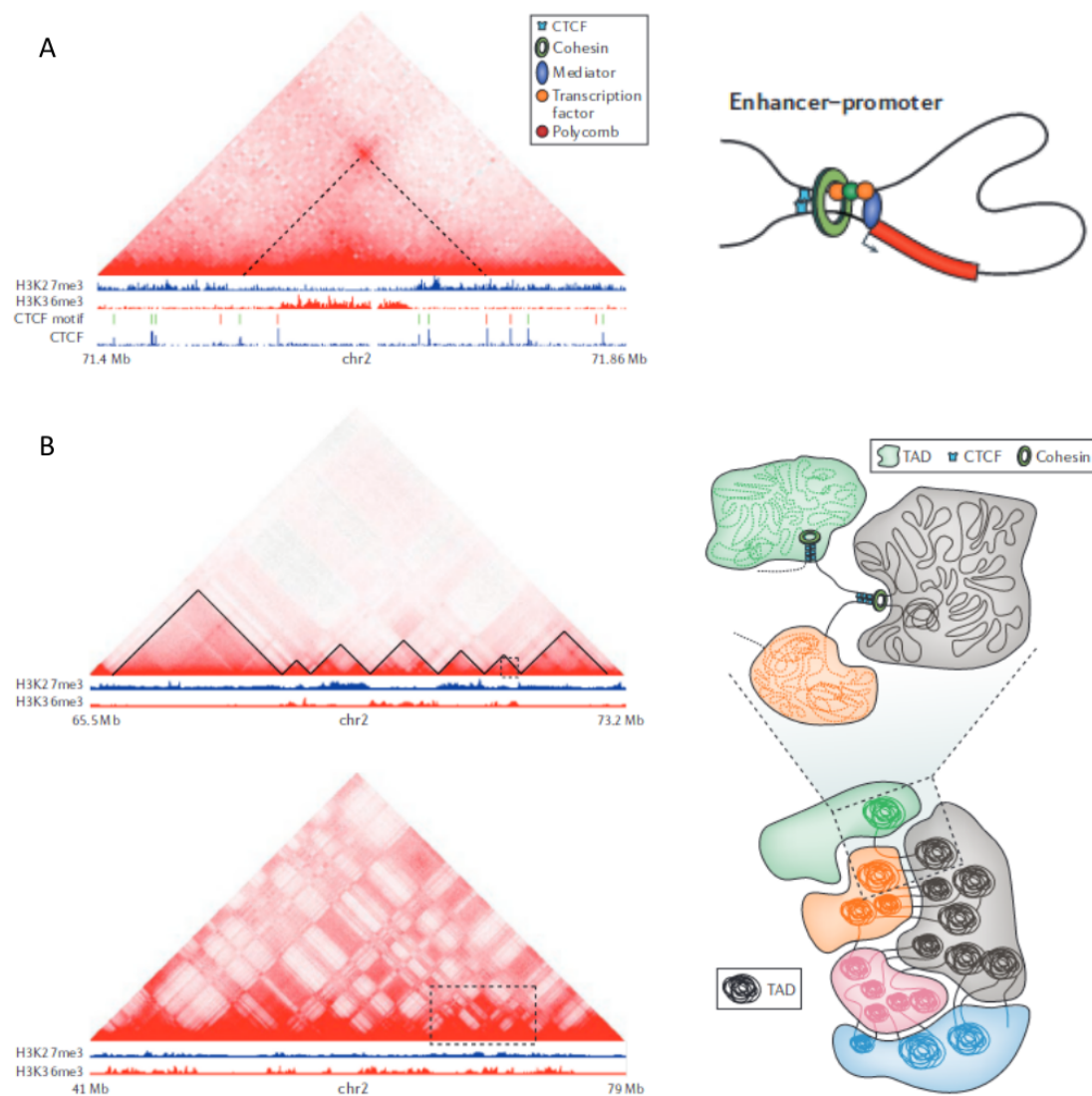


Figure 31: L'organisation de la chromatine en TADs D'après Bonev et Cavalli. 2016. **A.**

Représentation d'une boucle d'ADN locale au sein d'un TAD. A gauche, les données de Hi-C montrent le signal correspondant à une interaction entre deux régions séparées de quelques centaines de kilobases, dans un TAD plus large. Cette boucle est fermée par deux motifs CTCF d'orientation opposée, visible par les pics CTCF à chaque extrémité de l'interaction. **B.** Organisation des TADs et des compartiments épigénomiques. En haut, la répartition de différents TADs sur 8 mégabases du chromosome 2 (gauche) et représentation de trois TADs (à droite) fermés par des boucles grâce à la fixation de cohésine et de protéines CTCF. En bas, organisation des TADs au sein des différents compartiments épigénomiques.

L'étude des frontières délimitant les TADs est un élément important permettant notamment la

compréhension des mécanismes de formation de ces derniers. Grâce à des études d'immunoprécipitation de la chromatine, il a été mis en évidence l'importance de la fixation de la protéine CTCF (CCCTC-binding factor) ainsi que des sous-unités de la cohésine RAD21 ("RAD21 Cohesin Complex Component") et SMC3 ("Structural Maintenance of Chromosome 3") aux frontières des TADs mais également des boucles locales d'ADN (Rao et al., 2014).

La protéine CTCF a initialement été considérée comme un facteur de transcription (Lobanenkov et al., 1990) avant d'être décrite comme une protéine insulatrice, empêchant l'action d'éléments de régulation à distance d'un gène (Bell and Felsenfeld, 2000; Kurukuti et al., 2006), et d'être impliquée dans la formation de boucles d'ADN (Splinter et al., 2006; Ong and Corces, 2014). Elle se fixe sur des motifs spécifiques de l'ADN, qui sont au nombre de 60000 environ le long du génome (Chen et al., 2012). Une séquence consensus de ce motif de fixation était initialement proposée, à savoir 5'-CCGCGNGGNGGCAG-3', mais des études plus récentes ont montré que cette séquence est plus variable (Kim et al., 2007; Chen et al., 2012). Elle peut être orientée en sens ou en anti-sens. Un TAD est délimité par une paire de motifs CTCF, selon quatre configurations possibles : les deux motifs en sens ($\rightarrow \rightarrow$), les deux motifs en anti-sens ($\leftarrow \leftarrow$), en configuration divergente ($\leftarrow \rightarrow$) ou convergente ($\rightarrow \leftarrow$). L'orientation convergente est retrouvée, à quelques exceptions près, dans la totalité des TADs (Rao et al., 2014).

En plus des protéines CTCF, les TADs sont délimités par des cohésines. La cohésine est un complexe annulaire formé de sous-unités de SMC1, SMC3, RAD21 et STAG2 ("Stromal Antigen 2"), conservées jusqu'à la levure (Michaelis et al., 1997). Par des études d'immunoprécipitation de la chromatine, il a été montré que ce complexe co-localise avec la protéine CTCF dans le génome humain et jouait un rôle dans son activité insulatrice (Wendt et al., 2008). Plus précisément, les protéines SMC1 et SMC3 se lient par leur extrémité N-terminale, dite "charnière", à l'ADN, tandis que les têtes C-terminales possèdent une activité ATPase et se lient à RAD21 à STAG2 pour former l'anneau de cohésine (Remeseiro and Losada, 2013). C'est par son extrémité C-terminale que le facteur CTCF interagit avec STAG2, fixation indispensable pour l'activité insulatrice de CTCF (Xiao et al., 2011) (Figure 32). Un modèle de formation des boucles d'ADN à partir des complexes de cohésine et des facteurs CTCF a été proposé : l'extrusion en boucle (Sanborn et al., 2015; Fudenberg et al., 2016; Dolgin, 2017). Brièvement, l'ADN passe dans l'anneau de cohésine jusqu'à la rencontre de facteurs CTCF dans une orientation convergente (Figure 33).

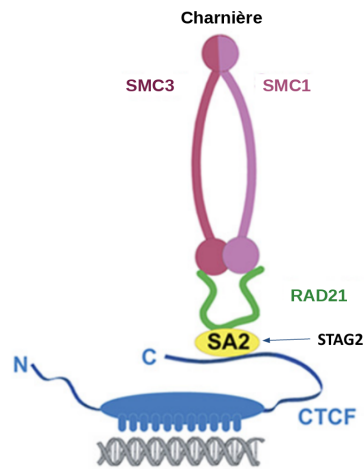


Figure 32: Formation de l'anneau de cohésine et liaison à la protéine CTCF D'après Xiao et al. 2011. L'extrémité N-terminale des protéines SMC3 et SMC1 forment la charnière, tandis que l'extrémité C-terminale se lie à RAD21 qui lui-même lie STAG2, ce dernier interagissant à l'extrémité C-terminale de CTCF.

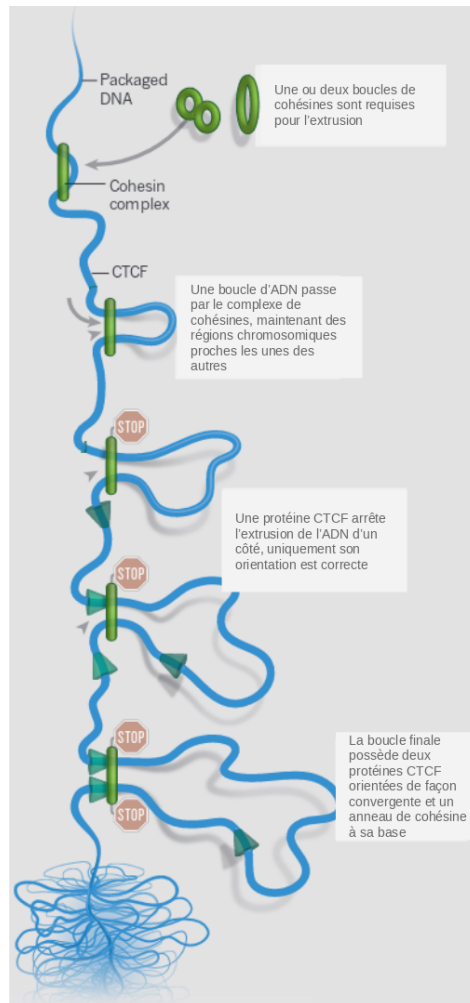


Figure 33: Modèle d’extrusion en boucle. D’après Dolgin. 2017. L’ADN passe dans un anneau (ou deux) de cohésine, puis glisse jusqu’à trouver une protéine CTCF orientée dans le bon sens. Une fois les deux extrémités arrêtées par les protéines CTCF, la boucle d’ADN est formée.

Nous allons voir plus loin que les TADs ont une fonction de régulation de la transcription des gènes très importante, pouvant favoriser ou bloquer des interactions entre un gène et un élément régulateur, et que leur perturbation peut être à l’origine de maladies.

1.1.6 Méthodes d’étude des TADs : capture de la chromatine

Depuis les années 2000, plusieurs méthodes d’étude de la chromatine ont été développées afin de mieux comprendre les interactions entre différents éléments du génome. Une description brève de ces différentes techniques sera faite, en commençant par la première technique développée : la 3C

(“Chromosome Conformation Capture”).

a. Technique 3C

Décrite pour la première fois en 2002 par Dekker et al. (Dekker et al., 2002) chez la levure, la technique 3C permet de détecter des fréquences d’interaction entre deux régions génomiques, comme par exemple les interactions entre un promoteur et un élément de régulation à distance. Cette technique se décompose en plusieurs étapes (Figure 34) :

- une fixation (“cross-linking”) des interactions protéines/ADN et protéines/protéines dans les cellules par le formaldéhyde.
- une digestion de l’ADN par des enzymes de restriction, choisies en fonction du locus à étudier.
- une ligation de la chromatine, pour lier les fragments d’ADN digérés.
- un “reverse cross-linking” pour libérer l’ADN des protéines.
- une amplification par PCR permet la détection des fragments ciblés. Une quantification est également possible par PCR quantitative (Hagège et al., 2007).

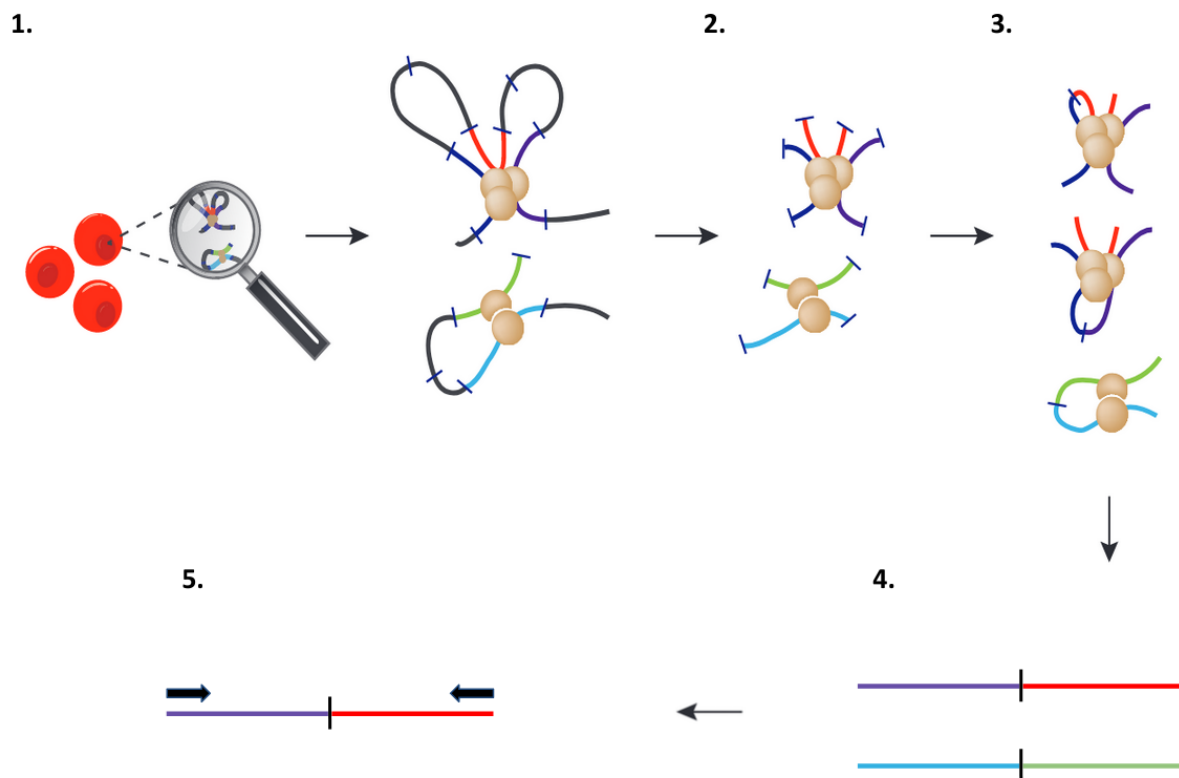


Figure 34: Schéma général de la technique 3C. Adapté de Stadhouders et al. 2013. **1.** Fixation et lyse des cellules. **2.** Digestion enzymatique. **3.** Ligation des extrémités. **4.** “Reverse cross-linking”. **5.** Amplification par PCR des fragments ligués.

La PCR nécessitant une amorce de part et d'autre du fragment ligué, cette technique permet l'interrogation d'une interaction entre deux régions génomiques connues. Elle ne permet pas d'analyser à grande échelle plusieurs régions génomiques. D'autres techniques, dérivées de la 3C, ont ensuite été proposées (Figure 35).

b. Technique 4C (“Circular Chromosome Conformation Capture”) et 5C (“Chromosome Conformation Capture Carbon Copy”)

Ces deux techniques sont des dérivées de la 3C permettant une analyse plus haut débit.

Pour ce qui est de la 4C, le but est de rechercher les interactions entre un locus (“bait” ou “viewpoint”) et l'ensemble du génome (Zhao et al., 2006). Le début de l'analyse est similaire à la technique 3C, à la différence qu'après l'étape de “reverse cross-linking”, une seconde digestion intervient, puis une circularisation par une seconde ligation. Une PCR inverse est réalisée à l'aide d'amorces positionnées en orientation inversée spécifique de la région cible “bait”, permettant d'amplifier les régions qui se sont retrouvées liées à la cible lors de la fixation. Ensuite, la librairie 4C peut être analysée, initialement par micropuce (“microarray”) ou plus récemment par séquençage haut débit (Stadhouders et al., 2013).

La technique 5C permet quant à elle d'analyser toutes les interactions d'une région chromosomique d'intérêt, jusqu'à plusieurs Mb (Dostie et al., 2006), en prenant plusieurs “viewpoints” tout au long de la région, et en utilisant des oligonucléotides spécifiques d'une extrémité d'un site de restriction. Ils s'hybrident face à face de part et d'autre d'un site de restriction grâce à une amplification médiée par ligation, ou “Ligation Mediated-Amplification” (LMA). Cette librairie obtenue est ensuite séquencée par séquençage haut débit.

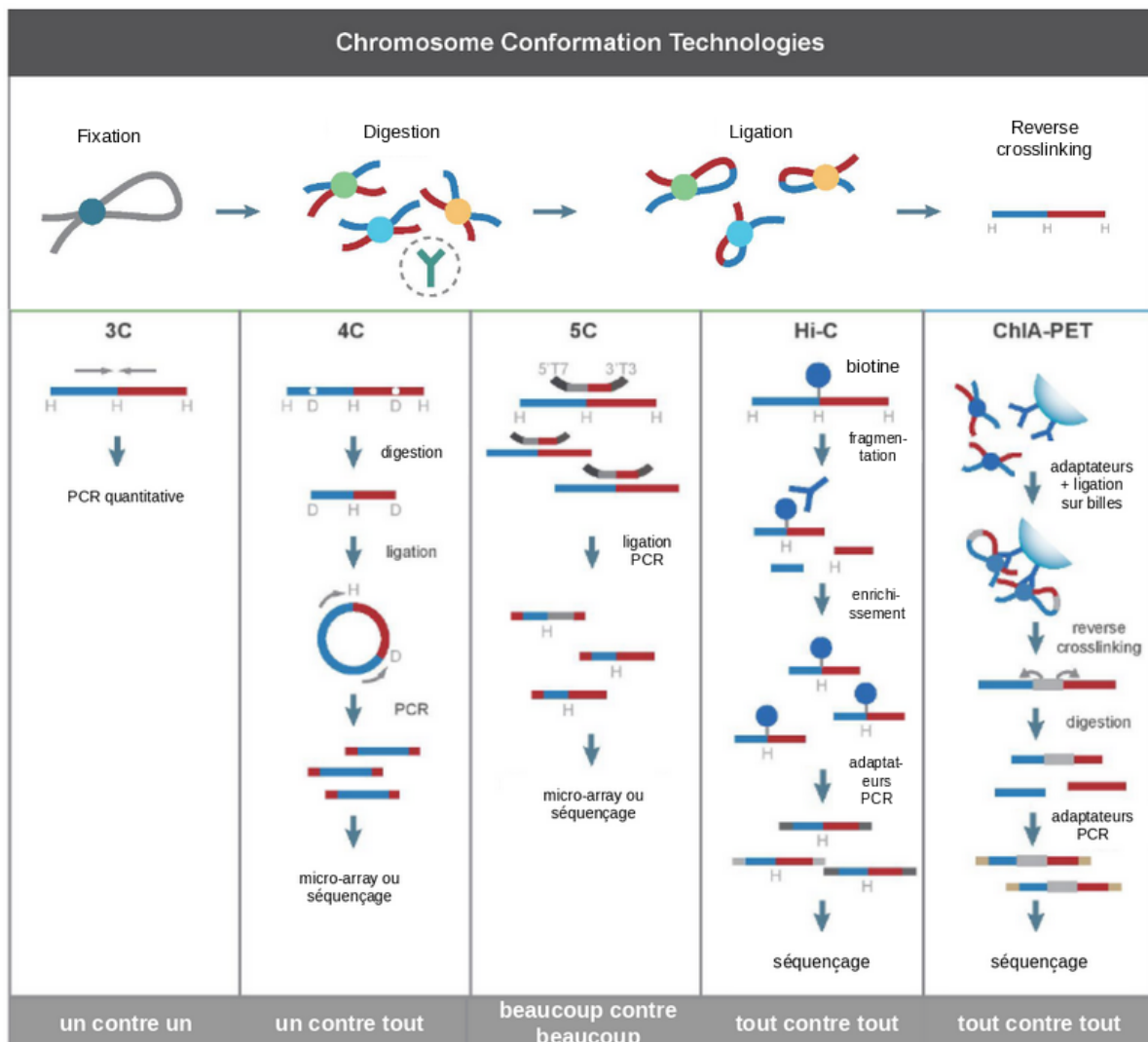


Figure 35: Résumé des différentes techniques de 3C et dérivées. Adapté de Li et al. 2014.

c. Les techniques pangénomiques : Hi-C et ChIA-PET

La technique de Hi-C (“High throughput 3C”) est décrite en 2009 par Dekker et al. et permet de détecter toutes les interactions du génome (Lieberman-Aiden et al., 2009b). Après la première digestion enzymatique, les extrémités des fragments sont comblées par des résidus biotinylés avant ligation. La librairie est ensuite fragmentée et les fragments contenant la biotine sont capturés par des billes de streptavidine. Des adaptateurs sont ajoutés pour permettre une analyse par séquençage haut débit. Par son caractère pangénomique, elle est la technique de référence pour l’étude de l’organisation spatiale du génome et notamment la définition des TADs.

Une autre technique pangénomique est la technique ChIA-PET (“Chromatin Interaction Analysis by

Paired-End Tag Sequencing”), qui permet d’analyser les interactions chromatinienne médiées par la présence d’un facteur de transcription (Fullwood et al., 2009). Après fixation de la chromatine, l’ADN est fragmenté par sonication. Une immunoprécipitation de la chromatine permet d’enrichir l’échantillon en complexes d’interactions liés au facteur de transcription d’intérêt et des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités avant ligation. Après un “reverse cross-linking”, une digestion est réalisée puis des adaptateurs sont ajoutés avant séquençage haut débit.

Ces techniques permettent de mieux comprendre la conformation de la chromatine, et notamment la constitution des TADs, mais permettent également la mise en évidence d’interactions physiques entre un promoteur et une région génomique à distance. Cette interaction physique est un des éléments qui permet d’identifier des régions dites régulatrices, qui ont un effet positif ou négatif sur la transcription d’un gène, et c’est ce qui sera maintenant développé.

1.2. Régulation de la transcription des gènes

Cette partie abordera de façon binaire la régulation d’un gène qui est médiée par la région promotrice, en différenciant, d’une part, la régulation dite proximale et, d’autre part, la régulation dite à distance. Dans les deux cas, il convient de définir deux termes qui seront utilisés par la suite :

- le terme d’élément en *cis*, qui correspond à un élément présent sur le même brin d’ADN. Ce terme qualifie la région promotrice mais également les éléments de régulation à distance.
- le terme d’élément en *trans*, regroupant les facteurs de transcription (FTs) qui viennent se fixer à l’ADN. On distingue les facteurs de transcription généraux, qui sont impliqués dans la régulation proximale, et les FTs et cofacteurs spécifiques des éléments de régulation à distance.

1.2.1. La régulation proximale : le promoteur

Dans le cadre des gènes codant des protéines, la transcription est un processus qui met en jeu d’un côté le site d’initiation de la transcription du gène, et de l’autre l’action de l’ARN polymérase II, aidée par des facteurs de transcription.

Le promoteur est le site d’assemblage de la machinerie transcriptionnelle. Il contient notamment le site d’initiation de la transcription (TSS, “Transcription Start Site”), qui est le point de départ. Le promoteur possède les principaux éléments du coeur du promoteur (“Core Promoter Elements”), qui permettent la fixation des éléments du complexe d’initiation de la transcription (PIC, “PreInitiation Complex”, décrit dans le paragraphe suivant). Le principal élément est la boîte TATA (“TATA-box”) qui permet la fixation du facteur TFIID. D’autres éléments existent autour du TSS, à savoir l’élément initiateur Inr (Corden et al., 1980), la séquence DPE (“Downstream Promoter Element”) (Burke and Kadonaga, 1997), les motifs BRE (“TFIIB Recognition Element”) (Deng and Roberts, 2005), l’élément

MTE (“Motif Ten Element”) fixant les sous-unités TAF6 et TAF9 de TFIID, et les séquences DCE (“Downstream Core Element”) (Lewis et al., 2000), fixant également TFIID.

On distingue classiquement deux types de promoteurs : les promoteurs concentrés et dispersés.

- Les promoteurs **concentrés** contiennent un seul TSS bien déterminé. On retrouve ce type de promoteur dans des gènes à expression tissu-spécifique ou hautement régulés (Schug et al., 2005).
- Les promoteurs **dispersés**, quant à eux, ne possèdent pas de boîte TATA ni de séquence Inr. Ils sont en général riches en îlots CpG (succession de dinucléotides CG), et peuvent contenir plusieurs TSS répartis sur des séquences de 50 à 100 pb. Ces promoteurs seraient les plus fréquents, et retrouvés dans des gènes à expression ubiquitaire, ou gènes de “ménage” (Smale and Kadonaga, 2003; Carninci et al., 2006).

Le PIC est formé de l’ARN polymérase II et de facteurs généraux de transcription (tel que TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH). Il vient se fixer sur la région promotrice du gène (Thomas and Chiang, 2006). Plus précisément, le complexe TFIID se fixe sur un élément particulier du promoteur, la boîte TATA (pour les promoteurs qui en possèdent une) via la sous-unité TBP (“TATA-box Binding Protein”), aidé par ses autres sous-unités TAFs (“TBP Associated Factors”). Cette fixation est stabilisée par l’ajout de TFIIA. De même, la fixation de TFIIB au niveau du site BRE favorise l’incorporation de l’ARN polymérase II. TFIIE et TFIIH permettent l’ouverture de l’ADN pour la fixation de l’ARN polymérase II (Thomas and Chiang, 2006) (Figure 36). A ce PIC s’ajoute un complexe, le complexe médiateur, composé de plusieurs protéines, qui joue un rôle important dans l’assemblage du PIC (Malik and Roeder, 2010) ainsi que dans la régulation à distance.

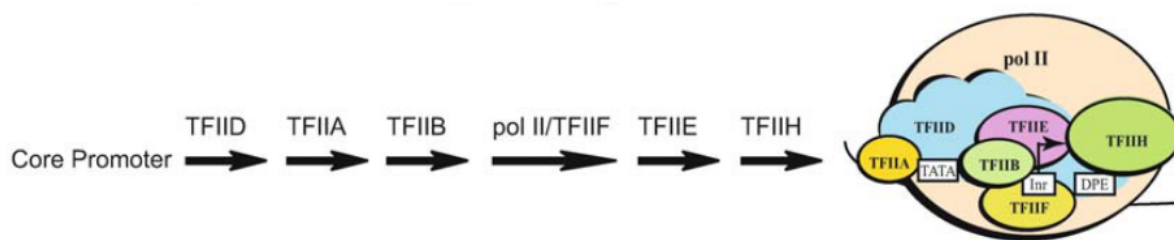


Figure 36: Mise en place du complexe d’initiation de la transcription sur un promoteur de type concentré. D’après Thomas et al. 2006. La sous-unité TBP du complexe TFIID se fixe à la boîte TATA. Les facteurs TFIIA et TFIIB permettent la stabilisation de cette interaction, et l’ARN polymérase II, amenée par TFIIF, est incorporée grâce à l’ouverture de l’ADN par TFIIE et TFIIH.

La mise en place de la machinerie transcriptionnelle a un rôle primordial dans l’initiation de la transcription, mais ces FTs ne sont pas suffisants pour moduler l’expression d’un gène. Nous allons main-

tenant voir comment des régions situées à distance du promoteur peuvent avoir un effet sur la transcription d'un gène.

1.2.2. La régulation à distance : les enhancers et silencers

En 2004, un projet voit le jour, réunissant 32 laboratoires à travers le monde, dont l'un des objectifs est de décrypter le rôle des régions non codantes de l'ADN (ENCODE Project Consortium, 2004), qui correspondent à 98% de notre génome (Hegde and Crowley, 2019). A partir de données expérimentales, le but est d'identifier des éléments de régulation en *cis*, dits "candidates Cis-Regulatory Elements" cCREs. A ce jour 926,535 cCRE humains sont recensés. Ces éléments sont potentiellement importants pour la régulation de l'expression d'un gène, et contiennent des motifs spécifiques de fixation de FTs. On peut diviser les CREs en :

- promoteurs, discutés plus haut
- enhancers (ou amplificateurs) qui augmentent la transcription d'un gène tout en étant à distance de celui-ci, en général à plusieurs kilobases.
- silencers, (ou répresseurs) qui diminuent l'expression du gène à distance
- insulateurs, où se fixe la protéine CTCF discutée plus haut.

Tous ces éléments ont la particularité de porter les marques épigénétiques discutées plus haut, à savoir notamment l'acétylation et la méthylation des histones.

a. Les enhancers

Les enhancers sont décrits depuis les années 1980 et la découverte de l'enhancer SV40 issu de l'ADN viral (Benoist and Chambon, 1981). Ce sont de courtes séquences d'ADN non codantes, de quelques centaines de kilobases, liant des facteurs dont le but est d'augmenter la transcription d'un gène. Ils sont localisés à distance du promoteur du gène qu'elles régulent, en amont ou en aval de celui-ci et ont pour particularités :

- d'être localisés dans des régions décondensées de la chromatine, et donc sensibles à la DNase I (Gross and Garrard, 1988)
- de porter des modification des histones, notamment l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac) ou la monométhylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4Me1) (Heintzman et al., 2007, 2009).

Ces enhancers fixent des facteurs de transcription qui, avec l'action de cofacteurs, vont aider au recrutement de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur du gène cible (Heintzman et al., 2007; Visel et al., 2009; Haberle and Stark, 2018). Plusieurs modèles sont décrits pour tenter d'expliquer les mécanismes de fixation des différents facteurs de transcription au niveau d'une séquence enhancer et leur coopération (Long et al., 2016) au sein d'un même TAD.

Les enhancers peuvent agir seuls pour favoriser la transcription d'un gène, mais peuvent également agir en coopération avec d'autres enhancers (Li et al., 2018b). Certains enhancers, appelés superenhancers et décrits en 2013 sur des cellules souches embryonnaires, ont la capacité de lier à eux seuls des FTs essentiels (notamment Oct4, Sox2 et Nanog) (Whyte et al., 2013), et de co-réguler plusieurs gènes (Figure 37).

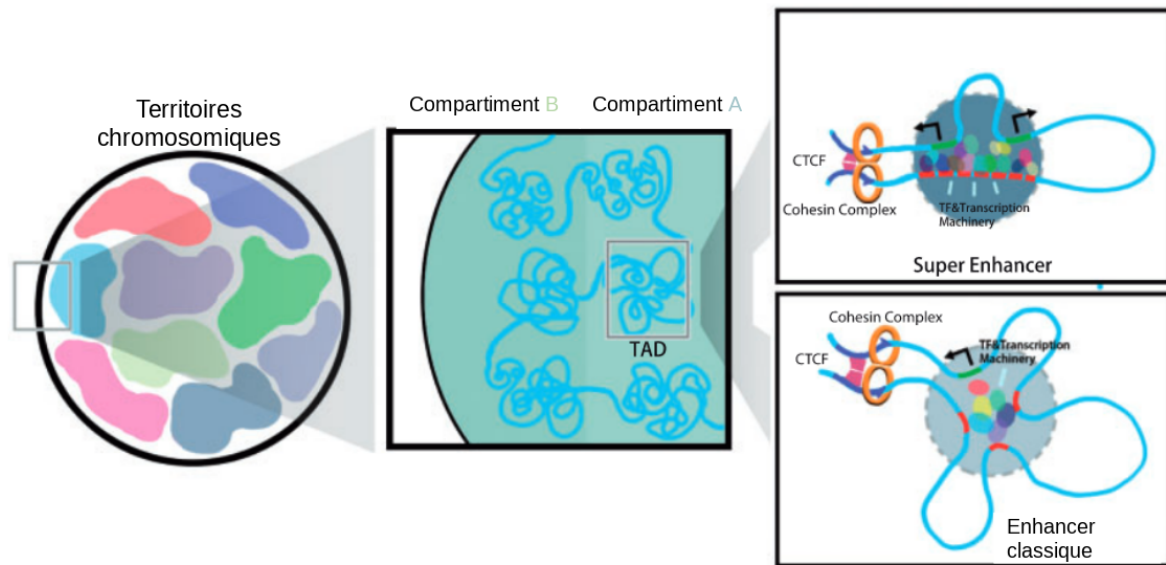


Figure 37: Principe d'interaction entre les enhancers et le promoteur D'après Li et al. 2018. La chromatine est donc organisée en territoires chromosomiques, lesquels sont compartimentés en compartiment A (actif) et B (inactif). Au sein de ces compartiments, les boucles d'ADN formées par l'action des protéines CTCF et des cohésines, permettent la mise en contact de régions de régulation, les enhancers, avec la région promotrice, pas le biais de facteurs de transcription et de protéines coactivatrices. En général, plusieurs enhancers coopèrent pour agir sur un promoteur, mais un modèle de super enhancer a également été décrit.

b. Les silenciers

Les silenciers, à l'inverse des enhancers, sont des régions ayant la capacité d'inhiber la transcription d'un gène à distance. Ils partagent en général la majorité des propriétés que l'on retrouve pour les enhancers (Maston et al., 2006). Plusieurs mécanismes sont à l'origine de cette répression :

- bloquer la fixation de FTs par modification de la chromatine, la rendant inaccessible. C'est par exemple le cas de protéines du complexe Polycomb, qui ont pour action la déacétylation et la méthylation de l'histone H3 (Srinivasan and Atchison, 2004),
- bloquer la liaison d'un élément activateur proche (Harris et al., 2005),

- empêcher l'assemblage du complexe de préinitiation (PIC) (Chen and Widom, 2005).

c. Les insulateurs

Les insulateurs sont des régions de quelques centaines de paires de bases à quelques kilobases, ayant pour rôle de restreindre l'action d'un enhancer ou un silencer à une partie du génome (Wallace and Felsenfeld, 2007). On en distingue deux types, en fonction de leur mode d'action (Figure 38) :

- les insulateurs “enhancer-blocking” se trouvent en général entre un enhancer et un promoteur, et ont donc la capacité d'empêcher l'action de l'enhancer sur ce promoteur,
- les insulateurs barrière d'hétérochromatine, bloquant la propagation de l'hétérochromatine et délimitant ainsi les domaines de chromatine active et inactive.

Comme discuté plus haut, la seule protéine insulatrice décrite chez l'homme est la protéine CTCF. En étant impliquée dans la formation des TADs, en collaboration avec la cohésine, la protéine CTCF agit comme barrière empêchant un enhancer situé dans un TAD d'agir sur un promoteur situé dans un TAD voisin.

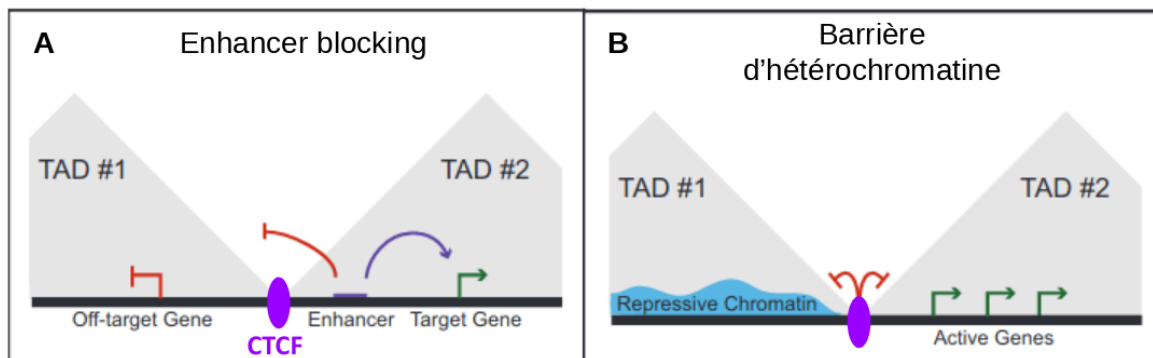


Figure 38: Mode d'action de la protéine insulatrice CTCF Adapté de Dixon et al. 2016. **A.** La fonction “enhancer blocking”. En délimitant les TADs, la protéine CTCF empêche l'action d'un enhancer sur un promoteur situé dans le TAD voisin. **B.** La fonction barrière. La protéine CTCF délimite deux TADs et empêche ainsi qu'un domaine chromatinien actif soit rendu inactif par propagation de la répression de la chromatine du TAD voisin.

1.2.3. Importance de la régulation à distance en contexte pathologique : les enhancéropathies

Depuis plusieurs années le rôle des CREs en pathologie a fait l'objet de beaucoup de travaux, notamment depuis le développement des technologies de séquençage haut débit. Le terme de “cis-ruption disorders” ou d'enhancéropathies a été proposé pour catégoriser les pathologies dont la base moléculaire est l'altération d'un élément de régulation (Kleinjan and Coutinho, 2009). Plusieurs mécanismes

sont décrits, principalement des variants structuraux, mais également des mutations ponctuelles. Ces mécanismes peuvent être classés en deux catégories : les variations touchant l'enhancer et les variations touchant les TADs et l'organisation tridimensionnelle du génome.

a. Les variations touchant les enhancers

Ces variations vont être à l'origine d'une modification de l'action d'un enhancer sur un promoteur. Plusieurs types de variations peuvent être retrouvées, dont voici quelques exemples :

- La délétion d'un élément de régulation, comme dans le cas de la délétion d'un enhancer du gène *POU3F4* associée à une forme de surdité liée à l'X (Kok et al., 1996) ou encore la délétion d'un élément régulateur de *SHOX* dans le spectre de la dyschondrostéose de Léri-Weill (Sabherwal et al., 2007).
- Un variant ponctuel touchant un enhancer. Ces variants peuvent être des variants rares ou fréquents, et affecter la fonction d'un enhancer en modifiant le site de fixation d'un facteur de transcription. C'est le cas pour le gène *IRF6* et la fente labiale non syndromique (Rahimov et al., 2008).
- Une variation de structure mettant à distance un enhancer et son promoteur. Une translocation réciproque, ou une inversion par exemple, peut éloigner de façon significative un enhancer, l'empêchant d'agir sur le promoteur, comme il a été décrit pour l'aniridie et les translocations touchant un élément de régulation du gène *PAX6* (Fantes et al., 1995).
- La duplication d'un élément de régulation, comme pour le cas du gène *BMP2* et la brachydactylie de type A2 (Dathe et al., 2009).

b. Les variations touchant les frontières des TADs

En plus des variations touchant l'enhancer lui-même, il est décrit depuis plusieurs années des cas de pathologies dont l'anomalie génétique touche l'organisation tridimensionnelle du génome au locus donné. On peut citer plusieurs mécanismes perturbant la formation d'un TAD, modifiant le rôle d'un enhancer et pouvant mener à la régulation aberrante d'un gène par un enhancer (Figure 39):

- L'inactivation d'un TAD par un mécanisme épigénétique (hyperméthylation de la frontière), que l'on peut voir par exemple dans certains cancers (Flavahan et al., 2016),
- La perturbation de la frontière par un variant nucléotidique (SNV, "Single Nucleotide Variant") touchant le site de fixation CTCF, une délétion ou une inversion touchant la frontière du TAD, comme il est possible de voir dans certains cancers colorectaux (Katainen et al., 2015), dans la brachydactylie de type A1 et le gène *PAX3* (Lupi  n  ez et al., 2015), ou dans le cas de l'inversion au locus *WNT6* et le F-syndrome (Lupi  n  ez et al., 2015).
- La formation d'un nouveau TAD par duplication. Un des exemples les plus connus est celui du locus *SOX9* et *KCNJ2*, où la duplication de la région en amont de *SOX9* et s'étendant jusqu'à *KCNJ2* entraîne la formation d'un nouveau TAD, et où la copie supplémentaire de *KCNJ2* est

sous le contrôle des éléments régulateurs de *SOX9*, eux-même dupliqués. Ceci est responsable du syndrome de Cooks regroupant des anomalies des doigts notamment (Franke et al., 2016).

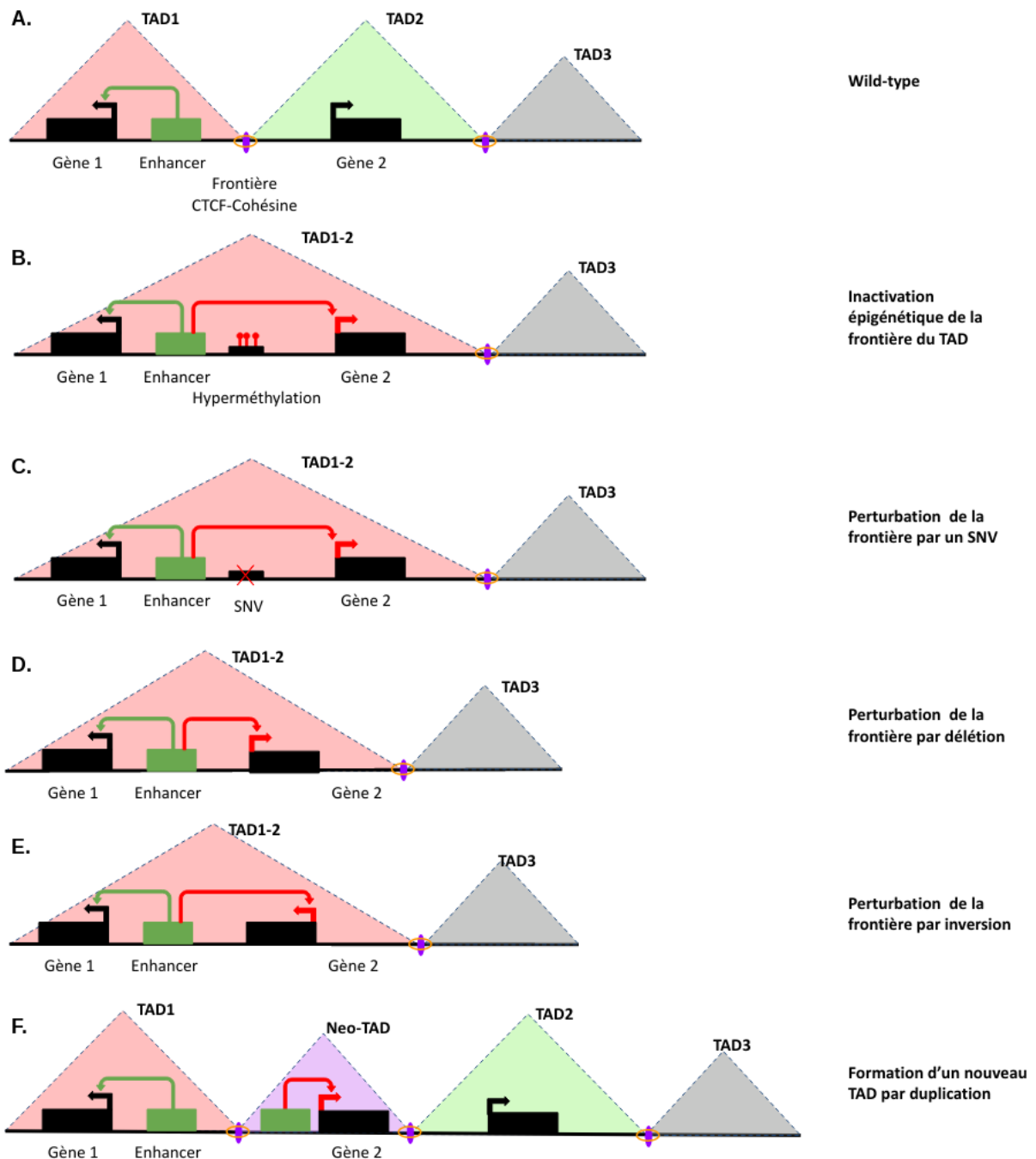


Figure 39: Différents mécanismes de perturbation d'un TAD Adapté de Krumm et Duan, 2019. **A** Disposition normale avec trois TADs séparés par des frontières CTCF-cohésine. Le gène 1 est sous le contrôle de l'enhancer (vert). **B** La présence d'une hyperméthylation du site CTCF engendre l'absence de formation de la frontière et de la fusion des TADs 1 et 2, entraînant la régulation du gène 2 par l'enhancer du gène 1. Des conséquences similaires peuvent se voir en cas de mutation (SNV) (**C**), délétion du site CTCF (**D**) ou encore l'inversion autour de cette frontière (**E**). Enfin, une duplication peut entraîner la création d'un nouveau TAD dans lequel la copie supplémentaire du gène 2 se retrouverait sous le contrôle d'une copie supplémentaire de l'enhancer (**F**).

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

1.2.3. Stratégies d'étude des régions de régulation à distance

Nous venons de voir qu'en dehors de l'aspect fondamental de la compréhension de la régulation à distance, la recherche de régions de régulation peut avoir une importance en pathologies humaines. L'identification de telles régions et d'anomalies génétiques associées correspond d'ailleurs à des travaux en cours au sein de l'unité Inserm U1078 Génétique, Génomique et Biotechnologies sur la mucoviscidose, la polykystose rénale autosomique dominante ou encore les surdités non syndromiques (Moisan et al., 2016, 2018, 2019; Collobert et al., 2021).

Les stratégies d'interrogation et de caractérisation fonctionnelles d'éléments régulateurs sont multiples, mais se basent toutes sur un faisceau d'arguments (Gasperini et al., 2020), pouvant comprendre :

- Une annotation biochimique précise, comme l'acétylation des histones, l'hypersensibilité à la DNase...
- La démonstration de l'effet de l'enhancer par une technique de gène rapporteur, comme par exemple le gène codant la luciférase
- La preuve d'un mécanisme d'action en *cis*, par des études de conformation de la chromatine (3C, 4C et 5C, comme discuté plus haut)
- La preuve *in vitro* par la perturbation épigénétique ou génomique de l'enhancer et les modifications de l'expression génique.

Ces techniques sont complémentaires, et la véracité de l'action d'un enhancer sur le gène cible dépendra du nombre d'arguments qui seront validés.

a. Outils d'analyse *in silico* et données expérimentales

La base de données du projet ENCODE regroupe les données de plusieurs types cellulaires issues d'analyse de l'ouverture de la chromatine à partir d'études de DNase-seq ou ATAC-seq ("Assay for Transposase-Accessible Chromatin-seq") (Buenrostro et al., 2015), de marques de modification des histones et de fixation de facteurs de transcription par immuno précipitation de la chromatine (ChIP-seq), d'expression génique, de méthylation de l'ADN, d'interactions chromatitiques (ChIA-PET), des TADs (Hi-C) (<https://www.encodeproject.org/data/annotations/>). Les régions sont annotées afin de déterminer les régions candidates (cCREs), les états fonctionnels de la chromatine (ChromHMM)... Il existe plusieurs façons d'interroger ces données, citons par exemple le visualisateur UCSC (University of California Santa Cruz, <https://genome.ucsc.edu/>) (Kent et al., 2002), ou l'outil SCREEN proposé par ENCODE (Moore et al., 2020).

En plus de ces annotations basées sur des données expérimentales, nous pouvons ajouter l'étude de la conservation de séquence pour évaluer l'importance de certaines régions du génome. Il a été

montré que les éléments les plus actifs transcriptionnellement étaient plus conservés au sein des espèces, et que la conservation était plus forte à proximité de la région promotrice (Berthelot et al., 2018). A l'inverse une région à distance et pas forcément aussi bien conservée peut correspondre à une régulation spécifique à une espèce.

b. Exploration *in vitro* des éléments de régulation par technologie CRISPR/Cas9

La preuve de l'implication d'une région dans la régulation d'un gène passe par l'étude de cette région de façon endogène, c'est-à-dire dans l'environnement *a minima* de la cellule. Le développement de la technologie d'édition génique CRISPR/Cas9 ("Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats") (Barrangou et al., 2007) a permis son utilisation pour étudier la régulation à distance des gènes (Santiago-Algarra et al., 2017; Pickar-Oliver and Gersbach, 2019).

Brièvement, le système CRISPR/Cas9 utilise, d'une part, une molécule d'ARN appelée ARN guide (ARNg) complémentaire de la région cible et, d'autre part, la Cas9, une nucléase d'origine bactérienne, permettant une cassure double brin de l'ADN. Cette cassure est ensuite réparée en utilisant les mécanismes de réparation de l'ADN internes à la cellule, c'est-à-dire la jonction d'extrémités non homologues ("Non Homologous End Joining", NHEJ), induisant en général de petites insertions ou délétions au point de cassure, ou le mécanisme de recombinaison homologue, si l'on apporte un ADN matrice. Ce dernier mécanisme est celui qui permet notamment l'édition d'une base sur le génome, tandis que le premier mécanisme est utilisé, par exemple, pour induire la perte de fonction d'un gène (Figure 40).

Une des possibilités d'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 pour l'étude de régions de régulation est de déléter la région d'intérêt dans un modèle cellulaire afin d'étudier l'impact sur l'expression du gène cible, par l'utilisation de deux ARNg, de part et d'autre de la région d'intérêt. Cette méthode s'est montrée robuste pour la confirmation de l'effet de régions candidates (Zhou et al., 2014; Moorthy and Mitchell, 2016; Cassinari et al., 2019).

Une autre stratégie vise à utiliser la propriété de reconnaissance d'une séquence du système CRISPR/-Cas9 mais sans l'activité endonucléase. La simple fixation de la Cas9, ici modifiée ("dead-Cas9", dCas9) engendre un encombrement stérique empêchant la fixation de facteurs de transcription et donc l'activité de l'enhancer (Qi et al., 2013). L'ajout d'un facteur répresseur comme KRAB ("Krüppel associated box") à la dCas9 renforce encore l'effet répresseur (Gilbert et al., 2013) de ce système appelé CRISPRi ("CRISPR interference"). A l'inverse, la fusion de la dCas9 à un facteur transactivateur, comme VP64 (un tétramère de la protéine VP16, "Herpes Simplex Viral Protein 16"), permet d'améliorer l'activité transcriptionnelle d'un enhancer (système CRISPRa, "CRISPR activation") (Perez-Pinera et al., 2013).

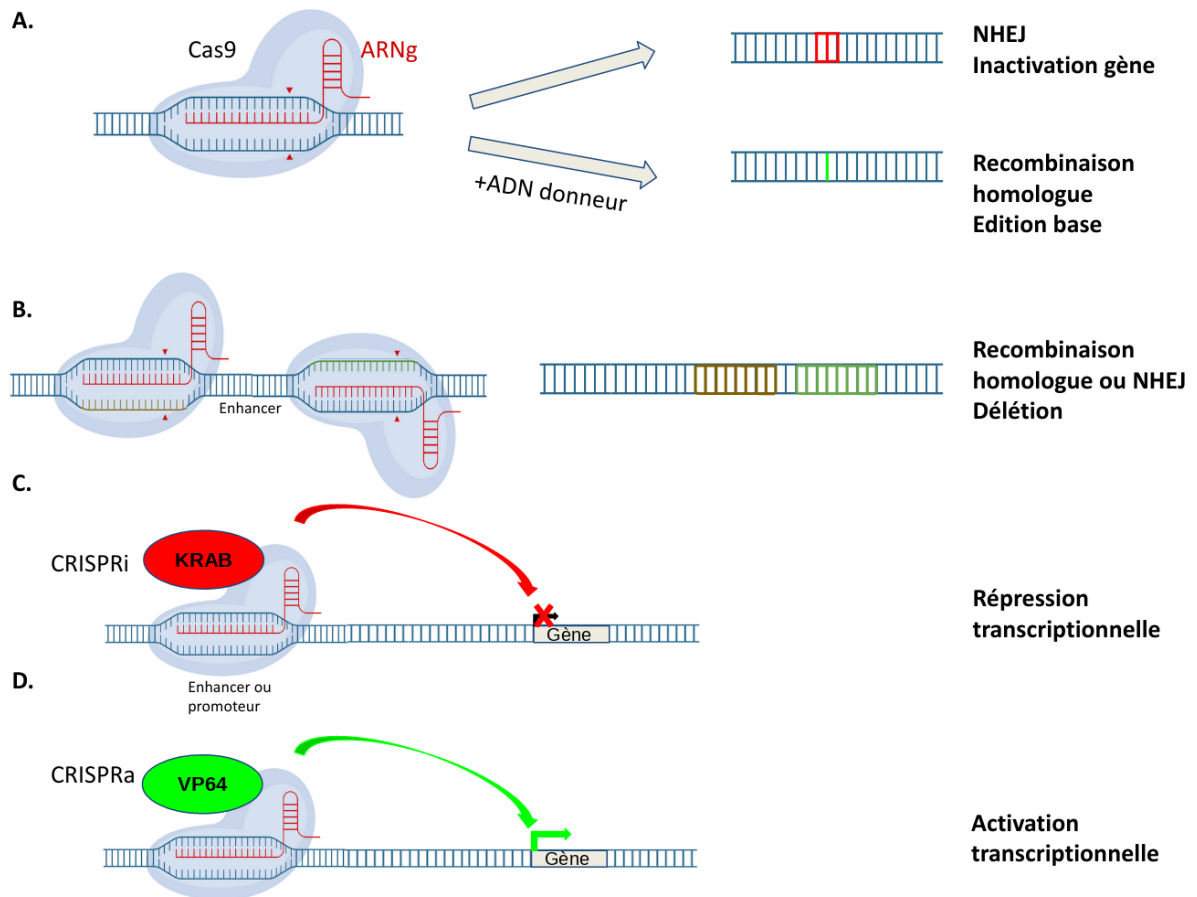


Figure 40: Principe du système CRISPR/Cas9 et utilisation pour l'étude de la régulation d'un gène **A.** Le principe général de la technologie peut être utilisé pour induire la perte de fonction d'un gène ou l'édition d'une base. La Cas9 est amenée avec un ARN guide (ARNg) afin de réaliser des cassures double brin au niveau de la séquence cible. Les mécanismes de réparation entrent en jeu afin de réparer ces cassures, par jonction d'extrémités non homologues NHEJ ou par recombinaison homologue si un ADN donneur est ajouté. **B.** Application pour la délétion d'une région. En amenant deux ARNg de part et d'autre de la région à déléter, après cassure double brin les mécanismes de réparation (principalement NHEJ) viennent rejoindre les deux extrémités de la délétion. **C.** et **D.** : principe de l'activation et l'inactivation par CRISPRi et CRISPRa. La Cas9 modifiée ayant perdu son activité endonucléase ("dead Cas9", dCas9) est couplée à un facteur répresseur (**C.**) ou transactivateur (**D.**) afin de réprimer ou d'augmenter l'activité transcriptionnelle d'un enhancer, respectivement.

2. Mise en place d'une stratégie d'étude de la régulation à distance du gène *SLC40A1*

Il existe donc plusieurs outils permettant d'identifier des séquences régulatrices et de confirmer leur effet. A la question initiale "Quels sont les éléments de régulation de mon gène d'intérêt?" suit une autre question : "Par où commencer pour identifier des régions candidates?". Une stratégie consiste en une étude fine des données déjà disponibles notamment *via* le projet ENCODE, afin d'identifier des régions dont le rôle fonctionnel pourra ensuite être confirmé par la combinaison de différentes approches, en associant la méthode de gène rapporteur, l'étude de la conformation de la chromatine et l'édition génique *via* l'utilisation du système CRISPR/Cas9 (Kim et al., 2019). C'est cette stratégie que j'ai décidé d'utiliser, et qui sera décrite pour l'étude de la régulation du gène *SLC40A1*.

2.1. Méthodes

2.1.1. Analyse des bases de données expérimentales et choix du modèle cellulaire

Dans un premier temps, l'analyse d'un ensemble de données expérimentales disponibles dans différentes bases de données a été réalisée.

Pour délimiter le TAD contenant le gène *SLC40A1*, je me suis d'abord servi des données du projet ENCODE, *via* le site <http://3dgenome.fsm.northwestern.edu>. Ce site permet, en combinant des données de Hi-C, de ChIA-PET, de ChIP-Seq, de séquençage d'ARN, de sites d'hypersensibilité à la DNase, la délimitation des TADs dans plusieurs types cellulaires pour un locus donné.

Pour identifier des régions de régulation candidates au sein du TAD, j'ai ensuite utilisé le navigateur UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) qui permet de visualiser les données de différents projets.

Tout d'abord, j'ai utilisé la base GeneHancer (Fishilevich et al., 2017). Il s'agit d'une base de données de régions de régulation, intégrant des données du projet ENCODE, la base de données "Ensembl Regulatory Build" (Zerbino et al., 2015), le projet FANTOM ("Functional Annotation of the Mammalian Genome") (Andersson et al., 2014) et la base de données VISTA Enhancer (Visel et al., 2007). Un total de 284834 éléments de régulation sont listés dans cette base, avec un score de confiance combinant les sources utilisées, la conservation de séquences entre espèces, la présence de pics de fixation de facteurs de transcription... Une association de l'élément de régulation considéré avec le gène à proximité est également calculée, à partir de données d'expression, de la distance avec le gène, de la co-expression de facteurs de transcription et de données de capture-HiC.

Afin d'affiner ma recherche d'éléments candidats, j'ai décidé d'intégrer les données du projet ENCODE spécifiques aux cellules HepG2. En effet, parmi toutes les données expérimentales disponibles, j'ai

souhaité focaliser mes analyses sur un type cellulaire impliqué dans le métabolisme du fer et exprimant la ferroportine. Mon premier choix s'est porté sur les cellules HepG2. Ces cellules sont issues d'un carcinome hépatocellulaire et sont souvent utilisées comme modèle d'étude du métabolisme du fer, notamment la surcharge en fer, la sécrétion d'hepcidine (Gehrke et al., 2003) et l'étude des gènes responsables de surcharge en fer, dont *SLC40A1* (Lymboussaki et al., 2003; Traeger et al., 2021; Zhang et al., 2022). Plusieurs équipes, dont celle dans la quelle j'ai réalisé ma thèse, ont étudié la réponse de ces cellules à une surcharge en fer (Popovic and Templeton, 2004; Jacolot et al., 2008). De plus, le gène *SLC40A1* est exprimé dans ce type cellulaire, au niveau de l'ARN, où les données disponibles (<https://www.proteinatlas.org>) placent les cellules HepG2 parmi les 10 types cellulaires exprimant le plus ce gène, ou au niveau protéique par western blot (Angmo et al., 2017). D'autres choix avaient été envisagés, comme Huh7, une autre lignée hépatocytaire, mais les données disponibles étaient beaucoup plus restreintes, ou les cellules monocytaires THP-1, précurseurs des macrophages qui ont un rôle primordial dans le métabolisme du fer, mais encore une fois les données disponibles étaient plus limitées.

Les critères que j'ai retenus sont :

- La présence de pics d'hypersensibilité à la DNase I
- La présence de pics d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac), marque d'euchromatine
- La présence de pics de fixation de facteurs de transcription
- La prédiction de l'état fonctionnel de la chromatine selon ChromHMM

ChromHMM est un algorithme permettant la description de l'état fonctionnel de la chromatine. A partir de données de modifications de la chromatine, issues notamment du Roadmap Epigenomics Consortium (Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015), l'algorithme en déduit grâce à une approche par un modèle de Markov caché l'état de la chromatine et attribue une fonction aux différentes régions (promoteur, insulateur, enhancer..).

Dans une dernière étape, j'ai ajouté les données de conservation de séquence disponibles par l'outil ECRbrowser (<https://ecrbrowser.dcode.org/>) (Ovcharenko et al., 2004). A partir d'une région génomique, l'outil permet de visualiser les régions conservées entre plusieurs espèces, allant du poisson à l'homme, en passant par l'opossum et la souris.

Malgré une redondance entre certaines données, ces approches se voulaient complémentaires. J'ai choisi d'interroger un maximum d'outils afin de sélectionner les régions qui regroupaient le plus d'évidences fonctionnelles.

2.1.2. Tests luciférase

a. Préparation des plasmides

A partir de la construction pGL3_proSLC40A1, qui contient le gène codant la “firefly” luciférase sous le contrôle du promoteur minimal de *SLC40A1* (chr2:190445239-190446246, GRCh37), nous avons fait construire les plasmides contenant nos régions candidates par la société CodexDNA®, qui utilise la technologie d’assemblage de Gibson (Gibson et al., 2009). Cette technologie permet l’assemblage de séquences d’ADN en une seule réaction isothermique grâce à l’utilisation d’une exonucléase et une Phusion DNA polymerase.

Des constructions ont ensuite été réalisées manuellement, afin d’inverser l’orientation des séquences candidates, ou de combiner plusieurs séquences au sein du même plasmide. Les séquences des régions à insérer ont été amplifiées à partir des plasmides existants (PrimeSTAR GXL, Takara Bio) avec des amorces contenant une queue spécifique du plasmide receveur, au niveau du site BamHI (pour l’inversion des régions) ou Sall (pour la combinaison de deux régions) (Annexe 1), afin de permettre le clonage (kit In Fusion HD cloning, Takara Bio). Après transformation bactérienne, les plasmides ont été extraits (kit NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA, Macherey-Nagel), vérifiés après restriction enzymatique sur gel d’agarose, et séquencés par méthode Sanger (BigDye™ Terminator v1.1 cycle sequencing, Applied Biosystem) sur un automate Applied Biosystems 3500.

b. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HepG2 (ATCC) ont été maintenues à 37°C en atmosphère humide et à 5% de CO_2 . Pour les tests luciférase, les cellules HepG2 ont été mises en culture en plaques 6 puits à $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits, transfectées 24 heures après avec les plasmides pGL3-basic, pGL3_proSLC40A1 ou les constructions comportant les différents éléments de régulation, ainsi que le plasmide pSV- β -galactosidase. Ce dernier permet de normaliser la transfection entre les différentes conditions. Les cellules ont ensuite été maintenues en culture 48 heures, lysées (Passive Lysis 5X Buffer, Promega), puis les lysats ont été centrifugés 5 minutes à 10000 g et 4°C, et les surnageants récupérés.

c. Révélation et tests statistiques

A partir des surnageants récupérés, 20 μ l ont été distribués en plaque 96 puits opaques blanches (ThermoFisher Scientific), et l’activité luciférase a été mesurée grâce au substrat de la firefly luciférase (Luciferase Assay System, Promega) sur le lecteur de plaques Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific). 25 μ l ont également été distribués en plaques 96 puits transparentes, avec ajout de 25 μ l de 2X assay buffer (Beta-Galactosidase Enzyme Assay System, Promega), puis incubés à 37°C pendant 30 minutes avant lecture d’absorbance à 420 nm sur le Varioskan Flash. Chaque condition a été réalisée en triplicat pour chaque expérimentation. Les résultats de luciférase ont ensuite été rapportés pour chaque condition au dosage de β -galactosidase. Pour les représentations graphiques et les statistiques, les moyennes de chaque triplicat ont été rapportées aux moyennes pour la condition pGL3-basic (dans

les expériences visant à comparer les différentes constructions de promoteur) ou pGL3_proSLC40A1 (pour la comparaison des différentes régions candidates). Le test t de Student apparié a été utilisé pour les statistiques.

2.1.3. Edition génique : CRISPR/Cas9

Afin de confirmer l'effet des éléments potentiellement régulateurs du gène *SLC40A1*, j'ai souhaité réaliser la délétion de ces éléments dans les cellules HepG2.

J'ai développé simultanément plusieurs approches : une stratégie en "bulk" et une stratégie d'isolation clonale. J'ai fait le choix du plasmide PX458 (Addgene #48138), contenant le promoteur U6, en amont de l'emplacement de l'ARN guide, et le promoteur SV40 en amont du gène codant la Cas9, qui est couplée à la GFP. Ceci nous a permis de vérifier l'efficacité de transfection mais également une possible sélection des cellules transfectées par FACS ("Fluorescent Activated Cell Sorting"). Ce plasmide étant à l'origine prévu pour y intégrer un seul ARN guide, il a été modifié afin de permettre la production de deux ARNg à partir d'un seul plasmide.

a. Sélection des ARNg et préparation des plasmides

Les ARNg ont été choisis à l'aide de l'outil CRISPOR (Concordet and Haeussler, 2018; Liu et al., 2020), en fonction de leur efficacité prédite, de leurs scores de spécificité MIT et CFD (Hsu et al., 2013; Doench et al., 2016) et du nombre de coupures "off-target" (coupures à d'autres localisations sur le génome). A partir de deux ARNg en 5' de la région candidate et deux en 3', les quatre combinaisons possibles de couple d'ARNg ont été sélectionnées. Des fragments d'ADN contenant ces couples d'ARNg avec un promoteur U6 entre le premier et le deuxième ARNg, ont été synthétisés et insérés par la société GenScript® (Annexe 2). Les plasmides ainsi produits ont ensuite été amplifiés par transformation bactérienne, extraits et contrôlés par séquençage Sanger et dépôt sur gel d'agarose.

b. Culture cellulaire et transfection

Les expériences de CRISPR/Cas9 ont été réalisées dans la lignée cellulaire HepG2. Une particularité de cette lignée cellulaire est qu'elle contient trois copies du gène *SLC40A1*, car la cellule porte une trisomie 2 (Zhou et al., 2019). Cette particularité sera à prendre en compte pour la suite de l'expérience. $2,5 \times 10^5$ cellules HepG2 ont été mises en plaque 6 puits. Les transfections ont été réalisées 24 heures après la mise en plaque avec l'agent de transfection Transit 2020 reagent (Mirus) et 3 µg de construction (vide, PX458 seul ou PX458-ARNg). 48 heures après transfection, deux stratégies ont été testées (Figure 41) :

1. une stratégie en "bulk" : les extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées sur l'ensemble des cellules, sans sélection (Cassinari et al., 2020).

-
2. une stratégie d'isolation clonale : les cellules transfectées triées, sur la base de l'expression de la GFP, par cytométrie en flux grâce au trieur de cellules CytoFLEX (Beckman, disponible *via* la plateforme Hyperion à Brest) sont récupérées à raison d'une cellule par puits d'une plaque 96 puits en présence de milieu de culture. Les cultures ont ensuite incubées à 37°C en atmosphère humidifiées à 5% de CO_2 jusqu'à obtention de colonies de cellules, puis transférées en plaques 24 puits.

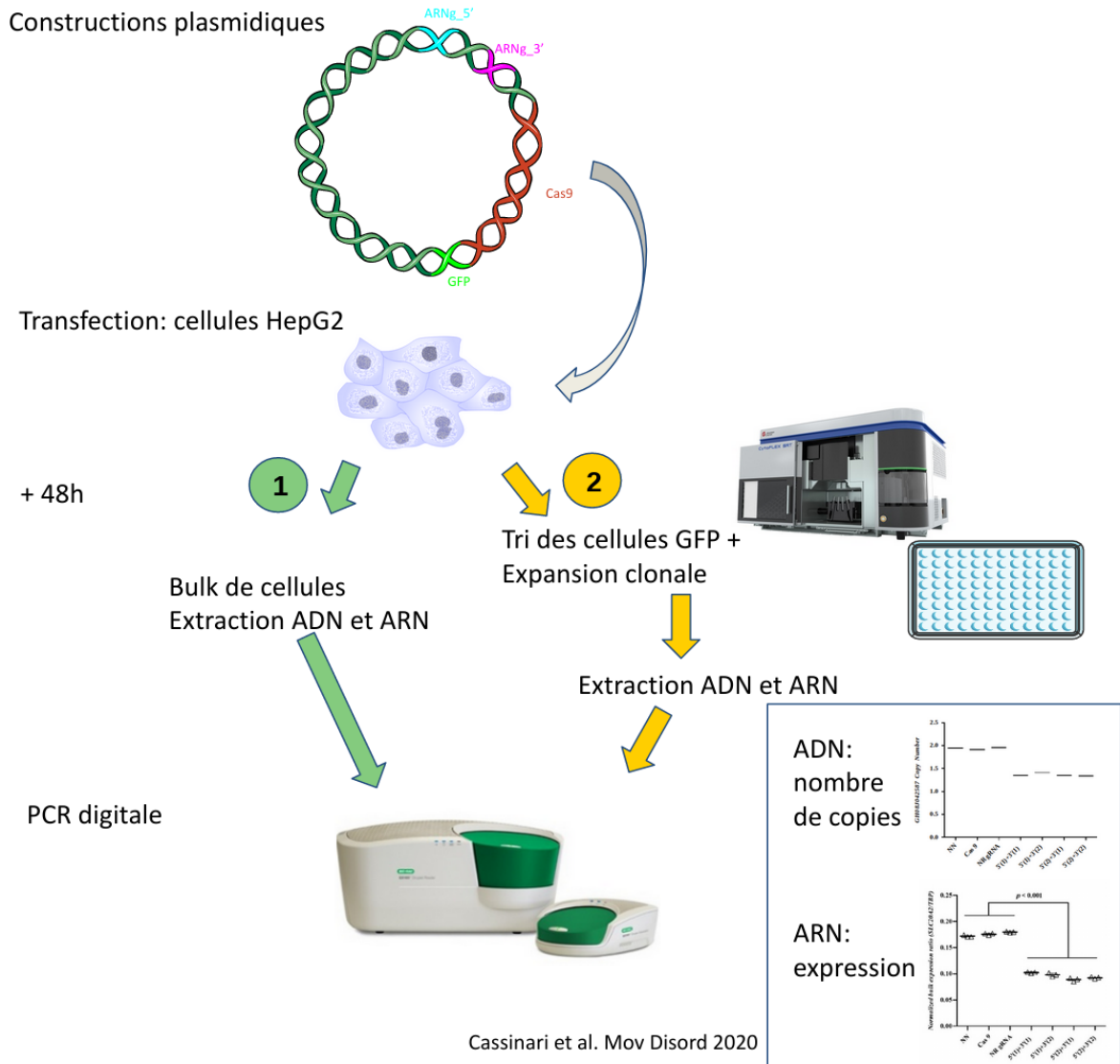


Figure 41: Protocole de délétion des éléments de régulation par stratégie CRISPR/Cas9. Les plasmides contenant chacun un couple d'ARN guides sont transfectés dans les cellules HepG2 pendant 48h. Une première stratégie vise à étudier un pool cellulaire (“bulk”), l’autre d’isoler les cellules GFP positives en plaques 96 puits pour réaliser une expansion clonale. Les clones sont ensuite caractérisés par PCR afin de rechercher l’événement de délétion. Les clones positifs de la stratégie 2 ou les pools pour la stratégie 1 sont ensuite mis en culture pour extraction d’ADN et d’ARN et analyse en PCR digitale du nombre de copies de la région visée et de l’expression de *SLC40A1*.

d. Extraction d’ADN et d’ARN

A partir du “bulk” de cellules, ou des clones isolés, une extraction d’ADN a été réalisée (QuickGene DNA

whole blood kit, Fujifilm Wako) sur l'automate QuickGene-610L (Fujifilm Wako), et l'ARN total a été extrait (NucleoSpin RNA, Mini, Macherey-Nagel). Après dosage par spectrophotométrie sur l'automate DeNovix DS-11 (Denovix), l'ADN complémentaire a été produit à partir d'1 μ g d'ARN total (Transcriptase inverse SuperScript™ III, ThermoFisher Scientific).

e. Analyse par PCR digitale

J'ai fait le choix de la PCR digitale pour l'analyse du nombre de copies de notre région de régulation après transfection avec les différentes constructions, mais également pour une quantification absolue de l'ARN du gène *SLC40A1*. En effet, cette technologie, qui permet d'isoler une molécule d'ADN dans une gouttelette et d'y réaliser une réaction de PCR, a montré son intérêt tant pour l'analyse du nombre de copies d'une région (Härmälä et al., 2017; Cassinari et al., 2019) que pour la quantification absolue d'ARN et donc le niveau d'expression d'un gène (Kuhlmann et al., 2021).

Le principe de la PCR digitale en gouttelette ("digital droplet PCR", ddPCR) est le partitionnement des molécules d'ADN dans des gouttelettes grâce à une dilution limite de l'échantillon afin qu'une gouttelette contienne au plus une molécule d'ADN, en suivant la loi de Poisson (Vogelstein and Kinzler, 1999). Une réaction de PCR est réalisée simultanément dans chaque gouttelette, et par utilisation de sondes couplées à un fluorochrome, la lecture permet de détecter les gouttelettes positives et négatives. Cette technique est particulièrement sensible et intéressante pour la détection d'événements rares, elle a pu faire ses preuves notamment pour la recherche d'ADN libre circulant (tumoral ou foetal) (Diaz and Bardelli, 2014; El Khattabi et al., 2016).

Pour notre projet, il fallait mettre au point deux analyses par ddPCR :

- une analyse du nombre de copies de notre région de régulation
- une quantification de l'ARN du gène *SLC40A1*

Dans les deux cas, j'ai utilisé, pour la détection de nos produits d'amplification, une librairie de sondes d'hydrolyse universelles ("Universal Probe Library", UPL, Roche). Il s'agit de sondes contenant des acides nucléiques modifiés ("Locked Nucleic Acid", LNA), ayant une plus grande capacité de fixation que les acides nucléiques classiques, permettant une stabilité de fixation au cours des réactions de PCR (Owczarzy et al., 2011). Les sondes sont également couplées à un fluorochrome en 5', la fluorescéine (FAM) et un quencher en 3'. Ces sondes de huit à neuf nucléotides sont réparties le long du génome, avec une distance entre deux sondes comprises sur chaque chromosome entre 110 et 220 pb (Cassinari et al., 2019), facilitant leur choix pour les réactions de PCR.

Le choix des amorces de ddPCR a été fait grâce à un outil en ligne (<https://primers.neoformit.com/>), permettant, à partir d'une séquence génomique donnée, de trouver les amorces entourant une sonde UPL, avec les paramètres par défaut (taille d'amorce entre 18 et 27 nucléotides, une taille d'amplicon entre 60 et 80 nucléotides, une température d'hybridation entre 59 et 61°C).

Pour l'analyse du nombre de copies de la région de régulation, nous avons besoin d'utiliser un gène contrôle, qui permet de normaliser le nombres de copies. J'ai choisi le gène *HMBS* déjà utilisé par une équipe ayant décrit l'application de la PCR digitale à l'étude du nombre de copies d'ADN (Cassinari et al., 2019), qui est présent en deux copies dans les cellules HepG2 (Zhou et al., 2019). Les amorces utilisées sont listées dans l'annexe 3. Ainsi, par ddPCR, nous devrions voir, dans une condition non traitée, trois copies de nos régions de régulation.

Pour la quantification d'ARN, les amorces ont été choisies à partir de la séquence de l'ADN complémentaire afin de générer un amplicon à cheval entre deux exons, permettant de distinguer le cas échéant l'ADN complémentaire de l'ADN génomique résiduel.

2.1.4. Séquençage des régions candidates sur la cohorte EMSAI

Notre objectif était également d'identifier des variants génétiques dans les régions de régulation confirmées chez des patients présentant une surcharge en fer. Nous avons utilisé la cohorte EMSAI (« Enquête Multicentrique sur les patients admis dans un protocole de SAignées Itératives à l'établissement français du sang »), qui a été constituée par le Pr Gérald Le Gac dans le cadre d'un protocole de recherche multicentrique regroupant 25 établissements de transfusion sanguine. Un total de 1059 patients traités par saignées itératives ont été recrutés entre 2012 et 2015. 258 de ces 1059 patients avaient une hémochromatose de type 1, confirmée par la détection du génotype *HFE* p.[Cys282Tyr];[Cys282Tyr]. Des causes secondaires de surcharge en fer ou d'hyperferritinémie ont été identifiées chez 507 autres patients, principalement une obésité associée ou non à un syndrome métabolique et une consommation excessive d'alcool (Le Gac et al., 2022). Aucune cause évidente de surcharge en fer n'avait, en revanche, été identifiée chez 204 patients, séparés en deux phénotypes distincts : hyperferritinémie isolée (valeurs de ferritine sérique au moins deux fois supérieures aux valeurs normales en tenant compte du sexe ; N= 173), et hyperferritinémie associée à une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine (supérieur ou égal à 50% pour une femme, 60% pour un homme ; N=31).

Nous avons mis en place une stratégie de séquençage haut débit par la technologie Fluidigm et le séquenceur PGM (Personal Genome Machine, Ion Torrent, ThermoFisher Scientific) (Figure 42). La technologie Fluidigm, notamment le système Access Array, permet grâce à la microfluidique de combiner aisément un grand nombre d'ADN de patients avec des amorces d'amplification. Les amorces sont choisies pour réaliser l'amplification de fragments de 150 paires de bases (Annexe 4). L'automate génère les mix ADN-amorces, et les ADN sont amplifiés par PCR. Les bibliothèques ainsi produites sont ensuite chargées sur une puce pour un séquençage sur le PGM.

Les données brutes de séquençage ont été analysées en utilisant une série de manipulations informatiques. Des fichiers fastq ont d'abord été générés pour permettre un alignement sur

le génome de référence à l'aide de l'algorithme TMAP ("Torrent Mapping Alignment Program", <https://github.com/iontorrent/TS>). Les variants de séquence ont été appelés à l'aide de l'algorithme TVC ("Torrent Variant Caller", <https://github.com/iontorrent/Torrent-Variant-Caller-stable>). Les fichiers vcf ("variant call format") ont finalement été associés ("poolés") afin de générer un fichier unique contenant tous les variants (pour l'ensemble des patients).

Les variants ont été annotés à l'aide de l'outil VEP ("Variant Effect Predictor", <https://www.ensembl.org/>) avant d'être analysés à l'aide du logiciel "Cutevariant", développé en interne par le Dr. Sacha Schutz (Schutz et al., 2022). Ce logiciel permet de filtrer les variations en fonction de différents paramètres (génotype, qualité...) et de les présenter sous une forme annotée. Etant donnée la localisation des régions séquencées (introniques profondes ou intergéniques), la majorité des annotations et prédictions, qui se focalisent sur l'impact des variations codantes ou d'épissage, étaient très peu informatives. J'ai choisi d'appliquer un filtre sur la fréquence en population générale (<1% toutes populations confondues dans la base de données gnomAD), et d'annoter ensuite les variants grâce à la base de données RegulomeDB (Boyle et al., 2012) (<https://regulomedb.org/regulome-search>). Cette base permet de colliger et visualiser des informations sur des variants (s'ils sont présents dans la base de données dbSNP), ou des positions génomiques, comme notamment la présence de motifs de régulation connus ou prédits (croisement des données du projet GEO, d'ENCODE, et de la littérature). Un score est donné pour chaque position (Dong and Boyle, 2019), tenant compte de la localisation du variant dans un site d'hypersensibilité à la DNase, de motifs de fixation de facteurs de transcription et des données d'expression différentielle éventuellement disponibles pour le variant dans la base de données eQTL (Vösa et al., 2021) (<https://eqtlgen.org/>). Un score proche de 1 signifie une forte probabilité que la position considérée soit importante pour la reconnaissance d'un élément de régulation transcriptionnelle.

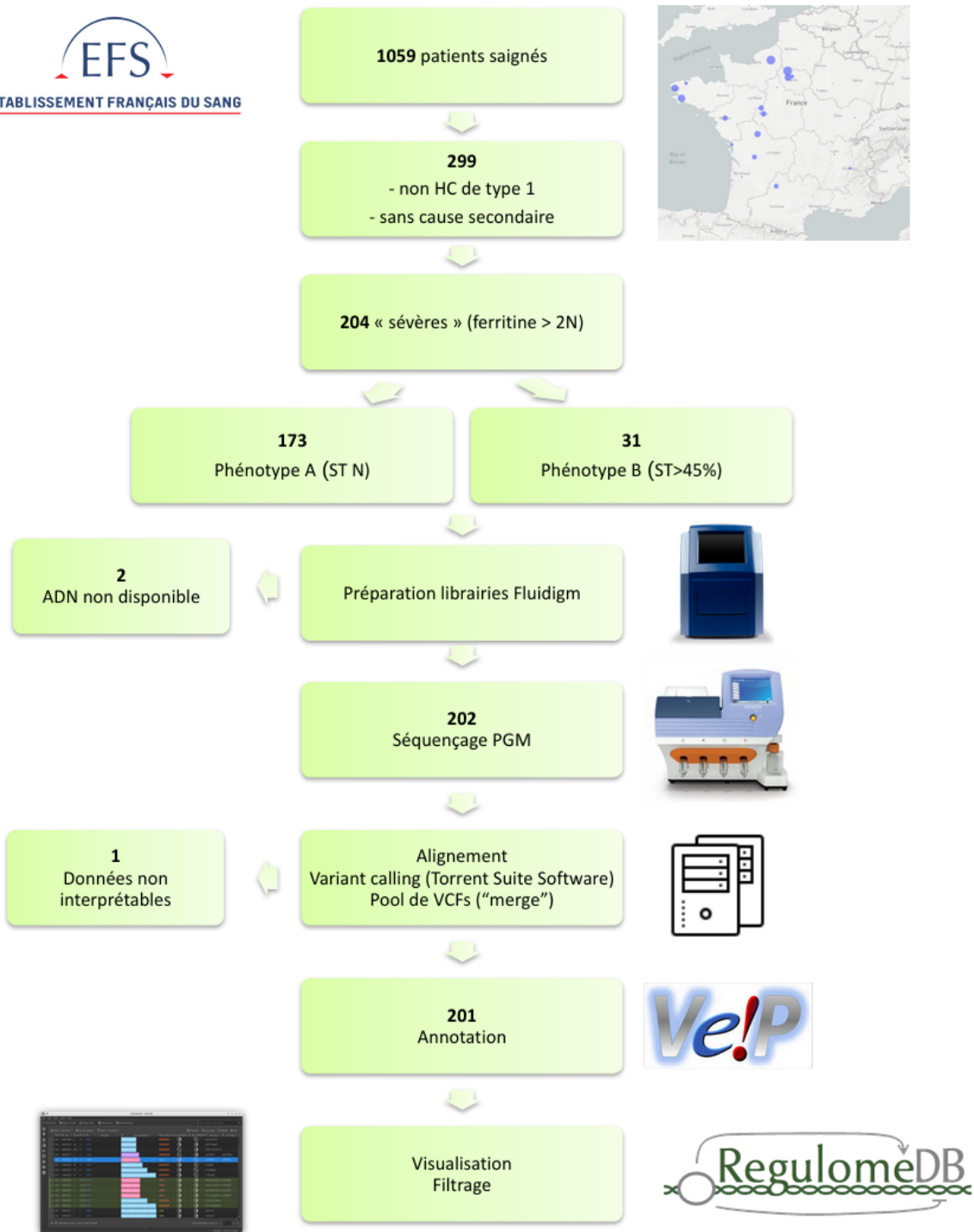


Figure 42: Séquençage des régions de régulation sur la cohorte EMSAI. Le séquençage a été effectué à partir d’une sélection de 204 patients issus de la cohorte EMSAI. L’analyse bioinformatique (alignement, “variant calling”) est réalisée par la suite Ion Torrent. L’annotation est réalisée par VEP et l’analyse finale grâce au logiciel “Cutevariant”. Les variants rares ont été analysés en utilisant différentes données fonctionnelles documentées dans la base de données RegulomeDB. ST= coefficient de saturation de la transferrine.

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

2.2. Résultats

2.2.1 Sélection des régions candidates à partir des bases de données expérimentales

Dans un premier temps, il fallait définir les frontières du TAD contenant le gène *SLC40A1*. A partir des données de HiC du projet ENCODE disponibles en ligne (<http://3dgenome.fsm.northwestern.edu>), le TAD englobant le gène *SLC40A1* s'étendrait sur une région de 200 Kb (chr2:190304726-190504726, GRCh37) (Figure 43).

A partir de cette région, j'ai recherché la présence de régions de régulation potentielles. Toujours grâce aux données du projet ENCODE disponible sur UCSC, j'ai étudié :

- La présence de pics d'hypersensibilité à la DNase
- La présence de pics d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac)
- La présence de pics de fixation de facteurs de transcription
- La prédiction de régions de régulation selon GeneHancer
- la prédiction de l'ouverture de la chromatine selon ChromHMM
- Les données de conservation de séquences à partir de l'outil ECRbrowser (<https://ecrbrowser.dcode.org/>)

Ce travail a permis de sélectionner huit régions de régulation candidates, résumées dans la figure 43 ainsi que dans le tableau 4.

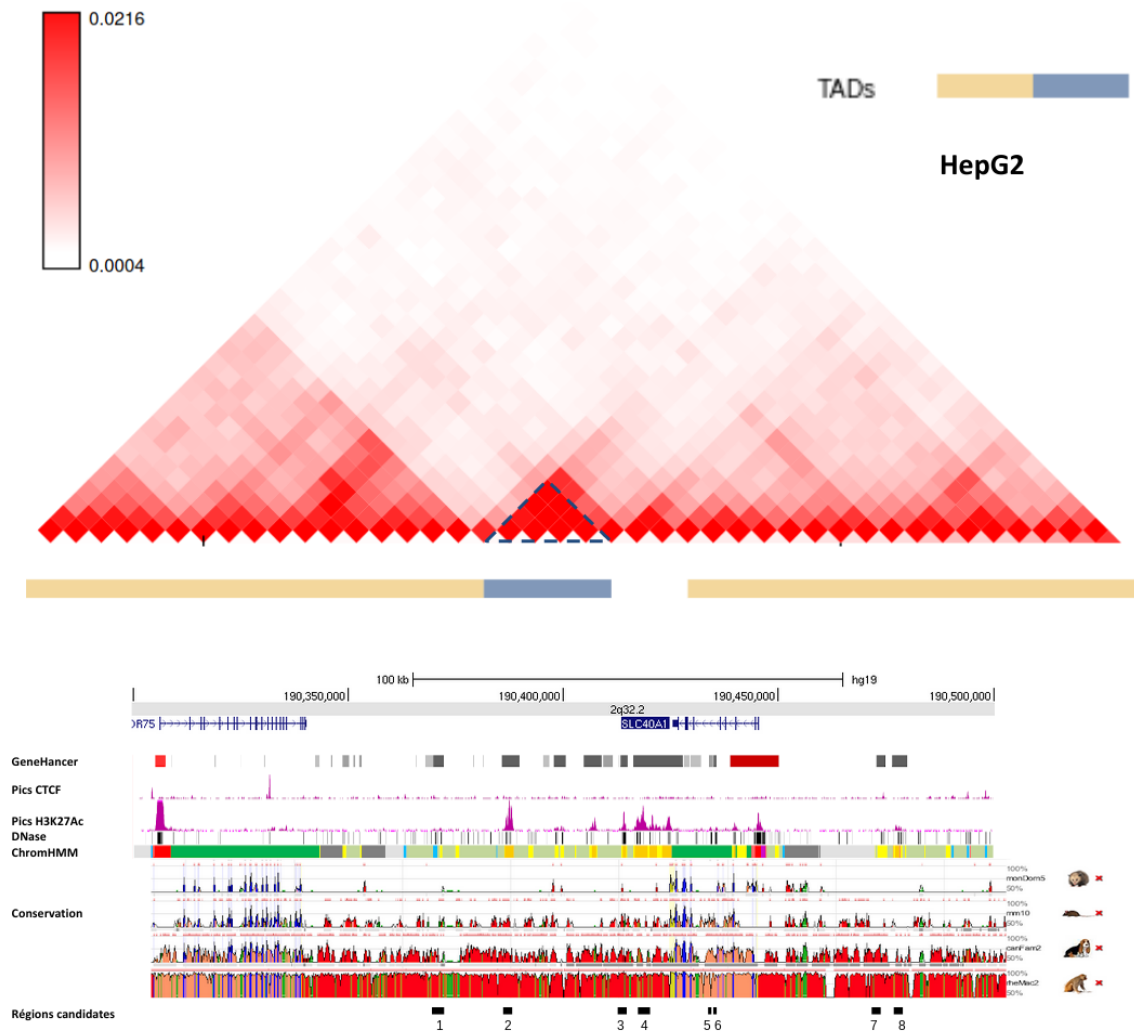


Figure 43: Représentation du TAD contenant le gène *SLC40A1* et des données utilisées pour la détermination des séquences candidates, visualisées *via* le navigateur UCSC. Le TAD de 200Kb contient deux gènes, *WDR75* (“WD repeat-containing protein 75”, impliqué dans l’assemblage du ribosome) et *SLC40A1*. Les régions prédites par GeneHancer sont affinées en se focalisant sur les données, pour les cellules HepG2, d’acétylation de la lysine 27 de l’histone H3 (H3K27Ac), d’hypersensibilité à la DNase, ou d’ouverture de la chromatine par ChromHMM. Les données de conservation de séquence de la souris au primate sont représentées. Les régions candidates sélectionnées sont représentées par les rectangles noirs en bas, numérotés de 1 à 8.

Région candidate	Localisation (GRCh37)
1	chr2:190371055-190371855
2	chr2:190386554-190387971
3	chr2:190413653-190414655
4	chr2:190417484-190418813
5	chr2:190434121-190434752
6	chr2:190435150-190435997
7	chr2:190473362-190475046
8	chr2:190477015-190478511

Tableau 4. Coordonnées des différentes régions de régulation candidates du gène *SLC40A1*.

2.2.2 Analyse de l'effet des régions candidates sur le promoteur de *SLC40A1* par tests luciférase

Des cellules HepG2 ont été mises en culture en plaques six puits (chaque condition en triplicat) avant d'être co-transfectées avec le plasmide pGL3_proSLC40A1, permettant de détecter une activité promotrice minimale, ou une construction pGL3_proSLC40A1_Enh, contenant l'une ou l'autre des huit régions régulatrices candidates, ainsi que le plasmide pSV- β -galactosidase (pour normalisation des transfections et des valeurs de luciférase). Les résultats présentés en figure 44 suggèrent que, dans le modèle utilisé, les régions candidates 2, 3, 4 et 8 régulent de manière positive l'activité du promoteur du gène *SLC40A1* ; les effets les plus marquant étant observés avec les régions 3 et 8 (valeurs de luciférase augmentées d'un facteur quatre à cinq). La région candidate 5 n'a pas d'effet, alors que les régions 1, 6 et 7 sont associées à un effet négatif.

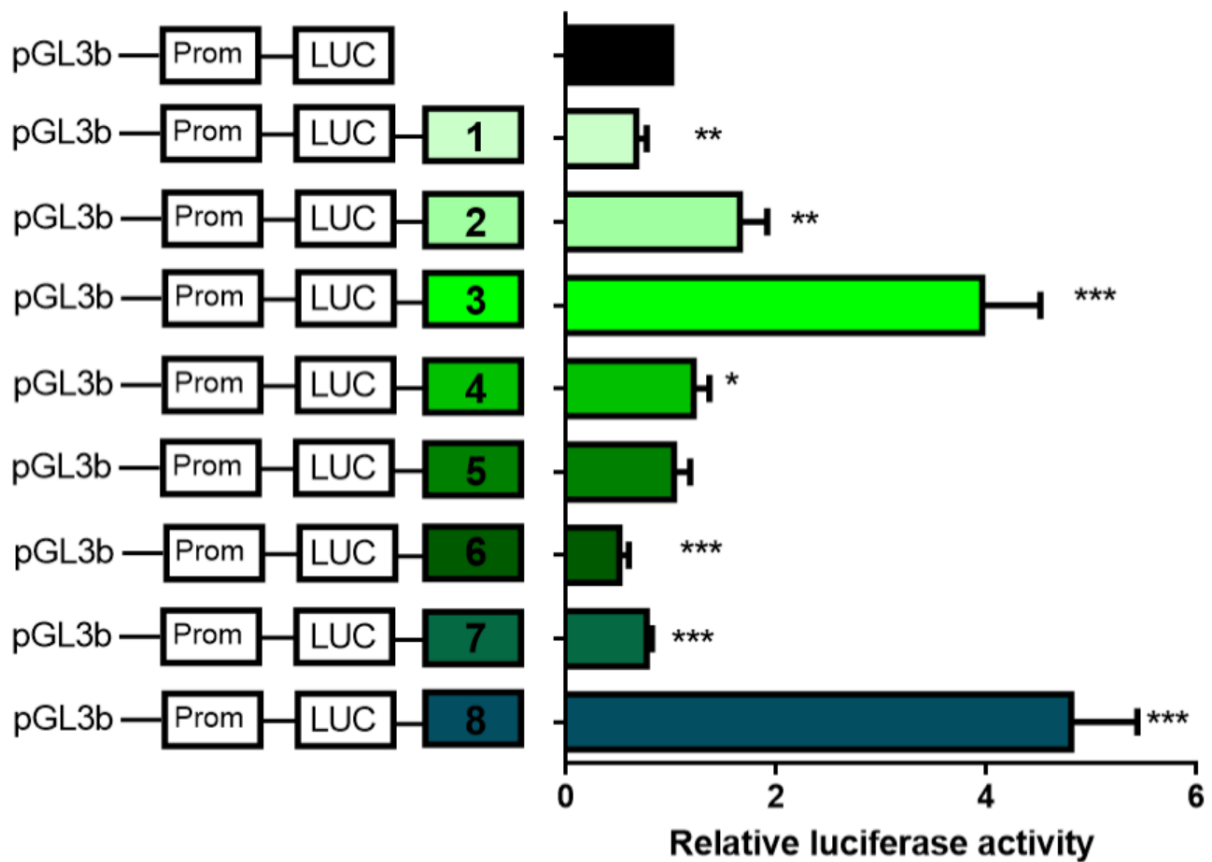


Figure 44: Résultats des tests luciférase comparant les différentes régions candidates (N=5) Les valeurs de luminescence sont rapportées aux valeurs de -galactosidase pour normalisation, et la moyenne de chaque triplicat est rapportée à la moyenne de la condition basale, associée à l'activité de la construction pGL3_proSLC40A1. Le graphique montre les résultats de cinq expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Les effets positifs observés pour les régions candidates 2, 4, 5 et 8 ont été confirmés à partir de constructions plasmidiques où chacune des séquences considérées a été clonée dans l'orientation opposée (Figure 45).

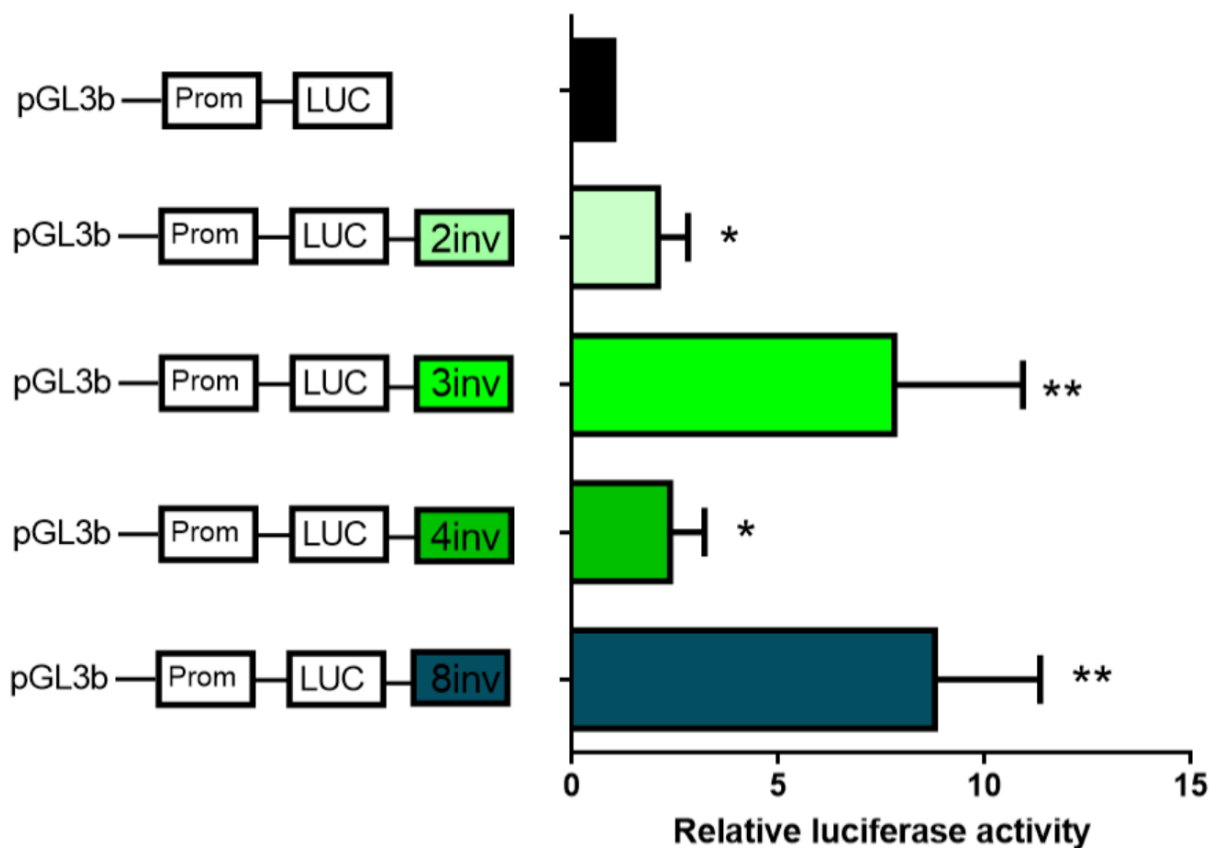


Figure 45: Résultats des tests luciférase comparant les enhancers potentiels, avec une orientation inversée dans la construction plasmidique (N=5). Les valeurs de luminescence sont rapportées aux valeurs de β -galactosidase pour normalisation, et la moyenne de chaque triplicat est rapportée à la moyenne de la condition condition basale, associée à l'activité de la construction pGL3_proSLC40A1. Le graphe montre les résultats de cinq expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

J'ai également souhaité étudier la possibilité d'effets coopératifs entre les différentes régions candidates. J'ai créé plusieurs combinaisons à partir des enhancers potentiels. Comme montré dans la figure 46, la combinaison des régions 3 et 8 montre un effet synergique, avec une augmentation d'un facteur 15,4 des valeurs de luciférase, contre 4,3 et 4,6 pour les régions 3 et 8 seules, respectivement. De même, la région 2 semble agir en coopération avec la région 3, où l'on passe d'une augmentation d'un facteur 1,8 pour la région 2 et 4,36 pour la région 3 à un facteur 9,9 en combinaison. La région 4 seule avait un effet très modeste, mais significatif, sur l'activité luciférase. Lorsqu'elle est combinée à la région 2 et 8, il n'y a pas d'effet significatif sur l'activité de ces deux régions, et lorsqu'elle est combinée à la région 3, il existe un effet mais qui reste modeste (augmentation d'un facteur 6,6 en combinaison contre un facteur 4,4 pour la région 3 seule). Tout en restant prudents sur l'interprétation

de ces résultats, avec une variabilité parfois importante pour certaines combinaisons, nous pouvons suggérer que les régions 2, 3 et 8 agissent en coopération, et que l'effet de la région 4 n'est pas franc et ne se limiterait qu'à la région 3.

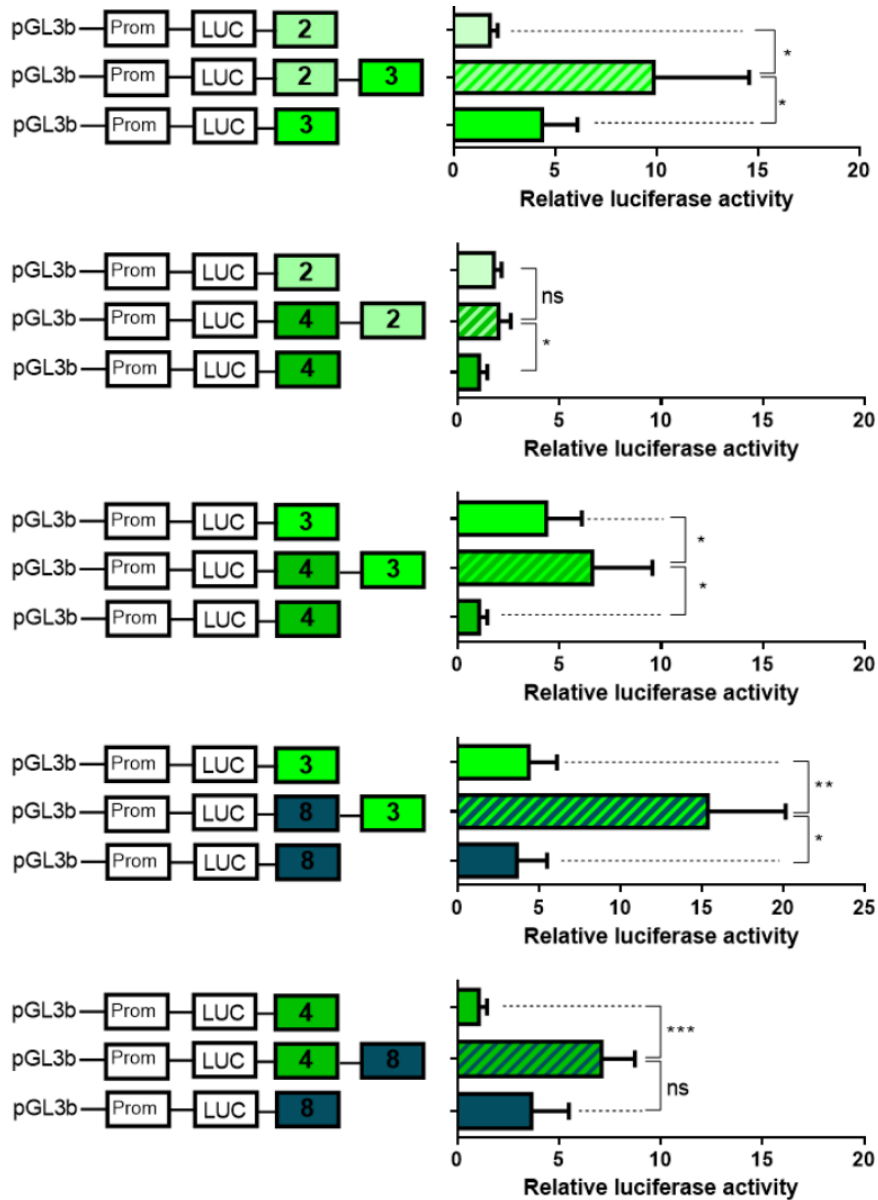


Figure 46: La combinaison des enhanceurs potentiels entraîne un effet coopératif (N=5) Les valeurs de luminescence sont rapportées aux valeurs de β -galactosidase pour normalisation, et la moyenne de chaque triplicat est rapportée à la moyenne de la condition basale, associée à l'activité de la construction pGL3_proSLC40A1. Les graphes montrent les résultats de cinq expériences indépendantes. ns= non significatif. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

L'ensemble de ces résultats m'ont conduit à focaliser mon attention sur les régions régulatrices candidates 2, 3 et 8. Cela, malgré les résultats qui suivent qui montrent que les effets observés à partir des cellules HepG2 n'ont pas été confirmés à partir de la lignée hépatique Huh7 (Figure 47). Ces différences soulèvent la question d'un possible biais dans l'identification de séquences de régulation avec des analyses *in silico* entièrement réalisées à partir de données produites avec les cellules HepG2. Cela reviendrait à dire que les éléments de régulation identifiés à partir d'un type cellulaire ne sont pas forcément transposables à un autre modèle. Au sein d'un même TAD et à partir de lignées différentes, l'organisation de la chromatine ne serait ainsi pas la même.

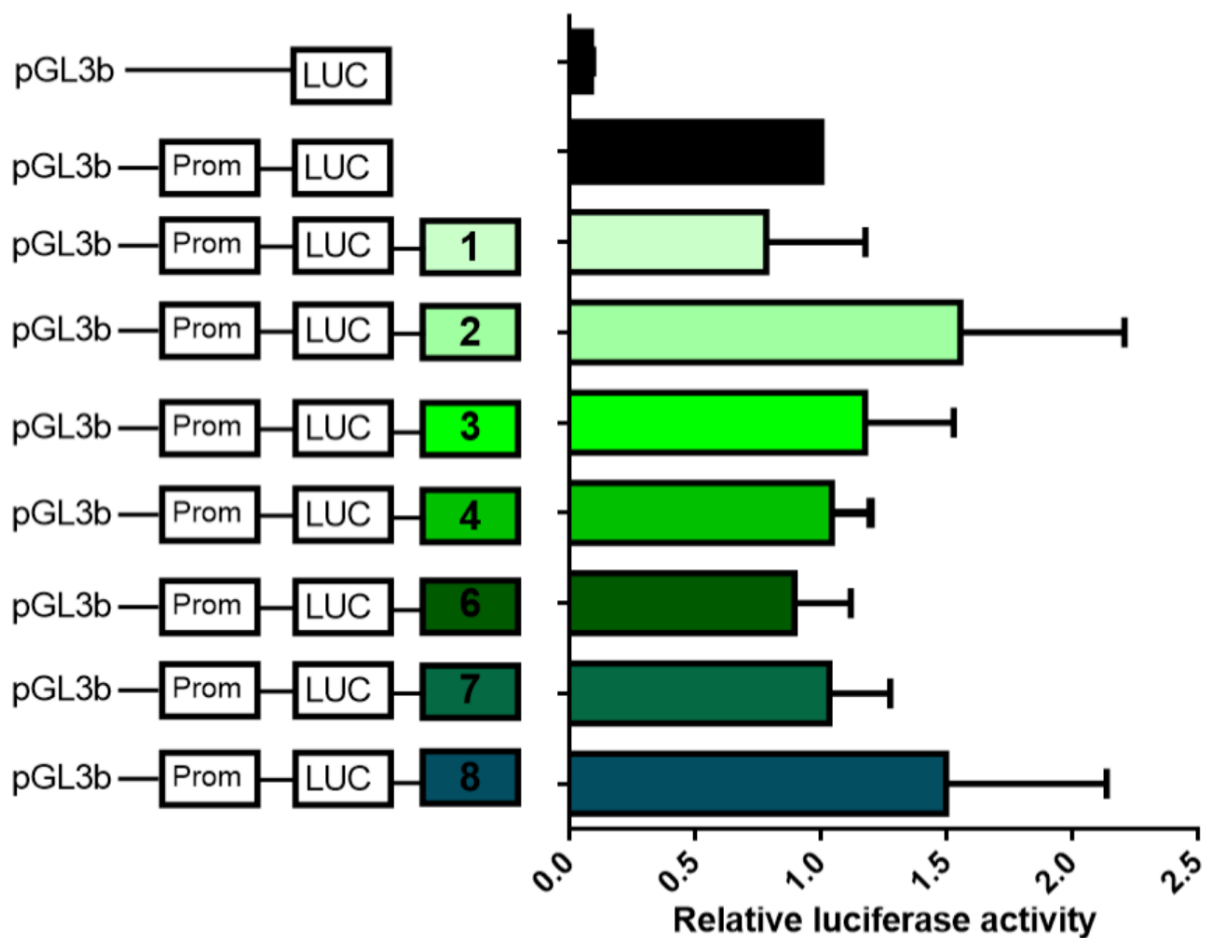


Figure 47: Les régions de régulation montrant un effet enhanceur ou silencer dans les cellules HepG2 n'ont pas d'effet drastique dans les cellules Huh7 (N=5). Les valeurs de luminescence sont rapportées aux valeurs de β -galactosidase pour normalisation, et la moyenne de chaque triplicat est rapportée à la moyenne de la condition basale, associée à l'activité de la construction pGL3_proSLC40A1. Le graphe montre les résultats de cinq expériences indépendantes.

2.2.3 Délétion des régions de régulation par technologie CRISPR/cas9

Compte-tenu du temps dont je disposais encore avant la fin de ma thèse, je n'ai réalisé qu'une seule tentative d'invalidation d'une région régulatrice potentielle de l'activité du promoteur du gène *SLC40A1* : la région 3. Les autres régions d'intérêts seront testées plus tard, en tenant compte de la validation ou non des différentes méthodologies développées.

Ici, j'ai entrepris de tester une approche « bulk », visant à vérifier l'obtention d'une délétion au niveau de l'ADN et d'une différence d'expression au niveau ARN à partir d'un pool de cellules transfectées avec un vecteur apportant la Cas9 et deux ARN guides, en plus d'une stratégie plus conventionnelle consistant à sélectionner les cellules effectivement (réellement) transfectées (grâce à l'expression d'une protéine GFP produite à partir du même plasmide), avant dilution limite et expansion clonale.

a. Validation des conditions d'analyses par PCR digitale

J'ai extrait l'ADN et l'ARN de cellules HepG2 (non transfectées) afin de quantifier le nombre de copies de la région de régulation 3 (nombre de copies attendu : 3) et de calibrer son niveau d'expression par une approche de PCR digitale.

La figure 48 confirme l'existence de 3 copies de la région 3, au regard du gène *HMBS* (2 copies).

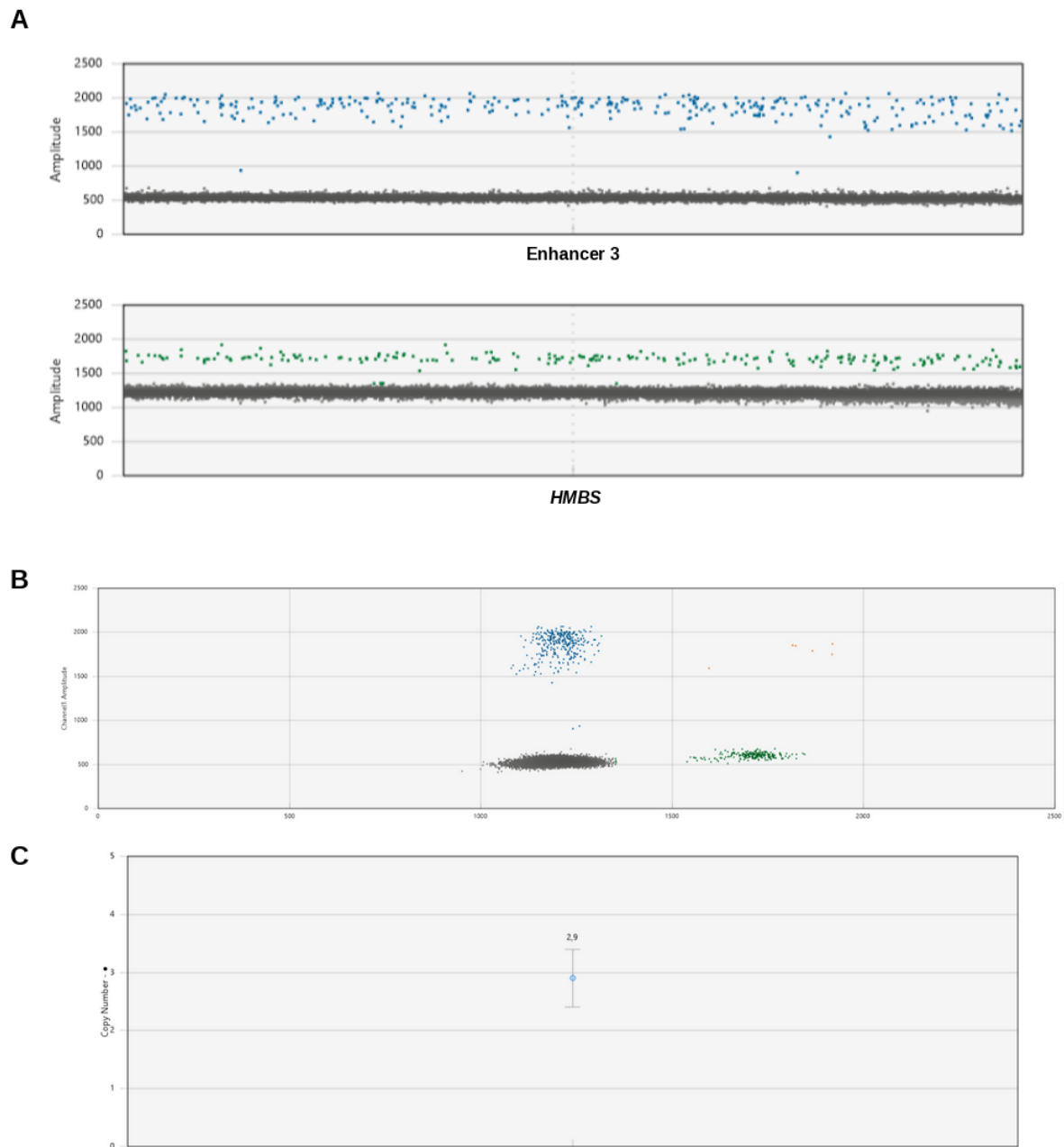
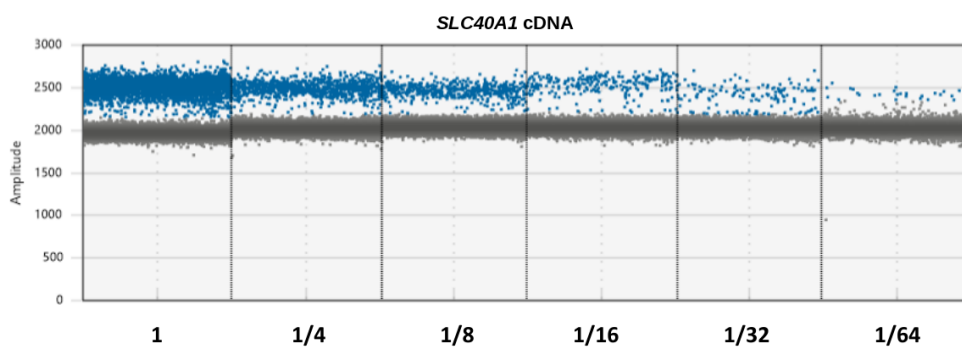


Figure 48: Étude par PCR digitale du nombre de copies de la région de régulation cible dans les cellules HepG2, à l'aide du logiciel Quantasoft Analysis Pro (BioRad). **A.** Le nombre de gouttelettes positives dans le premier canal (FAM, en bleu) correspondent aux produits de PCR pour la région 3, et les gouttelettes positives dans le canal 2 (HEX, en vert) pour la référence, le gène *HMBS*. **B.** Représentation en deux dimensions des gouttelettes positives en FAM (bleues) et HEX (vertes). Les gouttelettes négatives sont en gris, et les gouttelettes double positives (FAM et HEX) en orange. **C.** Calcul du nombre de copies de la région de régulation, à partir des gouttelettes positives en FAM et HEX.

Pour évaluer l'expression du gène, j'ai produit des ADN complémentaires à partir d'1 μg d'ARN total, avant de réaliser des dilutions en série et d'amplifier les ADNc correspondant au gène *SLC40A1* de manière spécifique. La figure 49 montre une diminution du nombre de gouttelettes positives qui corrèle avec les facteurs de dilutions successifs jusqu'à la dilution 1/32. Au-delà, le nombre de gouttelettes obtenues peut être considéré comme trop faible ; témoignant dès lors de la limite expérimentale. Cependant, étant donnée l'ampleur des effets attendus de la délétion d'un élément de régulation sur l'expression d'un gène, qui serait plutôt faible (d'autant plus que cette délétion a peu de chances de survenir sur les trois allèles présents dans chaque cellule), nous pouvons supposer que les niveaux d'expression résiduels seront compris dans la gamme de dilution entre 1 et 1/32.

A



B

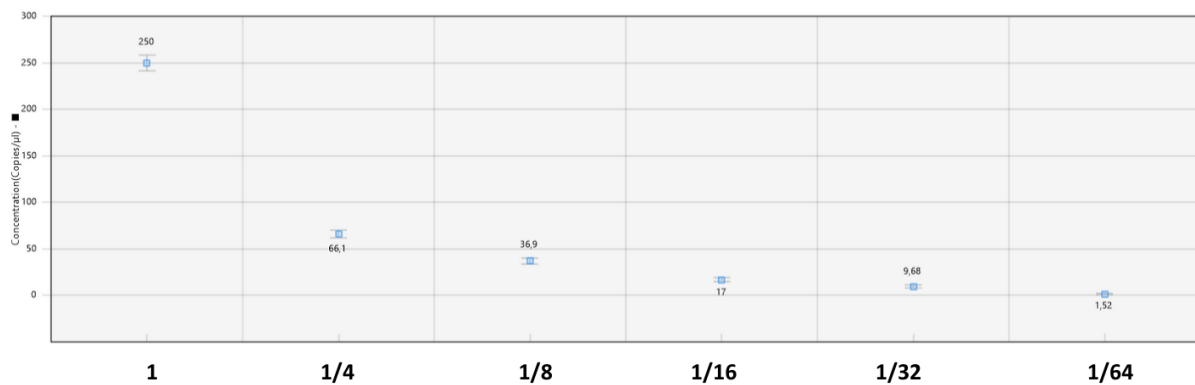


Figure 49: Quantification de l'ARN du gène *SLC40A1* par ddPCR dans les cellules HepG2. A. Le nombre de gouttelettes positives dans le premier canal (FAM) correspondant aux produits de PCR pour l'ADNc du gène *SLC40A1*, sans dilution et après dilutions en série (de 1/4 à 1/64). **B.** Calcul du nombre de copies par μl de l'ARN de *SLC40A1*.

Ces premiers résultats permettent de conclure que cette stratégie est pertinente, à la fois pour la quantification du nombre de copies que pour l'évaluation de l'expression du gène *SLC40A1*.

b. Résultats de la première tentative d'édition génique en utilisant la méthode « bulk »

Des cellules HepG2 ont été transfectées pendant 48 heures avec des plasmides permettant de tester 4 combinaisons d'ARN guides. Des plasmides pcDNA3.1 et PX458 ont été utilisés comme contrôles négatifs.

La figure 50 montre la variabilité observée pour la quantification du nombre de copies du gène *SLC40A1*, comprise entre 2,54 et 2,77, sans différence apparente entre les témoins et les différentes conditions testées. Cela suggère que le nombre de cellules déletées pour la région régulatrice candidate 3 est resté bas, et en tout cas pas suffisant pour révéler des différences dans une stratégie qui dépend également de l'efficacité de transfection.

Pour cette raison, j'ai décidé de ne pas poursuivre en stratégie bulk, mais de me tourner vers une stratégie d'expansion clonale, qui est en cours de mise au point.

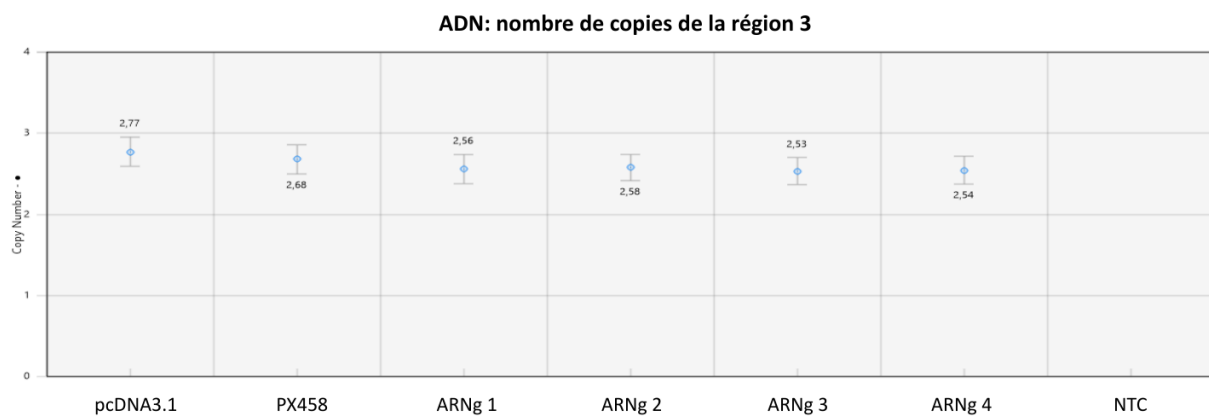


Figure 50: Quantification du nombre de copies de notre région de régulation par ddPCR dans les cellules HepG2. par le logiciel Quantasoft Analysis Pro (BioRad). Calcul du nombre de copies de l'élément régulateur 3 en comparaison au gène *HMBS* présent en deux copies, en fonction des combinaisons d'ARNg. NTC : contrôle de PCR sans ADN.

2.2.4 Séquençage des régions de régulation

a. Données de qualité

204 patients ont été sélectionnés à partir de la cohorte EMSAI (voir la partie matériels et méthodes). 202 ADN ont pu être séquencés (deux ADN n'étant plus disponibles), et nous avons connu un échec de séquençage. Au total, nous avons donc analysé les données de 201 patients. La profondeur moyenne était de 1593 X (minimum: 602 X, maximum: 11201 X). Cette valeur élevée s'explique par le ciblage de régions chromosomiques représentant une taille totale de seulement 9206 pb et le peu d'ADN utilisés par puces de séquençage (5 séries d'une quarantaine d'ADN).

b. Variations identifiées

Après appel des variants et regroupement des fichier VCF de chaque patient, le fichier VCF final contenait 49 variations. Un filtre sur la récurrence dans la cohorte permet de retirer les variants trop fréquents (>1% dans la population générale). Après ces filtres, on retient 18 variations qui ont été analysées de façon plus fine (Annexe 5).

Deux variations ont attiré mon attention, car localisées dans la région 8, qui est la région ayant l'impact le plus fort sur la transcription d'après les tests luciférase (Figure 51) :

- la variation chr2(GRCh37):g.190477717A>G. Cette variation est présente à une fréquence d'environ 1% dans la population générale, a un score de 1 (maximum) sur RegulomeDB, est située sur un site où plusieurs motifs de fixation de facteurs de transcription sont prédits, dont MTF1, qui est connu pour être impliqué dans la régulation du gène *SLC40A1* (Troade et al., 2010). Le patient porteur de cette variation est un homme de 41 ans, sans surpoids, une ferritine à 601 $\mu\text{g/L}$ et un coefficient de saturation de la transferrine de 41%.
- la variation chr2(GRCh37):g.190478195T>C. Cette variation est retrouvée à une fréquence de 0.02% dans la population générale et a un score de 0.68 sur RegulomeDB, et touche un site où un motif FOXG1 est prédit, et très conservé. Ce facteur de transcription a d'ailleurs été décrit comme important dans les lignées hépatocarcinomateuses (Zheng et al., 2019), mais principalement dans la carcinogénèse. Elle est détectée chez un homme de 65 ans, en surpoids, une ferritine à 600 $\mu\text{g/L}$ et un coefficient de saturation de la transferrine de 30%.

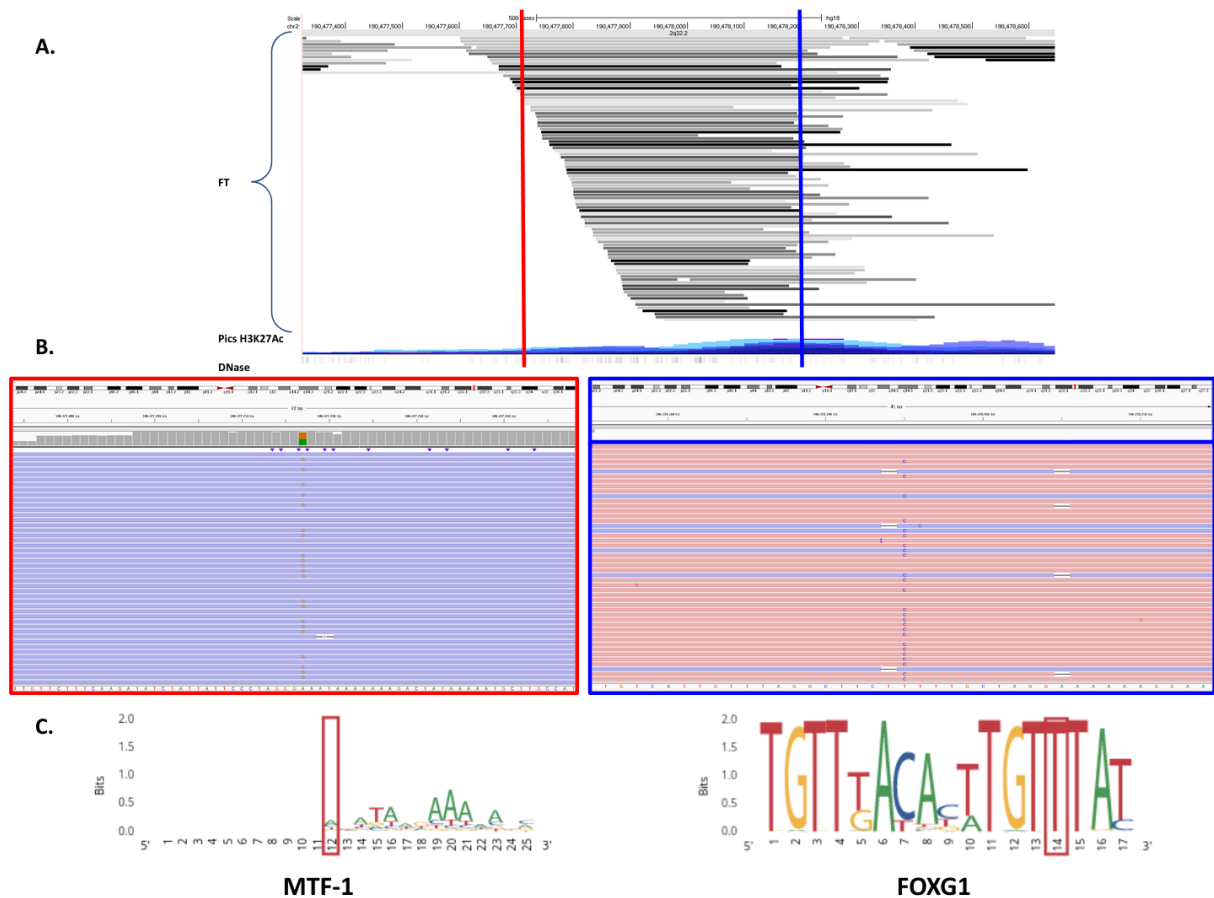


Figure 51: Visualisation des deux variants d'intérêt localisés dans la région 8. **A.** Localisation des variations en regard des données de ChIP pour les facteurs de transcription, l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3, les signaux de DNase I. **B.** Visualisation IGV des deux variations. **C.** Représentation des matrices de poids des motifs prédits de fixation de facteurs de transcription.

L'impact de ces deux variations, rares à très rares en population générale, sera testé au travers de tests luciférase. Les phénotypes des patients, qui présentent une hyperferritinémie supérieure à deux fois la valeur normale mais qui reste cependant assez faible au regard des descriptions généralement réalisées dans le contexte de la maladie de la ferroportine et d'une perte de fonction du gène *SLC40A1*, suggèrent un effet relativement modeste (hypomorphe).

2.3. Discussion

2.3.1. Etablissement d'une stratégie d'étude de la régulation à distance du gène *SLC40A1*

a. Stratégie d'étude *in silico*

J'ai pris la décision d'étudier la régulation à distance du gène *SLC40A1* en commençant par l'analyse des données expérimentales disponibles, principalement grâce au projet ENCODE. Cette stratégie est inspirée des travaux de Kim et al. sur l'étude du gène *Myrf* chez la souris (Kim et al., 2019). Après avoir déterminé les bornes du TAD, ou boucles d'ADN, contenant notre gène d'intérêt, l'idée est de rechercher des régions portant des marques épigénétiques caractéristiques des régions régulatrices, ou témoins d'une chromatine décondensée.

L'une des marques bien décrite est l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac) (Heintzman et al., 2009). Cette marque est le reflet d'une région transcriptionnellement active, avec une ouverture de l'ADN. Les régions de régulation étant associées à la fixation d'un facteur de transcription, elles sont censées être pauvres en nucléosomes (He et al., 2010). Ainsi, de façon plus précise, l'acétylation des histones au niveau de ces régions présente un profil spécifique, en "pic-vallée-pic", où la vallée sert à la fixation du facteur de transcription (Kim et al., 2019), comme montré pour les régions 3 et 8, qui sont les régions associées aux effets les plus importants sur la transcription en tests luciférase, dans la figure 52.

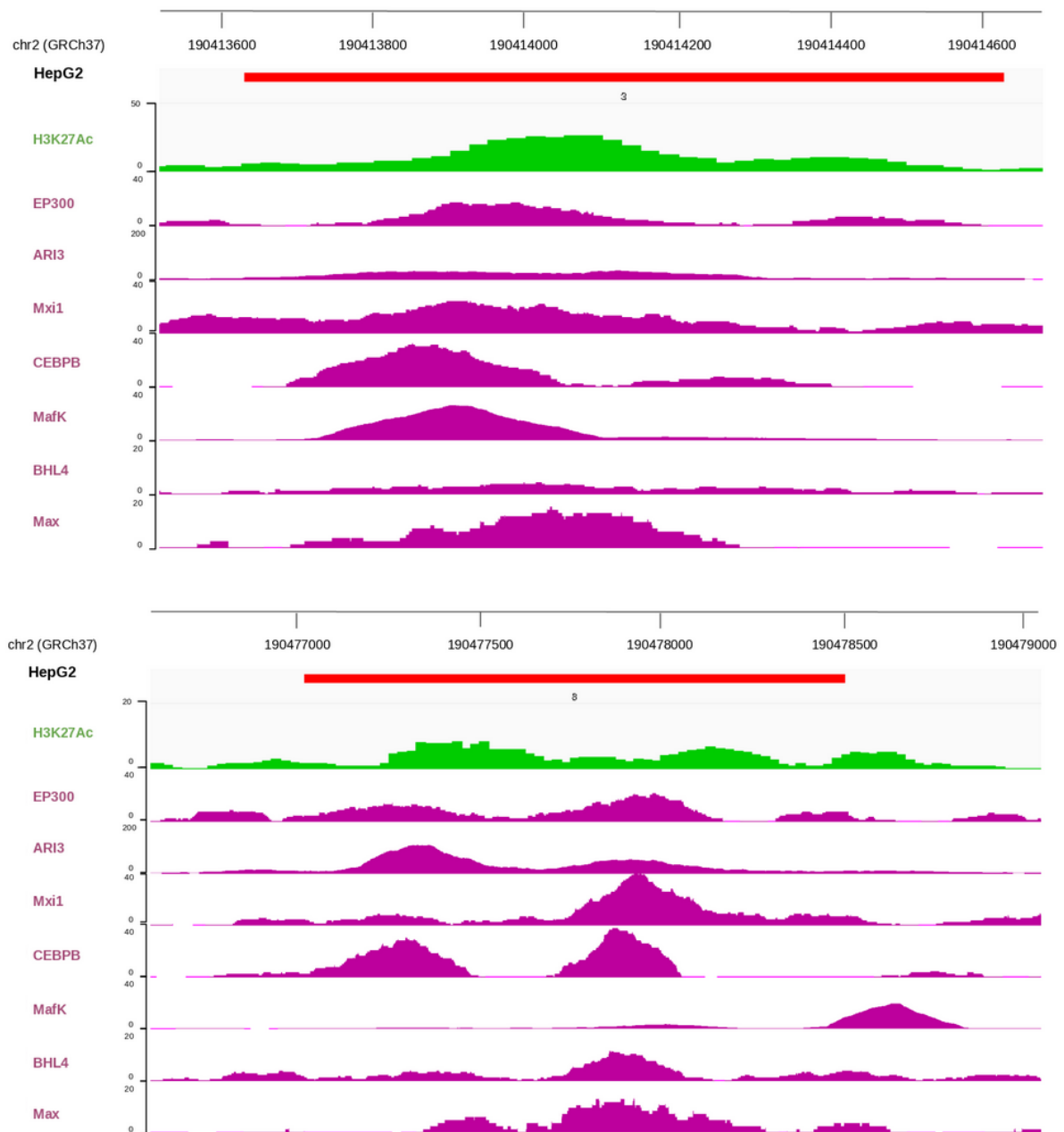


Figure 52: Visualisation des profils de fixation de différents facteurs de transcription au niveau des régions 3 et 8 dans les cellules HepG2. . Données issues du projet ENCODE. En vert, le profil d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3. En violet, les différents facteurs de transcription se fixant à cette région dans les cellules HepG2.

Le plus souvent, un enhancer est associé à la fixation de plusieurs facteurs de transcription, permettant une spécificité en fonction du type cellulaire ou du stade développement (Panigrahi and O'Malley,

2021). C'est ce que l'on voit par exemple ici en analysant les données issues du projet ENCODE montrant la fixation de différents facteurs de transcription au sein des régions 3 et 8 (Figure 52).

Les facteurs de transcription représentés ici sont ceux qui présentaient le signal le plus important dans le projet ENCODE. Parmi ces facteurs, MAFK ("MAF bZIP transcription factor K") est connu pour s'associer au facteur de transcription NRF2 (Toki et al., 1997; Soares and Hamza, 2016), qui chez la souris (Nrf2) a été décrit comme un activateur du gène *Slc40a1* en présence d'hème en se fixant à la séquence ARE présente au niveau du promoteur (Marro et al., 2010). Le facteur CEBPB ("CCAAT Enhancer Binding Protein Beta") a quant à lui un rôle primordial dans le macrophage et est connu pour être impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1*, codant un importateur de fer impliqué dans la réponse immunitaire (Cellier, 2017). Enfin, le facteur P300 est une histone acétyltransférase régulant la transcription *via* le remodelage de la chromatine, et a été impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène codant la ferritine H chez la souris (Tsuji et al., 1999). Ces différents éléments sont importants à prendre en compte dans l'interprétation des données de ChIP-seq dans le contexte plus général du métabolisme du fer. Il serait intéressant de vérifier la fixation de ces différents facteurs à la région régulatrice 8 par ChIP-PCR et à partir de différents types cellulaires (HepG2, Huh7, macrophages primaires).

Les données massives de séquençage génomique permises par les nouvelles technologies sont à l'origine de nombreuses bases de données permettant d'étudier la variabilité génétique au sein d'individus ou de populations. Ces données ont également permis d'identifier des régions du génome intolérantes à la variation, laissant supposer que ces régions, si elles sont mutées, sont plus susceptibles d'entraîner une pathologie (Petrovski et al., 2013). Cette notion de contrainte génomique est bien décrite pour les régions codantes du génome (Havrilla et al., 2019). Pour ce qui est des régions non codantes, une équipe a récemment proposé un algorithme, gwRVIS (Vitsios et al., 2021). Cet algorithme utilise les données de séquençage en population générale pour déterminer un score de contrainte génomique, un score négatif signifiant que la position contient peu de variations en population générale. Cette stratégie peut être utilisée pour prioriser des régions génomiques potentiellement importantes fonctionnellement.

J'ai utilisé ces données pour visualiser les scores dans les régions candidates. Les données du score gwRVIS (v1.1) pour le chromosome 2 ont été téléchargées à partir du dépôt disponible en ligne (<https://az.app.box.com/v/jarvis-gwrvis-scores>). La région d'intérêt (chr2(GRCh37):190300000-190500000) a été isolée et visualisée grâce à la librairie Python seaborn (Waskom, 2021). On peut voir de façon intéressante que les régions candidates ont en moyenne un score négatif, signifiant qu'elles sont potentiellement peu tolérantes à la variation génétique (Figure 53). Ce n'est pas le cas par contre pour la région 5, qui ne présentait pas d'effet sur la transcription lors des tests luciférase, suggérant que cette région pourrait ne pas avoir d'importance fonctionnelle majeure.

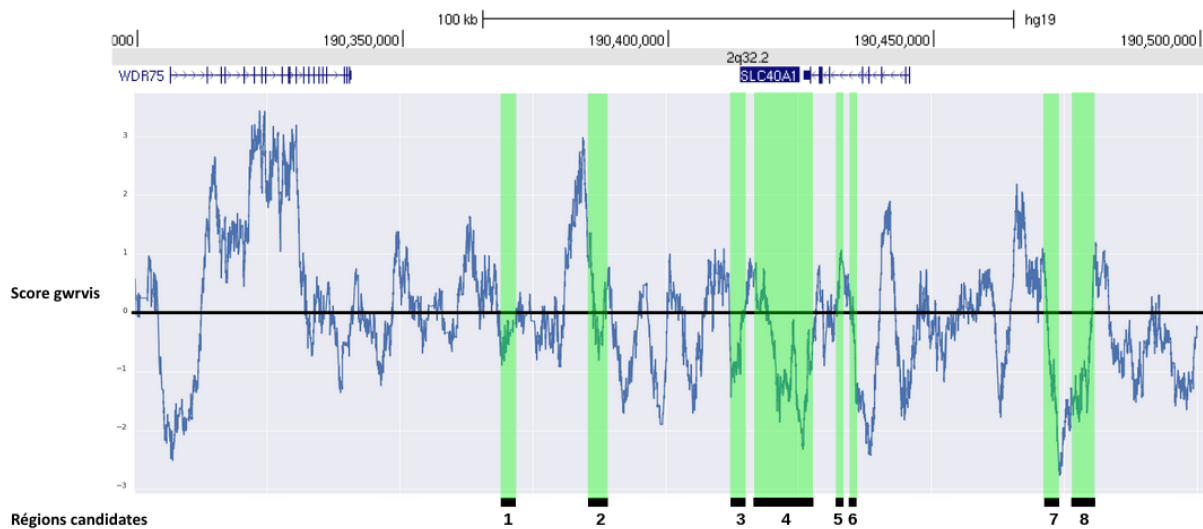


Figure 53: Visualisation des scores de contrainte génomique gwrvis au sein du TAD contenant le gène *SLC40A1*. Les régions candidates sont surlignées en vert. Un score négatif signifie que la position présente une contrainte génomique, c'est-à-dire que peu de variants y sont retrouvés dans la population générale.

b. Etude des interactions génomiques

Nous avons vu plus haut que dans la stratégie de caractérisation d'un élément de régulation, il était important de démontrer dans un contexte cellulaire l'interaction, ou du moins la proximité physique, entre l'élément de régulation et le promoteur du gène. Par des études de capture de la chromatine, et notamment des études 4C dont le principe a été évoqué en introduction, il est possible de mettre en évidence ces interactions en prenant pour cible le promoteur ou la région candidate. Ce travail a été mis au point par le Dr. Chandran Ka et Caroline Benech ; je me suis investi dans les aspects méthodologiques mais n'avait pas le temps de prendre en charge cette partie expérimentale sur le temps de ma thèse .

Premièrement, une analyse a été réalisée en prenant comme cible ("viewpoint") le promoteur du gène *SLC40A1*. Plusieurs choix d'enzymes de restriction ont été faits, et la figure 54 montre les résultats pour les enzymes DpnII (première digestion) et HaeIII (deuxième digestion). Les données de séquençage ont été traitées par l'algorithme proposé par Krijger et al. (Krijger et al., 2019). Ce que l'on peut voir ici c'est que, au sein du TAD initialement délimité, on retrouve une interaction entre le promoteur du gène *SLC40A1* et plusieurs de nos régions candidates. Tout d'abord, les régions 2, 3 et 8, qui présentent un effet coopératif selon nos tests luciférase, semblent interagir avec le promoteur, ce qui semble moins évident avec la région 4. De même, il semble que les régions 1, 6 et, dans une moindre mesure, 7, qui présentaient un effet négatif modeste en tests luciférase, semblent également interagir avec

notre cible. Pour la région 5 les résultats sont plus difficiles à interpréter, du fait notamment de la proximité avec la région 6.

On note également des pics supplémentaires, dans des régions non sélectionnées. Entre les régions 1 et 2 (flèche orange), un pic est visible, mais cette région n'était pas prédite comme élément de régulation par l'absence de pic d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac), ni par ChromHMM (voir Figure 43 dans la partie résultats). Pour la région entre les régions 2 et 3 (flèche noire), on note que GeneHancer prédisait deux régions régulatrices, mais l'une d'elle n'était pas conservée entre les espèces, et pour l'autre il n'y avait pas de pic H3K27Ac. Ces résultats, qui posent la question de la pertinence de l'analyse bioinformatique initiale, mettent en avant la complémentarité des techniques d'analyse, où l'analyse 4C met en avant des régions d'interaction qui présentaient initialement un intérêt moindre.

Enfin, la flèche violette montre un grand pic à la fin du TAD, qui correspond à une région contenant 3 pics de fixation du facteur CTCF, pouvant correspondre à la limite de notre boucle d'ADN. Pour ces trois pics d'ailleurs on retrouve la présence de motifs de fixation potentiels, dans une orientation compatible avec la frontière d'un TAD selon la base CTCFBSDB (<https://insulatordb.uthsc.edu/>) (Ziebarth et al., 2013).

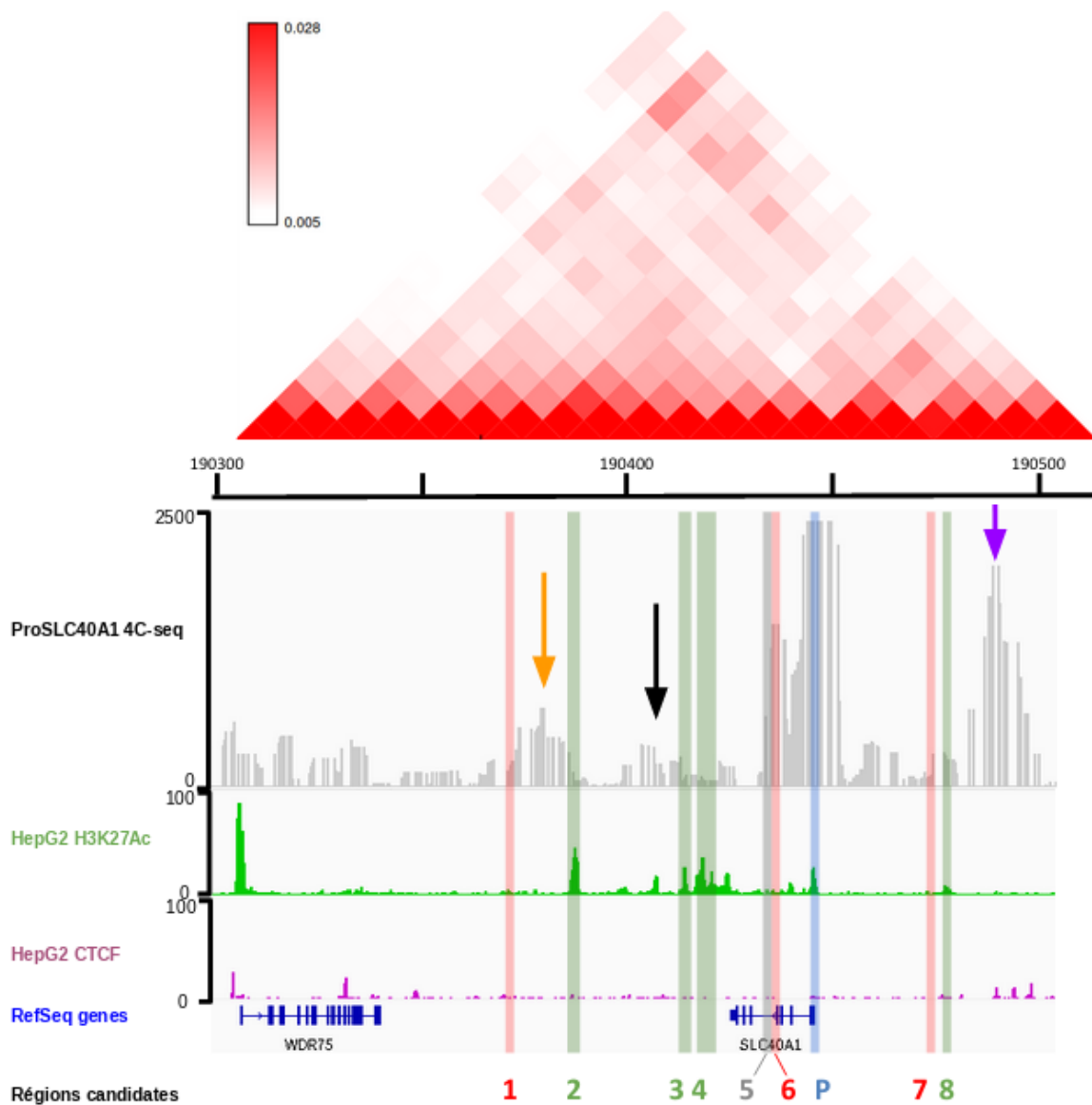


Figure 54: Profils de 4C-seq sur cellules HepG2 avec comme “viewpoint” le promoteur du gène *SLC40A1* (bleu). . Les profils d’acétylation de la lysine 27 de l’histone H3 ainsi que la fixation du facteur insulateur CTCF sont représentés en vert et violet, respectivement. Les régions candidates sont représentées en vert (effet enhancer selon les résultats de luciférase), en rouge (effet silencer) et gris (pas d’effet). Le “viewpoint” est représenté en bleu. Les flèches montrent des régions non sélectionnées sur les données *in silico* mais présentant une interaction avec le promoteur.

Nous avons souhaité ensuite étudier les interactions en prenant comme cible la région 3, qui, avec la région 8, présentait les effets les plus importants en tests luciférase. Comme montré par la figure 55,

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

l'interaction entre la région 3 et le promoteur est bien présente. De façon intéressante, on note que la région 3 interagit avec les régions 2 et 8, ce qui concorde avec l'effet coopératif observé en luciférase. Pour la région 4, sa proximité avec la région 3 rend l'interprétation plus difficile.

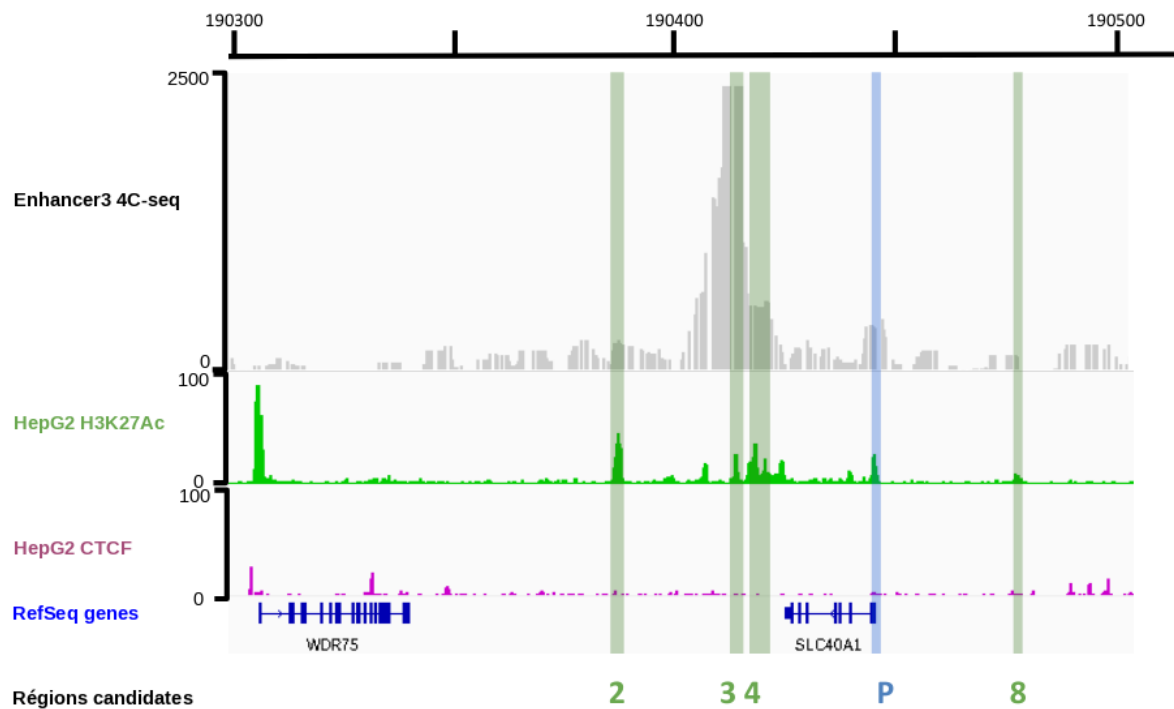


Figure 55: Profils de 4C-seq sur cellules HepG2 avec comme "viewpoint" la région candidate 3. Les profils d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 ainsi que la fixation du facteur insulateur CTCF sont représentés en vert et violet, respectivement. Les régions candidates avec un effet enhancer sont représentées en vert, le promoteur en bleu.

Ces résultats préliminaires restent à répliquer, et d'autres types cellulaires sont à analyser, comme les cellules Huh7. Il serait également intéressant de réaliser ces analyses en prenant comme cible les autres régions candidates, à commencer par la région 8.

c. Analyses *in vitro* par stratégie CRISPR/Cas9

La validation de l'effet d'une région de régulation ne se base pas uniquement sur des données épigénétiques ou des analyses de capture de la chromatine. L'utilisation des tests *in vitro* par un gène rapporteur est connue et bien documentée, cependant elle reste artificielle, puisque l'on apporte par le biais d'un plasmide externe la séquence régulatrice avec le gène rapporteur, sans prendre en compte la conformation tridimensionnelle de l'ADN et le contexte génomique.

Pour caractériser au mieux une région régulatrice, prenons par exemple le cas des enhancers, il faut définir de façon précise ce qu'est un enhancer. A l'origine le terme enhancer était utilisé pour nom-

mer des séquences qui ont un effet transcriptionnel sur une stratégie de gène rapporteur (Banerji et al., 1981), mais on peut également définir un enhancer comme une séquence présentant les marques épigénétiques associées à une activité activatrice, ou enfin des séquences localisées à distance d'un gène et qui agissent sur la transcription de celui-ci *in vivo*. Ces définitions ne sont pas équivalentes, certaines séquences peuvent avoir un effet sur un gène rapporteur, ou présenter des marques épigénétiques caractéristiques, mais ne pas avoir d'effet *in vivo* ou dans un contexte cellulaire donné du fait du repliement chromatinien. A l'inverse, des séquences avec un effet dans ce contexte peuvent ne pas présenter de marques épigénétiques ou ne pas avoir d'effet par des stratégies de tests rapporteurs du fait du contexte génomique nécessaire (Gasperini et al., 2020). C'est pour cela qu'il convient toujours de parler d'enhancer candidat ou potentiel, et d'utiliser plusieurs approches pour confirmer l'effet de l'enhancer candidat sur la régulation d'un gène.

Il est recommandé de passer par une étude mettant en évidence l'effet de la perturbation de l'élément de régulation sur l'activité du gène cible. Comme présenté plus haut, il est possible d'utiliser les stratégies issues de la technologie CRISPR/Cas9 pour :

- déléter la région de régulation
- empêcher la fixation des facteurs de transcription par stratégie de CRISPR interférence
- activer la transcription par CRISPR activation

J'ai fait le choix de la première stratégie, en tentant de produire des clones cellulaires présentant la délétion de l'élément cible. Ce choix fut le fruit de plusieurs discussions. Bien que beaucoup d'études utilisent la stratégie de CRISPR interférence ou activation, basée sur l'utilisation d'une Cas9 modifiée couplée à un facteur répresseur ou activateur, il existe un risque de faux positifs, par extension de l'effet répresseur du facteur utilisé, ou de faux négatif, si la séquence enhancer n'est pas sensible au facteur répresseur (Gasperini et al., 2020).

La stratégie de CRISPR/Cas9 délétionnel a montré son efficacité dans la caractérisation d'éléments de régulation, que ce soit de façon ciblée ou plus large (Dao et al., 2017; Diao et al., 2017; Cassinari et al., 2019). Elle présente par contre des limites, la première étant l'efficacité de coupure et la fréquence d'événements délétionnels. En effet, en apportant un couple d'ARNg dans les cellules, il est nécessaire d'avoir deux événements de coupure dans celles-ci pour pouvoir déléter la région cible. Certains travaux ont montré que l'efficacité de délétion pouvait être faible et les événements de coupure aléatoires (Gasperini et al., 2017).

De plus, j'ai choisi comme modèle cellulaire les cellules HepG2, afin de garder une concordance avec les données *in silico*, *in vitro* et de capture de la chromatine, mais ce modèle est connu pour être difficile à transfecter. Après plusieurs essais de nucléofection, qui se sont soldés par une mortalité cellulaire importante, nous nous sommes tournés vers un lipide cationique : le TransIT-2020 (Mirus Bio) ; des tests comparatifs effectués dans l'équipe ayant montré une meilleure efficacité de ce lipide au

regard d'autres lipides comme la Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific), mais des analyses de cytométrie en flux ont montré que l'efficacité de transfection ne dépassait pas 20%.

Les effets sur le pool de cellules étant insuffisants, avec une diminution non visible du nombre de copies de notre région de régulation, j'ai basculé sur la seconde stratégie, avec un tri cellulaire basé sur l'expression de la GFP couplée à la Cas9. A ce jour je suis en cours de mise au point car les cellules HepG2 survivent peu lorsqu'elles sont isolées, rendant difficile l'expansion clonale après le tri cellulaire.

2.3.2. Recherche de variants de régulation

Ce travail a mis en évidence la présence de deux variations, l'une très rare, l'autre un peu moins (1% en population générale), touchant de potentiels sites de fixation de facteurs de transcription. Pour l'une d'entre elles d'ailleurs (chr2(GRCh37):g.190477717A>G), un site de fixation du facteur de transcription MTF-1 ("Metal Regulatory Transcription Factor 1") est prédit. Ce facteur a une importance pour la régulation du gène *SLC40A1* (Troade et al., 2010), mais la position touchée ne semble pas être particulièrement conservée. De plus, les données de ChIP-seq disponibles pour les cellules HepG2 n'ont pas mis en évidence de fixation de ce facteur de transcription sur la région 8. Cela peut venir du fait que, dans le projet ENCODE, il n'y a pas de données de ChIP-seq pour cette protéine dans les cellules HepG2. Il conviendrait de faire des analyses de ChIP en ciblant le facteur MTF-1.

Pour la seconde variation, on touche entre autres un site prédit de fixation du facteur FOXG1. Cette protéine a été décrite dans la carcinogenèse des cellules hépatocytaires (Zheng et al., 2019), mais à ce jour son rôle dans le métabolisme du fer reste inconnu. De la même manière, une étude par ChIP ciblée sur ce facteur pourrait déjà démontrer son rôle dans les cellules HepG2.

Dans tous les cas, des tests luciférase seraient une première étape dans la validation de l'effet des variations sur l'activité de la région 8.

La plupart des pathologies décrites en lien avec la dérégulation d'un enhancer sont liées à des anomalies structurales (délétion ou duplication). Dans notre cohorte, il serait intéressant de rechercher ce type de variations. Une étude de la base de données DGV ("Database of Genomic Variants") (MacDonald et al., 2014), qui regroupe les données de variations de structure du génome chez des individus sains, montre qu'il n'existe aucune délétion de ces éléments de régulation en population. Une stratégie par PCR digitale ou par micropuce (CGH-array) pourrait être intéressante pour rechercher de telles variations.

Concernant les variants nucléotidiques, les principales descriptions se focalisent sur des variations communes, ou SNPs, associées à un facteur de risque de pathologie (Corradin and Scacheri, 2014), et identifiées par GWAS ("Genome Wide Association Studies"). Il est tout à fait possible que dans le cadre

de l'hyperferritinémie, la dérégulation d'un enhancer par un SNP soit à l'origine d'un surrisque de développer une surcharge en fer, si elle est associée en plus à des éléments en faveur d'un syndrome métabolique, comme l'obésité. Cela reste spéculatif, et à ce jour, les études GWAS à la recherche de variants modifiant le métabolisme du fer n'ont trouvé que des variations codantes, introniques ou dans les UTRs (Tayrac et al., 2015; Koller et al., 2016; Bell et al., 2021).

2.3.3. Les silencers

J'ai focalisé mon travail sur les éléments enhancer, favorisant la transcription, car un de nos objectifs était de mettre en évidence de potentiels variants de régulation entraînant la diminution de la transcription du gène. Il était donc logique de se focaliser sur les éléments enhancers. Les analyses par tests luciférase ont pourtant mis en évidence la présence de régions avec un potentiel effet inverse (régions candidates 1, 6 et 7). Encore une fois, il est important de rappeler que ces tests sont artificiels et, que dans ces cas précis, les différences observées, bien que significatives, étaient modestes. Les données de la littérature sont beaucoup plus riches à propos des éléments enhancer que des silencers, ces derniers présentant pourtant un rôle important dans la régulation transcriptionnelle (Ogbourne and Antalis, 1998; Pang and Snyder, 2020). Il est, par ailleurs, décrit que des régions cis régulatrices peuvent agir en tant qu'enhancer et silencer, en fonction du type cellulaire (Huang and Ovcharenko, 2022).

Les analyses de capture de la chromatine ayant mis en évidence de possibles interactions entre le promoteur du gène *SLC40A1* et les régions ayant un effet négatif en luciférase, une analyse plus poussée de ces éléments, par des stratégies combinatoires en luciférase, ou de capture de la chromatine prenant pour cible ces régions pourrait être intéressante, dans un second temps.

2.3.4. La problématique du type cellulaire

Nous avons basé toutes nos analyses sur les cellules HepG2, pour les raisons explicitées plus haut (implication dans le métabolisme du fer, données disponibles). Nous avons également vu les difficultés que posaient l'utilisation de ces cellules (trois copies du gène *SLC40A1*, difficultés de transfection, difficultés de culture de cellules isolées). Les résultats sur les cellules Huh7 ont montré que l'effet des éléments de régulation dépendait du type cellulaire. Enfin, il est important de noter que j'ai travaillé sur des lignées cellulaires immortalisées, qui s'éloignent du contexte physiologique. Il sera important par la suite d'utiliser d'autres types cellulaires, peut-être plus proches des macrophages, qui expriment plus fortement *FPN1* et jouent un rôle essentiel dans le métabolisme du fer. Les résultats pourraient être différents, tout comme on le voit pour les cellules Huh7 qui sont pourtant comme les HepG2 issues de cellules hépatocytaires.

Au sein de l'équipe qui m'a accueillie pour ma thèse, la recherche d'un meilleur modèle cellulaire pour l'étude de FPN1 est un objectif important. Les travaux du Dr Marlène Le Tertre durant sa thèse au sein de l'équipe ont consisté en la mise au point d'un modèle *in vitro* à partir de la lignée monocyttaire THP-1. Elle a pu mettre en place un protocole de différenciation et polarisation en macrophages de types M2, et éditer le génome par une stratégie CRISPR/Cas9 pour inactiver un allèle du gène *SLC40A1*.

Durant ma thèse, j'ai participé à la mise en place d'un modèle primaire, à partir de résidus d'aphérèse de donneurs sains provenant de l'établissement français du sang. L'objectif était de les différencier en macrophages puis les polariser en macrophages de type M2, non pro-inflammatoires.

Après séparation de PBMC ("Peripheral Blood Mononuclear Cells") grâce au milieu de séparation Pancoll (PAN Biotech), les monocytes ont été purifiés par l'utilisation de billes magnétiques permettant l'isolation des cellules CD14⁺ ("CD14 Microbeads", Miltenyi Biotec), et mis en culture en boîte de pétri dans un milieu RPMI (Lonza) à 20% de SVF en présence de M-CSF à 100 ng/mL pendant six jours. Après ce délai, les cellules différenciées en macrophage de type M0 sont mis en culture dans du RPMI à 5% de SVF en présence de M-CSF à 100 ng/mL pendant 24h.

Nous avons également mis au point un protocole de sénescence des globules rouges, adapté du protocole initialement proposé par Delaby et al. (Delaby et al., 2005). Après un prélèvement sanguin sur tube EDTA et plusieurs étapes de centrifugation et lavages, les globules rouges sont mis en présence d'un mélange de calcium et ionophore (CaCl₂ à 2,5mM et ionophore à 0,5 μM dans un tampon HEPES) à 30°C pendant 16 heures.

Ces globules rouges rendus sénescents sont ensuite déposés sur les macrophages en culture, à 37°C pendant une heure. Après un lavage, un choc hypotonique et une coloration au MGG, une visualisation au microscope a permis de confirmer que les macrophages étaient en capacité de phagocyter ces érythrocytes (Figure 56).

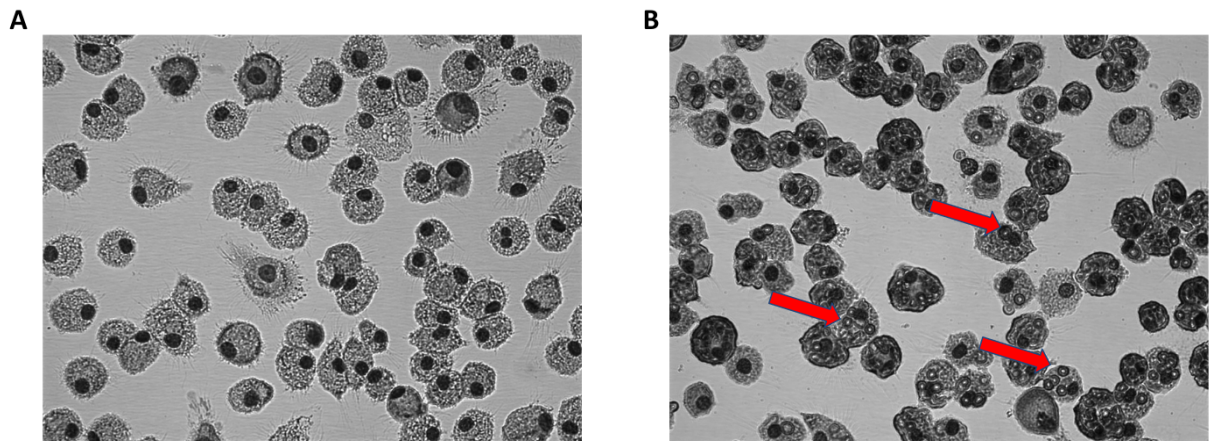


Figure 56: Observation par microscopie (x400) de la capacité de monocytes primaires humains différenciés et polarisés en macrophages de type M2 à endocyter des érythrocytes sénescents. Monocytes primaires humains différenciés et polarisés en macrophages de type M2 en absence (A) ou présence (B) de globules rouges humains rendus sénescents. Les flèches rouges pointent des globules rouges endocytés par les macrophages.

Ce travail de mise au point d'un modèle primaire est toujours en cours au laboratoire. Nous mettons au point des conditions expérimentales pour mesurer les niveaux d'expression du gène *SLC40A1*, tant au niveau ARN que protéique. Ce modèle servira à l'étude de la régulation à distance du gène *SLC40A1* mais de façon plus large permettra au laboratoire de mieux comprendre la biologie de la ferroportine dans un contexte plus proche des conditions physiologiques, au travers d'études transcriptionnelles et protéomiques.

Conclusion
Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le travail de thèse que j'ai réalisé sous la direction du Pr Gérald Le Gac au sein de l'unité Inserm U1078 Génétique, Génomique et Biotechnologies avait pour but principal l'étude du gène *SLC40A1* dans le contexte des surcharges en fer. Ce travail a permis de contribuer à l'amélioration de l'interprétation des variations faux-sens du gène *SLC40A1* chez des patients présentant une surcharge en fer, par des analyses fonctionnelles permettant d'appréhender à la fois la perte et le gain de fonction, et des analyses structurales fines, en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut. De plus, ces travaux ont amélioré les connaissances fondamentales sur la biologie de la ferroportine, et en particulier sa relation avec l'hepcidine.

La compréhension de la fonction d'un gène et d'une protéine ne se limite pas à l'étude de sa séquence codante. Les travaux que j'ai démarrés visant à étudier la régulation à distance du gène *SLC40A1* m'ont permis de mettre en évidence des régions candidates susceptibles de moduler l'expression du gène dans le modèle HepG2. La stratégie basée sur une première recherche *in silico* de régions candidates s'est avérée plutôt efficace. Ce travail devra être continué, par des analyses de CHIP pour identifier les facteurs de transcription impliqués dans cette régulation, et par la poursuite des études d'interaction et de CRISPR sur les autres régions. La recherche de variations dans ces régions s'est faite sur une cohorte de 204 patients, et devrait être étendue à d'autres patients présentant une hyperferritinémie inexplicée, dans le but de mettre en évidence un nouveau mécanisme physiopathologique de la maladie de la ferroportine. Il serait important en revanche de bien choisir ces patients, dont le phénotype serait évocateur d'une perte de fonction du gène *SLC40A1*, c'est à dire une hyperferritinémie franche ($>1000\mu\text{g/L}$), sans cause secondaire, et avec une surcharge en fer avérée. L'utilisation du score récemment publié par Landemaine et al. serait intéressante dans ce cas (Landemaine et al., 2021).

Annexes

Annexes

Annexe 1 Amorces utilisées pour l'inversion et la combinaison des régions candidates au sein du plasmide pGL3_proSLC40A1

Amorce	Sequence (BamHI-tail) (Sall-tail)
1inv-F	aaatcgataaggatccCTTTCAATGGTATGGTTGTG
1inv-R	atcggtcgacggatccATAAATTAGGTCAGTAATGGAAA
2inv-F	aaatcgataaggatccGTAGAGCAAGTCCTCCAACAGT
2inv-R	atcggtcgacggatccTCACATGCTAGACTATAAAAGGAAATTTTG
3inv-F	aaatcgataaggatccCAGAGTAGTAATAAAAAGTCACAGGG
3inv-R	atcggtcgacggatccCTTGAAGGATGAACTGGAATC
4inv-F	aaatcgataaggatccGTTAATATATTCATAACCATATTTAAGG
4inv-R	atcggtcgacggatccATAAAACCTGAGAGAATGGT
6inv-F	aaatcgataaggatccAAGTAAATGAGAATCATGATTTTAG
6inv-R	atcggtcgacggatccTTTTAAGAAGCTTACCATCTTAG
7inv-F	aaatcgataaggatccTTGTAAGCAAGAAATGAATAGG
7inv-R	atcggtcgacggatccCCTATTCTTTCTTGCTTACAA
8inv-F	aaatcgataaggatccCACACCACACTCGGCTAAT
8inv-R	atcggtcgacggatccAATAGTTTGGTTATATGACTCTTTCACC
comb-8-3-F	TCTGGGATCCGTCGACAAATAGTTTGGTTATATGACTCTTTCACC
comb-8-3-R	AAGGGCATCCGTCGACCACCACCACACTCGGCTAAT
comb-2-3-F	TCTGGGATCCGTCGACTCACATGCTAGACTATAAAAGGAAATTTTG
comb-2-3-R	AAGGGCATCCGTCGACGTAGAGCAAGTCCTCCAACAGT
comb-4-F	TCTGGGATCCGTCGACATAAAACCTGAGAGAATGGT
comb-4-R	AAGGGCATCCGTCGACGTAAATATATTCATAACCATATTTAAGG
comb-2-8-F	GGTGGATCCGTCGACTCACATGCTAGACTATAAAAGGAAATTTTG
comb-2-8-R	GGTGGATCCGTCGACATAAAACCTGAGAGAATGGT
comb4-2-F	AAAGGGATCCGTCGACATAAAACCTGAGAGAATGGT

Annexe 2 Séquence des ARNg utilisés et leur combinaison

ARN guide	Séquence cible	Score MIT	Score CFD	Nombre de off-target	Nombre de off-target pour 0-1-2-3-4 mismatches	Localisation (GRCh37)
gRNA-ent3-SLC40A1-5'(1)	TGAGAACTTGGATGGGTAATGAGG	94	93	76	0-0-0-3-73	chr2:190412974-190412996
gRNA-ent3-SLC40A1-5'(2)	GTGTTTCAGAGGTTAAGCGCTGG	93	95	74	0-0-0-6-68	chr2:190412880-190412902
gRNA-ent3-SLC40A1-3'(1)	TTAGTCTGTCGTATGCACATAGG	90	95	46	0-0-0-2-44	chr2:190415751-190415773
gRNA-ent3-SLC40A1-3'(2)	GGGAAAAGATTATTCGACATAGG	90	94	117	0-0-0-9-108	chr2:190415481-190415503

Combinaisons	ARNg 5'	ARNg 3'
ARNg 1	gRNA-ent3-SLC40A1-5'(1)	gRNA-ent3-SLC40A1-3'(1)
ARNg 2	gRNA-ent3-SLC40A1-5'(2)	gRNA-ent3-SLC40A1-3'(1)
ARNg 3	gRNA-ent3-SLC40A1-5'(1)	gRNA-ent3-SLC40A1-3'(2)
ARNg 4	gRNA-ent3-SLC40A1-5'(2)	gRNA-ent3-SLC40A1-3'(2)

Annexe 3

Séquence des amores utilisées pour la PCR digitale

Amorce	Séquence	Sonde d'hydrolyse
enh3_ddPCR_F	GCTCTACAAGCTGGATTGGTCTTA	CACAGCCA
enh3_ddPCR_R	CATGAGGACAATTCTGGATGAGT	
slc40a1_cdna_ddPCR_F	TGAGCTTCTGACCATGTACCA	CTTCCTGC
slc40a1_cdna_ddPCR_R	CAATATTTGCAATAGTGATGATCAGGA	
hmbs_f	GGGACAGTGTACCCAAGGTC	GAGCAGGA
hmbs_r	CTGAGGTAAACGGATCTGACG	

Annexe 4 Séquence des amorces utilisées pour le séquençage des régions de régulation candidates

Amorce	Séquence
seq-enh1-1-R	CGCATGTCAGAAGTTAACAATG
seq-enh1-2bis-F	GTGTTGAACCTATGTTTGTAAAGCTG
seq-enh1-2bis-R	CCTAGTCAGGTAAGGGCCCTT
seq-enh1-3-F	AGACAGAGCAAGTAGTGGGGC
seq-enh1-3-R	ACACCAAGGGCTTATGGTTTCT
seq-enh2-1-F	GTCTTCAGACCTGGGAAAATATGT
seq-enh2-1-R	AGTCCATGAATACACAAGGAAGTG
seq-enh2-2-F	CTGCGTATGATTATATCTGCTTGTT
seq-enh2-2-R	TGGAGTTGCTTTTAGGCTTCAT
seq-enh2-3-F	CATTGGCTGTGTTGAAAAGACTAG
seq-enh2-3-R	CTATGGACTTTGGACTTAGAAACTCTC
seq-enh2-4-F	CTTATGGTATTGAAAGGGCTGTATT
seq-enh2-4-R	AAATGTCAGAAATTTCTCTCTCA
seq-enh2-5-F	AAAATAAAGGCAGCTACAGATAGATTAG
seq-enh2-5-R	CTCAGTGCTCTGAGAATTCCTAACTC
seq-enh2-6-F	ATGCCCTAGTAAATTAATGTGAATG
seq-enh2-6-R	TGTATCTATTAGATAACCATAAATGACCCA
seq-enh3-1-F	CTTCATTTCTTAATACTGAATATTCTGAGC
seq-enh3-1-R	CAACAGCTGCATAAATATTCTCAC
seq-enh3-2-F	TTTCTGCAAAAAAGGCGA
seq-enh3-2-R	CTTCACAAACTTGCTAGGTTGAG
seq-enh3-3-F	TGTGTTTGTGGGTGTTTGAAC
seq-enh3-3-R	CATCCCTAGCTAAGCAAAGATTGA
seq-enh3-4-F	GCTGAGTCTAGGATAGCTGATCT
seq-enh3-4-R	GAGTAGCAAGGGCAACCCTATA
seq-enh4-1-F	TGGAGAGGAAATGAGATACTTCTT
seq-enh4-1-R	GACTGCTGTAAACCAGCTACATC
seq-enh4-2-F	GGTTGCTTAGAGCTACATTAGTAGTATTGA
seq-enh4-2-R	CAGTCAATTAATGACTATTAACACATCAC
seq-enh4-3-F	GGAAGATATAAGCAGACTTTTTCAAAAG
seq-enh4-3-R	GTATCAGATGCAAAATAACCTACAAGC
seq-enh4-4-F	CTTCATGTGCAAATGTGTGAC
seq-enh4-4-R	GGAATTTCTACAATGTGTATGTTAAACA
seq-enh4-5-F	GCAATATGTTATGTTCAAATAGGTG
seq-enh4-5-R	GCATTATTCCATCCTTAGGTCTTC
seq-enh4-6-F	CAGGGAAACAACTAATGATGAGATA
seq-enh4-6-R	TAAAAGCTGAAAGACTTAACTCCC
seq-enh5-1-F	CATCATATAAATAACTGCAAAACATGC
seq-enh5-1-R	TGCTGGCTGGATGTGAAAG
seq-enh5-2bis-F	TGTTTTCAAGTAGGAAAGGAAGTGA
seq-enh5-2bis-R	CCTCCTTTTCTCTGTTCTCCTTTA
seq-enh5-3-F	TTGTGGATTTTTGTGCCAT
seq-enh5-3-R	AGGTGGGTCTGTGTATAAGAGACAC
seq-enh6-0-F	GGAACAATGTAGGAGAGACTCTAGAAG
seq-enh6-0-R	TTCTTCAGATGTTCTTTGACCACTT
seq-enh6-1bis-F	CCATCTAGTTGTTCAATGGGAATA
seq-enh6-1bis-R	AGCAGAGTTGACTCAGCTGATCT
seq-enh6-2-F	TTGGAATTACAATCCCCTGTG
seq-enh6-2-R	GACTTGTCTCCTTCACTCACC
seq-enh6-3-F	GCTTTGTTTGGACCATTGG
seq-enh6-3-R	TTCTCTATTATAATGATCACAGGAAG
seq-enh7-1-F	GCTAAAGTTCCTGCATGAGGAT
seq-enh7-1-R	ATGCCCAGAAACATAGGCAA
seq-enh7-2-F	TATGTGTTCTTGAGAGGGAGGA
seq-enh7-2-R	CCATTTCAACCAGAGCATGTAT
seq-enh7-3-F	GCCACAGAGTCTTTTCTCAAACCTA
seq-enh7-3-R	GGCTCTGATATTGACTCATAATTGC
seq-enh7-4-F	CAACATAATAATTGCAGTACCAAACA
seq-enh7-4-R	CCCAATAGTGAAATAGATACAAGAGTAGC
seq-enh7-5-F	TTCTCACCTGTGACCCTATG
seq-enh7-5-R	CAGATCACCTGTTAGAAGTCTAGAA
seq-enh7-6-F	GGTAAATAACCAGACTGAAGCAACTT
seq-enh7-6-R	CAGTGCAAAAACAGTGCTTATTTG
seq-enh7-7-F	CAGTTTATTTAAATCAAAGTGTGTTGTG
seq-enh7-7-R	AGACAAGTTCCTAAAGGAATTAAGC
seq-enh7-8-F	GTCTTAACCTCAAAGTGAATAGCATAAGT
seq-enh7-8-R	CACTTTAATGTGATTCTTCATGCC
seq-enh8-1-F	GTGGTGATTACATGTTATTATTATAATGG
seq-enh8-1-R	GCAAAATCTCTTCCAAGGTTT
seq-enh8-2-F	GGAAGATAATGCATATTAATTAGTCCA
seq-enh8-2-R	AGTGTGTTGTAGTTTCTCTTCTTAAAC
seq-enh8-3-F	TTCCAAATATCCATACACGGACTA
seq-enh8-3-R	GGAGCTCTGAGTAGTAGAAAAGCAA
seq-enh8-4-F	AGGCTGAAGCATGCAAGGT
seq-enh8-4-R	TTCTTTCAAAGATATCTATTATCCCTAGG
seq-enh8-5-F	AACAGCAGAAGTGTGGCAAG
seq-enh8-5-R	AAGCATAGCATCATAGGGTTGC
seq-enh8-6-F	CTGCTCTACCTCTAGATTAACCC
seq-enh8-6-R	CTAGGGCTAGCTCTTGGATCG
seq-enh8-7-F	AGGCTGCTGCTCATGTTGAAATA
seq-enh8-7-R	ATTCTCTGCCTCAGCCTC

Annexe 5 Variations filtrées dans la cohorte EMSA1

chr	Position (GRCh37)	Ref	Alt	Qualité	VAF	Nombre Homozygotes	Nombre Hétérozygotes	MAF (1000G)	Profondeur (X)	Région candidate	Score RegulomeDB	Touche un motif de fixation prédit de FT	Hypersensibilité à la DNase
chr2	190386657	G	C	1203,81	0,836431	1	0		269	1	0,60906	Non	Oui
chr2	190386911	T	C	520,99	0,5175	0	1		1003	1	0,93083	Oui	Oui
chr2	190387160	C	T	15,78	0,236686	0	1		169	1	0,78689	Oui	Non
chr2	190387813	C	T	168	0,3575	0	1	0,0006	1641	1	0,70497	Non	Oui
chr2	190434198	G	A	513,63	0,5175	0	1	0,0008	6381	5	0,33271	Oui	Oui
chr2	190434314	C	T	111,92	0,325	0	1	0,004	9373	5	0,89367	Oui	Oui
chr2	190434517	T	C	248,3	0,522222	0	1		102	5	0,60906	Non	Oui
chr2	190435327	C	T	24,67	0,327273	0	1		55	6	0,60906	Non	Oui
chr2	190435762	A	G	688,86	0,45	0	2	0,0383	3401	6	0,39922	Oui	Oui
chr2	190435773	A	G	431,73	0,495	0	1		2544	6	0,4701	Oui	Oui
chr2	190435790	A	T	657,36	0,56927	0	1		1690	6	0,97433	Oui	Oui
chr2	190477111	C	T	1389,66	0,650754	1	1	0,0074	2094	8	0,58955	Non	Non
chr2	190477302	C	T	16,19	0,218045	0	1	0,0032	3124	8	0,60906	Non	Oui
chr2	190477390	C	A	455,43	0,493734	0	1	0,0188	2229	8	0,86618	Oui	Oui
chr2	190477446	G	C	345,69	0,492347	0	2	0,0006	2008	8	0,60906	Non	Oui
chr2	190477717	A	G	305,76	0,432161	0	1	0,0188	2268	8	1	Oui	Oui
chr2	190477931	C	T	49,35	0,2875	0	2		2069	8	0,98	Oui	Oui
chr2	190478195	T	C	527,92	0,52	0	1	0,0002	631	8	0,68	Oui	Oui

Légende

VAF fréquence de l'allèle muté

MAF fréquence de l'allèle mineur dans la base 1000 Genomes

FT Facteur de transcription

Références

Références

- Abboud S, ¶, Haile DJ, ¶. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275:19906–19912.
- Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301:610–615.
- Adams PC, Barton JC. 2010. How I treat hemochromatosis. *Blood* 116:317–325.
- Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leiendecker-Foster C, Speechley M, et al. 2005. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *New England Journal of Medicine* 352:1769–1778.
- Addo L, Ikuta K, Tanaka H, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Ito S, Shindo M, Sasaki Y, Shimonaka Y, Fujiya M, Kohgo Y. 2016. The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *Int J Hematol* 103:34–43.
- Albuquerque D, Manco L, Loua KM, Arez AP, Trovada M de J, Relvas L, Millimono TS, Rath SL, Lopes D, Nogueira F, Varandas L, Alvarez M, et al. 2011. SLC40A1 Q248H allele frequencies and associated SLC40A1 haplotypes in three west african population samples. *Ann Hum Biol* 38:378–381.
- Allan J, Hartman PG, Crane-Robinson C, Aviles FX. 1980. The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 288:675–679.
- Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, McLaren CE, Bahlo M, Nisselle AE, Vulpe CD, Anderson GJ, Southey MC, et al. 2008. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 358:221–230.
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. 2012. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823:1468–1483.
- Anderson GJ, Frazer DM. 2005. Hepatic iron metabolism. *Semin Liver Dis* 25:420–432.
- Anderson SA, Nizzi CP, Chang Y-I, Deck KM, Schmidt PJ, Galy B, Damernsawad A, Broman AT, Kendzioriski C, Hentze MW, Fleming MD, Zhang J, et al. 2013. The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell Metab* 17:282–290.
- Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, Chen Y, Zhao X, Schmidl C, Suzuki T, Ntini E, Arner E, et al. 2014. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 507:455–461.
- Andrews NC. 1999. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol* 31:991–994.

Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. 2009. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41:482–487.

Angmo S, Tripathi N, Abbat S, Sharma S, Singh SS, Halder A, Yadav K, Shukla G, Sandhir R, Rishi V, Bharatam PV, Yadav H, et al. 2017. Identification of guanosine 5'-diphosphate as potential iron mobilizer: Preventing the hepcidin-ferroportin interaction and modulating the interleukin-6/stat-3 pathway. *Scientific Reports* 7:40097.

Arese P, Turrini F, Schwarzer E. 2005. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 16:133–146.

Arezes J, Foy N, McHugh K, Quinkert D, Benard S, Sawant A, Frost JN, Armitage AE, Pasricha S-R, Lim PJ, Tam MS, Lavallie E, et al. 2020. Antibodies against the erythroferrone n-terminal domain prevent hepcidin suppression and ameliorate murine thalassemia. *Blood* 135:547–557.

Arezes J, Foy N, McHugh K, Sawant A, Quinkert D, Terraube V, Brinth A, Tam M, LaVallie ER, Taylor S, Armitage AE, Pasricha S-R, et al. 2018. Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood* 132:1473–1477.

Arya N, Chakrabarti S, Hegele RA, Adams PC. 1999. HFE S65C variant is not associated with increased transferrin saturation in voluntary blood donors. *Blood Cells Mol Dis* 25:354–357.

Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, Vieth KR, Jung G, Casu C, Rivella S, Jormakka M, Mackenzie B, et al. 2018. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* 131:899–910.

Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FWK, Chapman RS, Maxwell PH, Choi P. 2009. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 75:976–981.

Aslam N, Mettu P, Marsano-Obando LS, Martin A. 2010. Deferasirox induced liver injury in haemochromatosis. *J Coll Physicians Surg Pak* 20:551–553.

Augustin R. 2010. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62:315–333.

Auriac A, Willemetz A, Canonne-Hergaux F. 2010. Lipid raft-dependent endocytosis: A new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica* 95:1269–1277.

Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. 2006. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38:531–539.

Babitt JL, Lin HY. 2012. Mechanisms of anemia in CKD. *JASN* 23:1631–1634.

-
- Babu KR, Muckenthaler MU. 2016. miR-20a regulates expression of the iron exporter ferroportin in lung cancer. *J Mol Med (Berl)* 94:347–359.
- Bachman E, Feng R, Travison T, Li M, Olbina G, Ostland V, Ulloor J, Zhang A, Basaria S, Ganz T, Westerman M, Bhasin S. 2010. Testosterone suppresses hepcidin in men: A potential mechanism for testosterone-induced erythrocytosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95:4743–4747.
- Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, Dauparas J, Ovchinnikov S, Lee GR, Wang J, Cong Q, Kinch LN, Schaeffer RD, Millán C, Park H, et al. 2021. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* 373:871–876.
- Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. 1981. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27:299–308.
- Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, Meneveri R, Nemeth E, Ganz T, Piperno A. 2008. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with dysmetabolic hepatic iron overload. *Journal of Hepatology* 49:123–133.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712.
- Barton JC, Barton JC, Acton RT, So J, Chan S, Adams PC. 2012. Increased risk of death from iron overload among 422 treated probands with HFE hemochromatosis and serum levels of ferritin greater than 1000 $\mu\text{g/l}$ at diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10:412–416.
- Barton JC, Preston BL, McDonnell SM, Rothenberg BE. 2001. Severity of iron overload in hemochromatosis: Effect of volunteer blood donation before diagnosis. *Transfusion* 41:123–129.
- Bastin J, Drakesmith H, Rees M, Sargent I, Townsend A. 2006. Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *Br J Haematol* 134:532–543.
- Beaton MD, Chakrabarti S, Adams PC. 2014. Inflammation is not the cause of an elevated serum ferritin in non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology* 13:353–356.
- Beaumont C, Leneuve P, Devaux I, Scoazec J-Y, Berthier M, Loiseau M-N, Grandchamp B, Bonneau D. 1995. Mutation in the iron responsive element of the α 1 ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat Genet* 11:444–446.
- Bell AC, Felsenfeld G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405:482–485.
- Bell S, Rigas AS, Magnusson MK, Ferkingstad E, Allara E, Bjornsdottir G, Ramond A, Sørensen E, Halldórsson GH, Paul DS, Burgdorf KS, Eggertsson HP, et al. 2021. A genome-wide meta-analysis yields 46 new loci associating with biomarkers of iron homeostasis. *Commun Biol* 4:156.

-
- Benoist C, Chambon P. 1981. In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* 290:304–310.
- Berthelot C, Villar D, Horvath JE, Odom DT, Flicek P. 2018. Complexity and conservation of regulatory landscapes underlie evolutionary resilience of mammalian gene expression. *Nature Ecology & Evolution* 2:152.
- Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth M-P, Coppin H. 2012. Induction of activin b by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* 120:431–439.
- Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, Powers AS, Gonen S, Schneider S, Arvedson T, Dror RO, Cheng Y, Manglik A. 2020. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*.
- Birch J, Axford D, Foadi J, Meyer A, Eckhardt A, Thielmann Y, Moraes I. 2018. The fine art of integral membrane protein crystallisation. *Methods* 147:150–162.
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3:e157.
- Bonaccorsi di Patti MC, Polticelli F, Cece G, Cutone A, Felici F, Persichini T, Musci G. 2014. A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *FEBS J* 281:2851–2860.
- Bonev B, Cavalli G. 2016. Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet* 17:661–678.
- Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. 2013. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: Discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14:681–691.
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, Karczewski KJ, Park J, Hitz BC, Weng S, Cherry JM, Snyder M. 2012. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* 22:1790–1797.
- Bradley J, Leibold EA, Harris ZL, Wobken JD, Clarke S, Zumbrennen KB, Eisenstein RS, Georgieff MK. 2004. Influence of gestational age and fetal iron status on IRP activity and iron transporter protein expression in third-trimester human placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R894–901.
- Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C. 2011. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* 140:1261–1271.e1.
- Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, Graaff B de, McLaren CE, Loréal O. 2018. Haemochromatosis. *Nature Reviews Disease Primers* 4:18016.

-
- Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. 2012. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1820:403–410.
- Brissot P, Wright TL, Ma WL, Weisiger RA. 1985. Efficient clearance of non-transferrin-bound iron by rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states. *J Clin Invest* 76:1463–1470.
- Brudevold R, Hole T, Hammerstrøm J. 2008. Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. *PLOS ONE* 3:e3547.
- Buel GR, Walters KJ. 2022. Can AlphaFold2 predict the impact of missense mutations on structure? *Nat Struct Mol Biol* 29:1–2.
- Buenrostro JD, Wu B, Litzenburger UM, Ruff D, Gonzales ML, Snyder MP, Chang HY, Greenleaf WJ. 2015. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* 523:486–490.
- Burger P, Hilarius-Stokman P, Korte D de, Berg TK van den, Bruggen R van. 2012. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* 119:5512–5521.
- Burke TW, Kadonaga JT. 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of drosophila. *Genes Dev* 11:3020–3031.
- Cairo G, Pietrangelo A. 2000. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J* 352 Pt 2:241–250.
- Callebaut I, Joubrel R, Pissard S, Kannengiesser C, Gérolami V, Ged C, Cadet E, Cartault F, Ka C, Gourlaouen I, Gourhant L, Oudin C, et al. 2014. Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Hum Mol Genet* 23:4479–4490.
- Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP. 1997. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 53:621–645.
- Camaschella C, Roetto A, Calì A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P. 2000. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 25:14–15.
- Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Core AB, Wang C-Y, Nairz M, Bouley R, Swirski FK, Babitt JL. 2017. Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. *Blood* 129:405–414.
- Cao C, Prado MA, Sun L, Rockowitz S, Sliz P, Paulo JA, Finley D, Fleming MD. 2021. Maternal iron deficiency modulates placental transcriptome and proteome in mid-gestation of mouse pregnancy. *J Nutr* 151:1073–1083.
- Cao H, Wang J, He L, Qi Y, Zhang JZ. 2019. DeepDDG: Predicting the stability change of protein point mutations using neural networks. *J Chem Inf Model* 59:1508–1514.

-
- Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. 2005. I-Mutant2.0: Predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res* 33:W306–W310.
- Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CAM, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest ARR, Alkema WB, et al. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 38:626–635.
- Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. 2009. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl)* 87:471–480.
- Cassinari K, Quenez O, Joly-Hélas G, Beaussire L, Le Meur N, Castelain M, Goldenberg A, Guerrot A-M, Brehin A-C, Deleuze J-F, Boland A, Rovelet-Lecrux A, et al. 2019. A simple, universal, and cost-efficient digital PCR method for the targeted analysis of copy number variations. *Clin Chem* 65:1153–1160.
- Cassinari K, Rovelet-Lecrux A, Tury S, Quenez O, Richard A-C, Charbonnier C, Olaso R, Boland A, Deleuze J-F, Besancenot J-F, Delpont B, Pouliquen D, et al. 2020. Haploinsufficiency of the primary familial brain calcification gene *SLC20A2* mediated by disruption of a regulatory element. *Mov Disord* 35:1336–1345.
- Cazzola M, Arosio P, Bellotti V, Bergamaschi G, Dezza L, Iacobello C, Ruggeri G, Zappone E, Albertini A, Ascarì E. 1985. Immunological reactivity of serum ferritin in patients with malignancy. *Tumori* 71:547–554.
- Cazzola M, Cremonesi L, Papaioannou M, Soriani N, Kioumi A, Charalambidou A, Paroni R, Romtsou K, Levi S, Ferrari M, Arosio P, Christakis J. 2002. Genetic hyperferritinaemia and reticuloendothelial iron overload associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (*SLC11A3*). *Br J Haematol* 119:539–546.
- Cellier MFM. 2017. Developmental control of *NRAMP1* (*SLC11A1*) expression in professional phagocytes. *Biology (Basel)* 6:E28.
- Celma Nos F, Hernández G, Ferrer-Cortès X, Hernandez-Rodriguez I, Navarro-Almenzar B, Fuster JL, Bermúdez Cortés M, Pérez-Montero S, Tornador C, Sanchez M. 2021. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome: Ferritin I gene and physiopathology behind the disease-report of new cases. *Int J Mol Sci* 22:5451.
- Charlebois E, Pantopoulos K. 2021. Iron overload inhibits BMP/SMAD and IL-6/STAT3 signaling to hepcidin in cultured hepatocytes. *PLoS One* 16:e0253475.
- Chen H, Tian Y, Shu W, Bo X, Wang S. 2012. Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLOS ONE* 7:e41374.
- Chen L, Widom J. 2005. Mechanism of transcriptional silencing in yeast. *Cell* 120:37–48.

-
- Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, Hyde BB, Shirihai OS, Ward DM, Kaplan J, Paw BH. 2009. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16263–16268.
- Chen Y, Zhang Y, Wang Y, Zhang L, Brinkman EK, Adam SA, Goldman R, Steensel B van, Ma J, Belmont AS. 2018. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-seq as a cytological ruler. *Journal of Cell Biology* 217:4025–4048.
- Cheng L, Li H, Li L, Liu C, Yan S, Chen H, Li Y. 2020. Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Lab Anal* 34:e23618.
- Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. 2004. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 116:565–576.
- Chiabrando D, Marro S, Mercurio S, Giorgi C, Petrillo S, Vinchi F, Fiorito V, Fagoonee S, Camporeale A, Turco E, Merlo GR, Silengo L, et al. 2012. The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J Clin Invest* 122:4569–4579.
- Cianetti L, Segnalini P, Calzolari A, Morsilli O, Felicetti F, Ramoni C, Gabbianelli M, Testa U, Sposi NM. 2005. Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. *Haematologica* 90:1595–1606.
- Clark RJ, Tan CC, Preza GC, Nemeth E, Ganz T, Craik DJ. 2011. Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chemistry & Biology* 18:336–343.
- Collobert M, Bocher O, Le Nabec A, Génin E, Férec C, Moisan S. 2021. CFTR cooperative cis-regulatory elements in intestinal cells. *Int J Mol Sci* 22:2599.
- Concordet J-P, Haeussler M. 2018. CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res* 46:W242–W245.
- Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedinger C, Chambon P. 1980. Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209:1406–1414.
- Corradin O, Scacheri PC. 2014. Enhancer variants: Evaluating functions in common disease. *Genome Medicine* 6:85.
- Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL. 2011. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology* 54:273–284.
- Cozzi A, Santambrogio P, Privitera D, Broccoli V, Rotundo LI, Garavaglia B, Benz R, Altamura S, Goede JS, Muckenthaler MU, Levi S. 2013. Human l-ferritin deficiency is characterized by idiopathic generalized seizures and atypical restless leg syndrome. *Journal of Experimental Medicine* 210:1779–1791.

Cremonesi L, Cozzi A, Girelli D, Ferrari F, Fermo I, Foglieni B, Levi S, Bozzini C, Camparini M, Ferrari M, Arosio P. 2004. Case report: A subject with a mutation in the ATG start codon of l-ferritin has no haematological or neurological symptoms. *J Med Genet* 41:e81.

Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG, Chinnery PF, Coulthard A, Jackson MJ, Jackson AP, McHale DP, Hay D, Barker WA, et al. 2001. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* 28:350–354.

D'Alessio F, Hentze MW, Muckenthaler MU. 2012. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *Journal of Hepatology* 57:1052–1060.

Daher R, Kannengiesser C, Houamel D, Lefebvre T, Bardou-Jacquet E, Ducrot N, Kerguenec C de, Jouanolle A-M, Robreau A-M, Oudin C, Le Gac G, Moulouel B, et al. 2016. Heterozygous mutations in BMP6 pro-peptide lead to inappropriate hepcidin synthesis and moderate iron overload in humans. *Gastroenterology* 150:672–683.e4.

Dao LTM, Galindo-Albarrán AO, Castro-Mondragon JA, Andrieu-Soler C, Medina-Rivera A, Souaid C, Charbonnier G, Griffon A, Vanhille L, Stephen T, Alomairi J, Martin D, et al. 2017. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. *Nat Genet* 49:1073–1081.

Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nürnberg P, Neto JC, Brunoni D, Tommerup N, Ott CE, Klopocki E, Seemann P, Mundlos S. 2009. Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *The American Journal of Human Genetics* 84:483–492.

Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. 2010. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLOS Computational Biology* 6:e1001025.

Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* 295:1306–1311.

Delaby C, Pilard N, Hetet G, Driss F, Grandchamp B, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. 2005. A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Exp Cell Res* 310:43–53.

Deng W, Roberts SGE. 2005. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev* 19:2418–2423.

Deshpande CN, Ruwe TA, Shawki A, Xin V, Vieth KR, Valore EV, Qiao B, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B, Jormakka M. 2018. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat Commun* 9:

Détivaud L, Island M-L, Jouanolle A-M, Ropert M, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Mosser A, Leroyer P, Deugnier Y, David V, Brissot P, Loréal O. 2013. Ferroportin diseases: Functional studies, a link between

genetic and clinical phenotype. *Human Mutation* 34:1529–1536.

Deugnier Y, Bardou-Jacquet É, Lainé F. 2017. Dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS). *Presse Med* 46:e306–e311.

Devalia V, Carter K, Walker AP, Perkins SJ, Worwood M, May A, Dooley JS. 2002. Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3–base pair deletion in the ferroportin 1 gene(SLC11A3). *Blood* 100:695–697.

Dhillon BK, Chopra G, Jamwal M, Chandak GR, Duseja A, Malhotra P, Chawla YK, Garewal G, Das R. 2018. Adult onset hereditary hemochromatosis is associated with a novel recurrent hemojuvelin (HJV) gene mutation in north indians. *Blood Cells Mol Dis* 73:14–21.

Diao Y, Fang R, Li B, Meng Z, Yu J, Qiu Y, Lin KC, Huang H, Liu T, Marina RJ, Jung I, Shen Y, et al. 2017. A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells. *Nat Methods* 14:629–635.

Diaz LA, Bardelli A. 2014. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32:579–586.

Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. 2012a. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485:376–380.

Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, Stockwell BR. 2012b. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149:1060–1072.

Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, et al. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 34:184–191.

Dolgin E. 2017. DNA's secret weapon against knots and tangles. *Nature* 544:284–286.

Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. 2003. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3:285–296.

Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X. 2015. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet* 24:2125–2137.

Dong S, Boyle AP. 2019. Predicting functional variants in enhancer and promoter elements using RegulomeDB. *Hum Mutat* 40:1292–1298.

Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. 2011. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: A promising therapeutic target. *Journal of Hepatology* 55:920–932.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, et al. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776–781.

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 1:191–200.

Dostalíkova-Cimbuřová M, Balusíková K, Krátka K, Chmelíková J, Hejda V, Hnaníček J, Neubauerová J, Vranová J, Kovář J, Horák J. 2014. Role of duodenal iron transporters and hepcidin in patients with alcoholic liver disease. *J Cell Mol Med* 18:1840–1850.

Dostie J, Richmond TA, Arnaout RA, Selzer RR, Lee WL, Honan TA, Rubio ED, Krumm A, Lamb J, Nusbaum C, Green RD, Dekker J. 2006. Chromosome conformation capture carbon copy (5C): A massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res* 16:1299–1309.

Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, Elling RA, Liu S, Triantafellow E, Menon S, Wang Z, Honda A, Pardee G, Cantwell J, Luu C, et al. 2014. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol* 16:1069–1079.

Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJH, Townsend ARM. 2005. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* 106:1092–1097.

Drew D, North RA, Nagarathinam K, Tanabe M. 2021. Structures and general transport mechanisms by the major facilitator superfamily (MFS). *Chem Rev* 121:5289–5335.

El Khattabi LA, Rouillac-Le Sciellour C, Le Tessier D, Luscan A, Coustier A, Porcher R, Bhourri R, Nectoux J, Sérazin V, Quibel T, Mandelbrot L, Tsatsaris V, et al. 2016. Could digital PCR be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: A proof of concept study. *PLoS One* 11:e0155009.

Ellervik C, Marott JL, Tybjærg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. 2014. Total and cause-specific mortality by moderately and markedly increased ferritin concentrations: General population study and metaanalysis. *Clinical Chemistry* 60:1419–1428.

ENCODE Project Consortium. 2004. The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project. *Science* 306:636–640.

European Association For The Study Of The Liver. 2010. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 53:3–22.

Fan Y, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Akita M, Suto K, Tsuchida S. 2009. Ferritin expression in rat hepatocytes and kupffer cells after lead nitrate treatment. *Toxicol Pathol* 37:209–217.

Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M. 1995. Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet* 4:415–422.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, et al. 1996. A novel MHC class i-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13:399–408.

Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC. 1997. The hemochromatosis founder mutation in HLA-h disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 272:14025–14028.

Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T, Nemeth E. 2009. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood* 114:437–443.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD, Snyder SH. 1999. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1:152–157.

Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, Rosen N, Kohn A, Twik M, Safran M, Lancet D, Cohen D. 2017. GeneHancer: Genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. Database (Oxford) 2017:

Flavahan WA, Drier Y, Liao BB, Gillespie SM, Venteicher AS, Stemmer-Rachamimov AO, Suvà ML, Bernstein BE. 2016. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* 529:110–114.

Flemming W. 1882. *Zellsubstanz, Kern Und Zelltheilung.* Leipzig, F. C. W. Vogel. 482 p.

Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DHG. 2002. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 122:281–289.

Forrest LR, Krämer R, Ziegler C. 2011. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1807:167–188.

Franke M, Ibrahim DM, Andrey G, Schwarzer W, Heinrich V, Schöpflin R, Kraft K, Kempfer R, Jerković I, Chan W-L, Spielmann M, Timmermann B, et al. 2016. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature* 538:265–269.

Fudenberg G, Imakaev M, Lu C, Goloborodko A, Abdennur N, Mirny LA. 2016. Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Rep* 15:2038–2049.

Fullwood MJ, Liu MH, Pan YF, Liu J, Xu H, Mohamed YB, Orlov YL, Velkov S, Ho A, Mei PH, Chew EGY, Huang PYH, et al. 2009. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 462:58–64.

Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. 2012. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol* 26:115–119.

-
- Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, Tienoven D van, Wetzels JFM, Kiemeny LALM, Sweep FC, Heijer M den, Swinkels DW. 2011. Serum hepcidin: Reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 117:e218–e225.
- Gammella E, Buratti P, Cairo G, Recalcati S. 2014. Macrophages: Central regulators of iron balance. *Metallomics* 6:1336–1345.
- Ganz T. 2013. Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews* 93:1721–1741.
- Ganz T. 2016. Macrophages and iron metabolism. *Microbiology Spectrum* 4:
- Ganz T. 2018. Erythrocytes and erythroblasts give up iron. *Blood* 132:2004–2005.
- Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang A-S, Enns CA. 2009. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 9:217–227.
- Gasperini M, Findlay GM, McKenna A, Milbank JH, Lee C, Zhang MD, Cusanovich DA, Shendure J. 2017. CRISPR/Cas9-mediated scanning for regulatory elements required for HPRT1 expression via thousands of large, programmed genomic deletions. *The American Journal of Human Genetics* 101:192–205.
- Gasperini M, Tome JM, Shendure J. 2020. Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers. *Nat Rev Genet* 21:292–310.
- Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel H-D, Bents K, Veltkamp C, Stremmel W. 2003. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: Evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood* 102:371–376.
- Geissler C, Singh M. 2011. Iron, meat and health. *Nutrients* 3:283–316.
- Geng N, Shi B-J, Li S-L, Zhong Z-Y, Li Y-C, Xua W-L, Zhou H, Cai J-H. 2018. Knockdown of ferroportin accelerates erastin-induced ferroptosis in neuroblastoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22:3826–3836.
- Gerasimavicius L, Livesey BJ, Marsh JA. 2022. Loss- of-function, gain-of-function and dominant-negative mutations have profoundly different effects on protein structure. *Nat Commun* 13:3895.
- Ghosh S, Hevi S, Chuck SL. 2004. Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes. *Blood* 103:2369–2376.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6:343–345.
- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, et al. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154:442–451.

-
- Girault A, Haelters J-P, Potier-Cartereau M, Chantome A, Pinault M, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Simon G, Couthon-Gourvès H, Jaffrès P-A, Corbel B, Bougnoux P, et al. 2011. New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and occurrence of metastasis. *Curr Cancer Drug Targets* 11:1111–1125.
- Girelli D, Ouvieri O, Franceschi LD, Corrocher R, Bergamaschi G, Cazzola M. 1995. A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract. *British Journal of Haematology* 90:931–934.
- Gonçalves AS, Muzeau F, Blaybel R, Hetet G, Driss F, Delaby C, Canonne-Hergaux F, Beaumont C. 2006. Wild-type and mutant ferroportins do not form oligomers in transfected cells. *Biochem J* 396:265–275.
- Goodnough JB, Ramos E, Nemeth E, Ganz T. 2012. Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology* 56:291–299.
- Gordeuk VR, Caleffi A, Corradini E, Ferrara F, Jones RA, Castro O, Onyekwere O, Kittles R, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Gangaidzo IT, et al. 2003. Iron overload in africans and african-americans and a common mutation in the SCL40A1 (ferroportin 1) gene. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 31:299–304.
- Graham RM, Reutens GM, Herbison CE, Delima RD, Chua ACG, Olynyk JK, Trinder D. 2008. Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *Journal of Hepatology* 48:327–334.
- Grandchamp B, Hetet G, Kannengiesser C, Oudin C, Beaumont C, Rodrigues-Ferreira S, Amson R, Telerman A, Nielsen P, Kohne E, Balser C, Heimpel H. 2011. A novel type of congenital hypochromic anemia associated with a nonsense mutation in the STEAP3/TSAP6 gene. *Blood* 118:6660–6666.
- Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW, Bruford EA. 2015. Genenames.org: The HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res* 43:D1079–1085.
- Green R, Charlton R, Seftel H, Bothwell T, Mayet F, Adams B, Finch C, Layrisse M. 1968. Body iron excretion in man: A collaborative study. *Am J Med* 45:336–353.
- Grewal SIS, Jia S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8:35–46.
- Griffith JK, Baker ME, Rouch DA, Page MG, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA, Henderson PJ. 1992. Membrane transport proteins: Implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol* 4:684–695.
- Gromiha MM, An J, Kono H, Oobatake M, Uedaira H, Sarai A. 1999. ProTherm: Thermodynamic database for proteins and mutants. *Nucleic Acids Res* 27:286–288.
- Gross DS, Garrard WT. 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 57:159–197.

Guelen L, Pagie L, Brasslet E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, Klein A de, Wessels L, Laat W de, Steensel B van. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453:948–951.

Guellec J, Elbahnsi A, Le Tertre M, Uguen K, Gourlaouen I, Férec C, Ka C, Callebaut I, Le Gac G. 2019. Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB J* fj201901857R.

Guida C, Altamura S, Klein FA, Galy B, Boutros M, Ulmer AJ, Hentze MW, Muckenthaler MU. 2015. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood* 125:2265–2275.

Gunshin H, Allerson CR, Polycarpou-Schwarz M, Rofts A, Rogers JT, Kishi F, Hentze MW, Rouault TA, Andrews NC, Hediger MA. 2001. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett* 509:309–316.

Guo S, Casu C, Gardenghi S, Booten S, Aghajan M, Peralta R, Watt A, Freier S, Monia BP, Rivella S. 2013a. Reducing Tmprss6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice. *J Clin Invest* 123:1531–1541.

Guo W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S, Chan SY, Serra C, Jasuja R, Travis TG, Muckenthaler MU, Nemeth E, et al. 2013b. Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. *Aging Cell* 12:280–291.

Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. 1992. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia. *J Gen Intern Med* 7:145–153.

Haberle V, Stark A. 2018. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:621–637.

Hagège H, Klous P, Braem C, Splinter E, Dekker J, Cathala G, Laat W de, Forné T. 2007. Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nature Protocols* 2:1722–1733.

Han SH, Odathurai Saminathan S, Kim S-J. 2010. Insulin stimulates gene expression of ferritin light chain in osteoblast cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 111:1493–1500.

Hann HL, Stahlhut MW, Millman I. 1984. Human ferritins present in the sera of nude mice transplanted with human neuroblastoma or hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 44:3898–3901.

Hanson EH, Imperatore G, Burke W. 2001. HFE gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 154:193–206.

Harada N, Kanayama M, Maruyama A, Yoshida A, Tazumi K, Hosoya T, Mimura J, Toki T, Maher JM, Yamamoto M, Itoh K. 2011. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch Biochem Biophys* 508:101–109.

Härmälä SK, Butcher R, Roberts CH. 2017. Copy number variation analysis by droplet digital PCR. In: Kaufmann M, Klinger C, Savelsbergh A, editors. *Functional Genomics: Methods and Protocols*, New York, NY: Springer, p 135–149.

Harris MB, Mostecky J, Rothman PB. 2005. Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function. *J Biol Chem* 280:13114–13121.

Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10812–10817.

Harris ZL, Migas MC, Hughes AE, Logan JI, Gitlin JD. 1996. Familial dementia due to a frameshift mutation in the caeruloplasmin gene. *QJM: An International Journal of Medicine* 89:355–360.

Harrison PM, Arosio P. 1996. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275:161–203.

Harrison-Findik DD, Klein E, Crist C, Evans J, Timchenko N, Gollan J. 2007. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology* 46:1979–1985.

Haute Autorité de Santé HAS. 2005.

Havrilla JM, Pedersen BS, Layer RM, Quinlan AR. 2019. A map of constrained coding regions in the human genome. *Nat Genet* 51:88–95.

Hayashi A, Wada Y, Suzuki T, Shimizu A. 1993. Studies on familial hypotransferrinemia: Unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet* 53:201–213.

Hazard JT, Drysdale JW. 1977. Ferritinaemia in cancer. *Nature* 265:755–756.

He HH, Meyer CA, Shin H, Bailey ST, Wei G, Wang Q, Zhang Y, Xu K, Ni M, Lupien M, Mieczkowski P, Lieb JD, et al. 2010. Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nat Genet* 42:343–347.

Hegde MR, Crowley MR. 2019. 4 - genome and gene structure. In: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)*, Academic Press, p 53–77.

Heilmeyer L. 1966. Die atranferrinämien. *AHA* 36:40–49.

Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, et al. 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459:108–112.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, et al. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39:311–318.

Hellman NE, Gitlin JD. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22:439–458.

Hentze MW, Caughman SW, Rouault TA, Barriocanal JG, Dancis A, Harford JB, Klausner RD. 1987. Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science* 238:1570–1573.

Hentze MW, Kühn LC. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8175–8182.

Hirai T, Heymann JAW, Shi D, Sarker R, Maloney PC, Subramaniam S. 2002. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat Struct Mol Biol* 9:597–600.

Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, et al. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31:827–832.

Huang D, Ovcharenko I. 2022. Enhancer-silencer transitions in the human genome. *Genome Res* 32:437–448.

Huang PL. 2009. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms* 2:231–237.

Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang D-N. 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301:616–620.

Husar-Memmer E, Stadlmayr A, Datz C, Zwerina J. 2014. HFE-related hemochromatosis: An update for the rheumatologist. *Curr Rheumatol Rep* 16:393.

Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Højrup P, Møller HJ, Moestrup SK. 2005. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* 106:2572–2579.

Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, et al. 2016. REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *The American Journal of Human Genetics* 99:877–885.

Island M-L, Jouanolle A-M, Mosser A, Deugnier Y, David V, Brissot P, Loréal O. 2009. A new mutation in the hepcidin promoter impairs its BMP response and contributes to a severe phenotype in HFE related hemochromatosis. *Haematologica* 94:720–724.

Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. 1972. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J* 4:206–208.

Jacolot S, Férec C, Mura C. 2008. Iron responses in hepatic, intestinal and macrophage/monocyte cell lines under different culture conditions. *Blood Cells Mol Dis* 41:100–108.

Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, Quere I, Mura C, Férec C. 2004. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood* 103:2835–2840.

-
- Jardetzky O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211:969–970.
- Jessen-Marshall AE, Paul NJ, Brooker RJ. 1995. The conserved motif, GXXX(d/e)(r/k)XG[x](r/k)(r/k), in hydrophilic loop 2/3 of the lactose permease. *J Biol Chem* 270:16251–16257.
- Jiang D, Zhao Y, Wang X, Fan J, Heng J, Liu X, Feng W, Kang X, Huang B, Liu J, Zhang XC. 2013. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:14664–14669.
- Jiang L, Wang J, Wang K, Wang H, Wu Q, Yang C, Yu Y, Ni P, Zhong Y, Song Z, Xie E, Hu R, et al. 2021. RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by modulating ferroportin degradation. *Blood* blood.2020008986.
- Jiang S, Fang X, Liu M, Ni Y, Ma W, Zhao R. 2019. MiR-20b down-regulates intestinal ferroportin expression in vitro and in vivo. *Cells* 8:E1135.
- Jolly LA, Parnell E, Gardner AE, Corbett MA, Pérez-Jurado LA, Shaw M, Lesca G, Keegan C, Schneider MC, Griffin E, Maier F, Kiss C, et al. 2020. Missense variant contribution to USP9X-female syndrome. *NPJ Genom Med* 5:53.
- Jończy A, Mazgaj R, Smuda E, Żelazowska B, Kopeć Z, Starzyński RR, Lipiński P. 2021. The role of copper in the regulation of ferroportin expression in macrophages. *Cells* 10:2259.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, et al. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596:583–589.
- Ka C, Guellec J, Pepermans X, Kannengiesser C, Ged C, Wuyts W, Cassiman D, Ledinghen V de, Varet B, Kerguenec C de, Oudin C, Gourlaouen I, et al. 2018. The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica* 103:1796–1805.
- Ka C, Le Gac G, Dupradeau F-Y, Rochette J, Férec C. 2005. The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for the mutated 282Y HFE protein. *Hum Genet* 117:467–475.
- Kabat GC, Rohan TE. 2007. Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. *Cancer Causes Control* 18:1047–1053.
- Kannengiesser C, Jouanolle A-M, Hetet G, Mosser A, Muzeau F, Henry D, Bardou-Jacquet E, Mornet M, Brissot P, Deugnier Y, Grandchamp B, Beaumont C. 2009. A new missense mutation in the I ferritin coding sequence associated with elevated levels of glycosylated ferritin in serum and absence of iron overload. *Haematologica* 94:335–339.
- Katainen R, Dave K, Pitkänen E, Palin K, Kivioja T, Välimäki N, Gylfe AE, Ristolainen H, Hänninen UA,

-
- Cajuso T, Kondelin J, Tanskanen T, et al. 2015. CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer. *Nat Genet* 47:818–821.
- Kato J, Fujikawa K, Kanda M, Fukuda N, Sasaki K, Takayama T, Kobune M, Takada K, Takimoto R, Hamada H, Ikeda T, Niitsu Y. 2001. A mutation, in the iron-responsive element of h ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *The American Journal of Human Genetics* 69:191–197.
- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. 2014. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 46:678–684.
- Kawabata H. 2019. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med* 133:46–54.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996–1006.
- Kernan KF, Carcillo JA. 2017. Hyperferritinemia and inflammation. *International Immunology* 29:401–409.
- Kim D, An H, Shearer RS, Sharif M, Fan C, Choi J-O, Ryu S, Park Y. 2019. A principled strategy for mapping enhancers to genes. *Sci Rep* 9:11043.
- Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanenkov VV, Ren B. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128:1231–1245.
- Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. 2014. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46:310–315.
- Klei TRL, Meinderts SM, Berg TK van den, Bruggen R van. 2017. From the cradle to the grave: The role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis. *Front Immunol* 8:73.
- Kleinjan D-J, Coutinho P. 2009. Cis-rupture mechanisms: Disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 8:317–332.
- Kleven MD, Jue S, Enns CA. 2018. Transferrin receptors TfR1 and TfR2 bind transferrin through differing mechanisms. *Biochemistry* 57:1552–1559.
- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. 2008. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 88:7–15.
- Kok YJM de, Vossenaar ER, Cremers CWRJ, Dahl N, Laporte J, Jia Hu L, Lacombe D, Fischel-Ghodsian N, Friedman RA, Parnes LS, Thorpe P, Bitner-Glindzicz M, et al. 1996. Identification of a hot spot for microdeletions in patients with x-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. *Human Molecular Genetics* 5:1229–1235.
- Koller DL, Imel EA, Lai D, Padgett LR, Acton D, Gray A, Peacock M, Econs MJ, Foroud T. 2016. Genome-wide association study of serum iron phenotypes in premenopausal women of european descent.

Blood Cells Mol Dis 57:50–53.

Konijn AM, Carmel N, Levy R, Hershko C. 1981. Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanism of increased ferritin synthesis. Br J Haematol 49:361–370.

Konijn AM, Hershko C. 1977. Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release. Br J Haematol 37:7–16.

Kossel AK. 1911. Ueber die chemische beschaffenheit des zellkerns, munchen med. Wochenschrift, vol.58, pp.65-69, 1911. 58:65–69.

Kovtunovych G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA. 2010. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: Effects on macrophage viability and tissue iron distribution. Blood 116:6054–6062.

Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett 480:147–150.

Krijger PHL, Geeven G, Bianchi V, Hilvering CRE, Laat W de. 2019. 4C-seq from beginning to end: A detailed protocol for sample preparation and data analysis. Methods.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature 409:198–201.

Kuhlmann K, Cieselski M, Schumann J. 2021. Relative versus absolute RNA quantification: A comparative analysis based on the example of endothelial expression of vasoactive receptors. Biological Procedures Online 23:6.

Kumar H, Finer-Moore JS, Kaback HR, Stroud RM. 2015. Structure of LacY with an α -substituted galactoside: Connecting the binding site to the protonation site. Proceedings of the National Academy of Sciences 112:9004–9009.

Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenkov V, Reik W, Ohlsson R. 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. Proc Natl Acad Sci U S A 103:10684–10689.

Laarakkers CMM, Wiegerinck ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AM, Tjalsma H, Swinkels DW. 2013. Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: Detection and characterization of a novel hepcidin isoform. PLoS One 8:e75518.

Laganowsky A, Reading E, Allison TM, Ulmschneider MB, Degiacomi MT, Baldwin AJ, Robinson CV. 2014. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. Nature 510:172–175.

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

-
- Laimer J, Hofer H, Fritz M, Wegenkittl S, Lackner P. 2015. MAESTRO-multi agent stability prediction upon point mutations. *BMC Bioinformatics* 16:116.
- Lakhal-Littleton S, Wolna M, Carr CA, Miller JJJ, Christian HC, Ball V, Santos A, Diaz R, Biggs D, Stillion R, Holdship P, Lerner F, et al. 2015. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:3164–3169.
- Landemaine A, Hamdi-Roze H, Cunat S, Loustaud-Ratti V, Causse X, Si Ahmed SN, Drenou B, Bureau C, Pelletier G, De Kerguenec C, Ganne-Carrie N, Durupt S, et al. 2021. A simple clinical score to promote and enhance ferroportin disease screening. *J Hepatol* S0168-8278(21)02163-2.
- Latour C, Besson-Fournier C, Gourbeyre O, Meynard D, Roth M-P, Coppin H. 2017. Deletion of BMP6 worsens the phenotype of HJV-deficient mice and attenuates hepcidin levels reached after LPS challenge. *Blood* 130:2339–2343.
- Latour C, Kautz L, Besson-Fournier C, Island M-L, Canonne-Hergaux F, Loréal O, Ganz T, Coppin H, Roth M-P. 2013. Testosterone perturbs systemic iron balance through activation of EGFR signaling in the liver and repression of hepcidin. *Hepatology* 59:683–694.
- Law CJ, Maloney PC, Wang D-N. 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* 62:289–305.
- Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, Galluser R, Borhani DW, Harrison SC. 1999. Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286:779–782.
- Le Gac G, Dupradeau F-Y, Mura C, Jacolot S, Scotet V, Esnault G, Mercier A-Y, Rochette J, Férec C. 2003. Phenotypic expression of the C282Y/Q283P compound heterozygosity in HFE and molecular modeling of the Q283P mutation effect. *Blood Cells Mol Dis* 30:231–237.
- Le Gac G, Férec C. 2005. The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur J Hum Genet* 13:1172–1185.
- Le Gac G, Gourlaouen I, Ka C, Férec C. 2016. The p.Leu96Pro missense mutation in the BMP6 gene is repeatedly associated with hyperferritinemia in patients of french origin. *Gastroenterology* 151:769–770.
- Le Gac G, Gourlaouen I, Ronsin C, Géromel V, Bourgarit A, Parquet N, Quemener S, Le Maréchal C, Chen J-M, Férec C. 2008. Homozygous deletion of HFE produces a phenotype similar to the HFE p.C282Y/p.C282Y genotype. *Blood* 112:5238–5240.
- Le Gac G, Ka C, Joubrel R, Gourlaouen I, Lehn P, Mornon J-P, Férec C, Callebaut I. 2013. Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): Effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Hum Mutat* 34:1371–1380.
- Le Gac G, Mons F, Jacolot S, Scotet V, Férec C, Frébourg T. 2004a. Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north french

descent. *Br J Haematol* 125:674–678.

Le Gac G, Scotet V, Gourlaouen I, L'Hostis C, Merour M-C, Karim Z, Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Lefebvre T, Assari S, Férec C. 2022. Prevalence of HFE-related haemochromatosis and secondary causes of hyperferritinaemia and their association with iron overload in 1059 french patients treated by venesection. *Aliment Pharmacol Ther* 55:1016–1027.

Le Gac G, Scotet V, Ka C, Gourlaouen I, Bryckaert L, Jacolot S, Mura C, Férec C. 2004b. The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum Mol Genet* 13:1913–1918.

Le Lan C, Mosser A, Ropert M, Detivaud L, Loustaud-Ratti V, Vital-Durand D, Roget L, Bardou-Jacquet E, Turlin B, David V, Loréal O, Deugnier Y, et al. 2011. Sex and acquired cofactors determine phenotypes of ferroportin disease. *Gastroenterology* 140:1199-1207.e1-2.

Le Tertre M, Elbahnsi A, Ka C, Callebaut I, Le Gac G. 2021a. Insights into the role of the discontinuous TM7 helix of human ferroportin through the prism of the Asp325 residue. *Int J Mol Sci* 22:6412.

Le Tertre M, Ka C, Guellec J, Gourlaouen I, Férec C, Callebaut I, Le Gac G. 2017. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare SLC40A1 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfus Clin Biol* 24:462–467.

Le Tertre M, Ka C, Raud L, Berlivet I, Gourlaouen I, Richard G, Uguen K, Chen J-M, Férec C, Fichou Y, Le Gac G. 2021b. Splicing analysis of SLC40A1 missense variations and contribution to hemochromatosis type 4 phenotypes. *Blood Cells Mol Dis* 87:102527.

Lee Y-S, Kim Y-H, Jung YS, Kim K-S, Kim D-K, Na S-Y, Lee J-M, Lee C-H, Choi H-S. 2017. Hepatocyte toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced hepcidin expression. *Exp Mol Med* 49:e408–e408.

Létocart E, Le Gac G, Majore S, Ka C, Radio FC, Gourlaouen I, De Bernardo C, Férec C, Grammatico P. 2009. A novel missense mutation in SLC40A1 results in resistance to hepcidin and confirms the existence of two ferroportin-associated iron overload diseases. *British Journal of Haematology* 147:379–385.

Lewis BA, Kim TK, Orkin SH. 2000. A downstream element in the human beta-globin promoter: Evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7172–7177.

Li J, Parker B, Martyn C, Natarajan C, Guo J. 2013. The PMP22 gene and its related diseases. *Mol Neurobiol* 47:673–698.

Li L, Hao Y, Zhao Y, Wang H, Zhao X, Jiang Y, Gao F. 2018a. Ferroptosis is associated with oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced sertoli cell death. *Int J Mol Med* 41:3051–3062.

Li S, Yang Y, Li W. 2020. Human ferroportin mediates proton-coupled active transport of iron. *Blood Advances* 4:4758–4768.

Li Y, Hu M, Shen Y. 2018b. Gene regulation in the 3D genome. *Hum Mol Genet* 27:R228–R233.

Lieberman-Aiden E, Berkum NL van, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, et al. 2009a. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326:289–293.

Lieberman-Aiden E, Berkum NL van, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, et al. 2009b. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326:289–293.

Lim PJ, Duarte TL, Arezes J, Garcia-Santos D, Hamdi A, Pasricha S-R, Armitage AE, Mehta H, Wideman S, Santos AG, Santos-Gonçalves A, Morovat A, et al. 2019. Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nat Metab* 1:519–531.

Liu G, Zhang Y, Zhang T. 2020. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Comput Struct Biotechnol J* 18:35–44.

Liu X. 2019. SLC family transporters. *Adv Exp Med Biol* 1141:101–202.

Liu X-B, Nguyen N-BH, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. 2005a. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35:47–56.

Liu X-B, Yang F, Haile DJ. 2005b. Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35:33–46.

Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. 2006. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13612–13617.

Lobanenkov VV, Nicolas RH, Adler VV, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja AV, Goodwin GH. 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5:1743–1753.

Logan JI, Harveyson KB, Wisdom GB, Hughes AE, Archbold GP. 1994. Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus. *QJM* 87:663–670.

Long HK, Prescott SL, Wysocka J. 2016. Ever-changing landscapes: Transcriptional enhancers in development and evolution. *Cell* 167:1170–1187.

Loo J-WHP van de, Creemers JWM, Bright NA, Young BD, Roebroek AJM, Ven WJMV de. 1997. Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase *. *Journal of Biological Chemistry* 272:27116–27123.

Surcharges en fer liées à *SLC40A1*: caractérisation fonctionnelle, structurale et régulation à distance

-
- Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. 2003. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 101:4148–4154.
- Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP. 1997. Hemosiderosis in cirrhosis: A study of 447 native livers. *Gastroenterology* 112:882–888.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
- Luo X, Feurstein S, Mohan S, Porter CC, Jackson SA, Keel S, Chicka M, Brown AL, Kesserwan C, Agarwal A, Luo M, Li Z, et al. 2019. ClinGen myeloid malignancy variant curation expert panel recommendations for germline RUNX1 variants. *Blood Adv* 3:2962–2979.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, et al. 2015. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161:1012–1025.
- Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DCY, Nazareth L, Bainbridge M, Dinh H, Jing C, Wheeler DA, McGuire AL, Zhang F, et al. 2010.
- Lutz HU. 2004. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50:107–116.
- Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A. 2003. The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *Journal of Hepatology* 39:710–715.
- MacDonald JR, Ziman R, Yuen RKC, Feuk L, Scherer SW. 2014. The database of genomic variants: A curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 42:D986–992.
- Maciel P, Cruz VT, Constante M, Iniesta I, Costa MC, Gallati S, Sousa N, Sequeiros J, Coutinho P, Santos MM. 2005. Neuroferritinopathy: Missense mutation in FTL causing early-onset bilateral pallidal involvement. *Neurology* 65:603–605.
- Madejczyk MS, Ballatori N. 2012. The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochim Biophys Acta* 1818:651–657.
- Majumdar DS, Smirnova I, Kasho V, Nir E, Kong X, Weiss S, Kaback HR. 2007. Single-molecule FRET reveals sugar-induced conformational dynamics in LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12640–12645.
- Malik S, Roeder RG. 2010. The metazoan mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* 11:761–772.
- Mancias JD, Pontano Vaites L, Nissim S, Biancur DE, Kim AJ, Wang X, Liu Y, Goessling W, Kimmelman AC, Harper JW. 2015. Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis. *Elife* 4:

-
- Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. 2014. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* 509:105–109.
- Marro S, Chiabrando D, Messina E, Stolte J, Turco E, Tolosano E, Muckenthaler MU. 2010. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position –7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica* 95:1261–1268.
- Martens C, Shekhar M, Borysik AJ, Lau AM, Reading E, Tajkhorshid E, Booth PJ, Politis A. 2018. Direct protein-lipid interactions shape the conformational landscape of secondary transporters. *Nat Commun* 9:4151.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783–2810.
- Maston GA, Evans SK, Green MR. 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:29–59.
- Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C. 2009. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest* 119:1159–1166.
- Mayeur C, Lohmeyer LK, Leyton P, Kao SM, Pappas AE, Kolodziej SA, Spagnolli E, Yu B, Galdos RL, Yu PB, Peterson RT, Bloch DB, et al. 2014. The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood* 123:2261–2268.
- Mayr R, Griffiths WJH, Hermann M, McFarlane I, Halsall DJ, Finkenstedt A, Douds A, Davies SE, Janecke AR, Vogel W, Cox TM, Zoller H. 2011. Identification of mutations in SLC40A1 that affect ferroportin function and phenotype of human ferroportin iron overload. *Gastroenterology* 140:2056–2063.e1.
- Mayr R, Janecke AR, Schranz M, Griffiths WJH, Vogel W, Pietrangelo A, Zoller H. 2010. Ferroportin disease: A systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *Journal of Hepatology* 53:941–949.
- McGonigle RJ, Wallin JD, Shaddock RK, Fisher JW. 1984. Erythropoietin deficiency and inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency. *Kidney Int* 25:437–444.
- McGregor JA, Shayeghi M, Vulpe CD, Anderson GJ, Pietrangelo A, Simpson RJ, McKie AT. 2005. Impaired iron transport activity of ferroportin 1 in hereditary iron overload. *J Membr Biol* 206:3–7.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, et al. 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291:1755–1759.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, et al. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell* 5:299–309.
- Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5:606–616.

-
- Messori L, Kratz F. 1994. Transferrin: From inorganic biochemistry to medicine. *Met Based Drugs* 1:161–167.
- Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth M-P. 2009. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 41:478–481.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. 1997. Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91:35–45.
- Miescher. 1871. Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen.
- Milet J, Le Gac G, Scotet V, Gourlaouen I, Thèze C, Mosser J, Bourgain C, Deugnier Y, Férec C. 2010. A common SNP near BMP2 is associated with severity of the iron burden in HFE p.C282Y homozygous patients: A follow-up study. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 44:34–37.
- Milic S, Mikolasevic I, Orlic L, Devcic E, Starcevic-Cizmarevic N, Stimac D, Kapovic M, Ristic S. 2016. The role of iron and iron overload in chronic liver disease. *Med Sci Monit* 22:2144–2151.
- Mims MP, Guan Y, Pospisilova D, Priwitzerova M, Indrak K, Ponka P, Divoky V, Prchal JT. 2005. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood* 105:1337–1342.
- Mitchell CJ, Shawki A, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B. 2014. Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *Am J Physiol Cell Physiol* 306:C450–C459.
- Mohammad G, Matakidou A, Robbins PA, Lakhali-Littleton S. 2021. The kidney hepcidin/ferroportin axis controls iron reabsorption and determines the magnitude of kidney and systemic iron overload. *Kidney Int* 100:559–569.
- Moirand R, Kerdavid F, Loréal O, Hubert N, Leroyer P, Brissot P, Lescoat G. 1995. Regulation of ferritin expression by alcohol in a human hepatoblastoma cell line and in rat hepatocyte cultures. *Journal of Hepatology* 23:431–439.
- Moirand R, Lescoat G, Delamaire D, Lauvin L, Campion JP, Deugnier Y, Brissot P. 1991. Increase in glycosylated and nonglycosylated serum ferritin in chronic alcoholism and their evolution during alcohol withdrawal. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 15:963–969.
- Moisan S, Berlivet S, Ka C, Le Gac G, Dostie J, Férec C. 2016. Analysis of long-range interactions in primary human cells identifies cooperative CFTR regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 44:2564–2576.
- Moisan S, Le Nabec A, Quillévéré A, Le Maréchal C, Férec C. 2019. Characterization of GJB2 cis-regulatory elements in the DFNB1 locus. *Hum Genet* 138:1275–1286.

-
- Moisan S, Levon S, Cornec-Le Gall E, Le Meur Y, Audrézet M-P, Dostie J, Férec C. 2018. Novel long-range regulatory mechanisms controlling PKD2 gene expression. *BMC Genomics* 19:515.
- Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. 2001. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 108:619–623.
- Moore JE, Purcaro MJ, Pratt HE, Epstein CB, Shores N, Adrian J, Kawli T, Davis CA, Dobin A, Kaul R, Halow J, Van Nostrand EL, et al. 2020. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature* 583:699–710.
- Moorthy SD, Mitchell JA. 2016. Generating CRISPR/Cas9 mediated monoallelic deletions to study enhancer function in mouse embryonic stem cells. *J Vis Exp* e53552.
- Morgan EH. 2001. Mechanisms of iron transport into rat erythroid cells. *Journal of Cellular Physiology* 186:193–200.
- Morris TJ, Litvinova MM, Ralston D, Mattman A, Holmes D, Lockitch G. 2005. A novel ferroportin mutation in a canadian family with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 35:309–314.
- Muckenthaler M, Gray NK, Hentze MW. 1998. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Molecular Cell* 2:383–388.
- Müller S, Sindikubwabo F, Cañeque T, Lafon A, Versini A, Lombard B, Loew D, Wu T-D, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Durand A, Vallot C, et al. 2020. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nat Chem* 12:929–938.
- Mumford AD, Cree IA, Arnold JD, Hagan MC, Rixon KC, Harding JJ. 2000. The lens in hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome contains crystalline deposits of l-ferritin. *British Journal of Ophthalmology* 84:697–700.
- Muriuki JM, Mentzer AJ, Band G, Gilchrist JJ, Carstensen T, Lule SA, Goheen MM, Joof F, Kimita W, Mogire R, Cutland CL, Diarra A, et al. 2019. The ferroportin Q248H mutation protects from anemia, but not malaria or bacteremia. *Sci Adv* 5:eaaw0109.
- Nairz M, Theurl I, Swirski FK, Weiss G. 2017. "Pumping iron"-how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch* 469:397–418.
- Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. 1996. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 13:233–237.
- Navegantes KC, Souza Gomes R de, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. 2017. Immune modulation of some autoimmune diseases: The critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *Journal of Translational Medicine* 15:36.

Nekhai S, Xu M, Foster A, Kasvosve I, Diaz S, Machado RF, Castro OL, Kato GJ, Taylor JG, Gordeuk VR. 2013. Reduced sensitivity of the ferroportin Q248H mutant to physiological concentrations of hepcidin. *Haematologica* 98:455–463.

Nemeth E, Preza GC, Jung C-L, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. 2006. The n-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: Structure-function study. *Blood* 107:328–333.

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. 2004a. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113:1271–1276.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. 2004b. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090–2093.

Ng PC, Henikoff S. 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11:863–874.

Ng PC, Levy S, Huang J, Stockwell TB, Walenz BP, Li K, Axelrod N, Busam DA, Strausberg RL, Venter JC. 2008. Genetic variation in an individual human exome. *PLOS Genetics* 4:e1000160.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. 2001. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knock-out mice. *PNAS* 98:8780–8785.

Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. 2002. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* 29:327–335.

Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K. 1996. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 271:21345–21352.

Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, Dongen JW van, Breuning MH, Snijders PJ, Rutten WP, Sandkuijl LA, Oostra BA, Duijn CM van, Heutink P. 2001. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 28:213–214.

Nomura N, Verdon G, Kang HJ, Shimamura T, Nomura Y, Sonoda Y, Hussien SA, Qureshi AA, Coincon M, Sato Y, Abe H, Nakada-Nakura Y, et al. 2015. Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5. *Nature* 526:397–401.

O'Brien KO. 2021. Maternal, fetal and placental regulation of placental iron trafficking. *Placenta* S0143-4004(21)00667-6.

Ogbourne S, Antalis TM. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 (Pt 1):1–14.

-
- Ogilvie C, Gaffney D, Murray H, Kerry A, Haig C, Spooner R, Fitzsimons EJ. 2015. Improved detection of hereditary haemochromatosis. *Journal of Clinical Pathology* 68:218–221.
- Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. 2005. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 37:1264–1269.
- Ong C-T, Corces VG. 2014. CTCF: An architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet* 15:234–246.
- Onuchic JN, Wolynes PG. 2004. Theory of protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 14:70–75.
- Orbach H, Zandman-Goddard G, Amital H, Barak V, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepany T, Carvalho JF, Doria A, Shoenfeld Y. 2007. Novel biomarkers in autoimmune diseases: Prolactin, ferritin, vitamin d, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1109:385–400.
- Ou HD, Phan S, Deerinck TJ, Thor A, Ellisman MH, O’Shea CC. 2017. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357:eaag0025.
- Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. 2004. ECR browser: A tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* 32:W280–286.
- Owczarzy R, You Y, Groth CL, Tataurov AV. 2011. Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes. *Biochemistry* 50:9352–9367.
- Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. 1983. Mutation of antitrypsin to antithrombin. Alpha 1-antitrypsin pittsburgh (358 met leads to arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 309:694–698.
- Oza AM, DiStefano MT, Hemphill SE, Cushman BJ, Grant AR, Siegert RK, Shen J, Chapin A, Boczek NJ, Schimmenti LA, Murry JB, Hasadsri L, et al. 2018. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Hum Mutat* 39:1593–1613.
- Pak MA, Markhieva KA, Novikova MS, Petrov DS, Vorobyev IS, Maksimova ES, Kondrashov FA, Ivankov DN. 2021.
- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. 2006. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 108:3730–3735.
- Pan Y, Ren Z, Gao S, Shen J, Wang L, Xu Z, Yu Y, Bachina P, Zhang H, Fan X, Laganowsky A, Yan N, et al. 2020. Structural basis of ion transport and inhibition in ferroportin. *Nat Commun* 11:5686.
- Pandurangan AP, Ochoa-Montaña B, Ascher DB, Blundell TL. 2017. SDM: A server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res* 45:W229–W235.
- Pang B, Snyder MP. 2020. Systematic identification of silencers in human cells. *Nat Genet* 52:254–263.

-
- Panigrahi A, O'Malley BW. 2021. Mechanisms of enhancer action: The known and the unknown. *Genome Biol* 22:108.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier Jr MH. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. 2005. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202:199–211.
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald MLE, Franchini PL, Dubé M-P, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, et al. 2004. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36:77–82.
- Paradkar PN, Zumbrennen KB, Paw BH, Ward DM, Kaplan J. 2009. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol Cell Biol* 29:1007–1016.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. 2001. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806–7810.
- Park W-R, Choi B, Kim Y-J, Kim Y-H, Park M-J, Kim D-I, Choi H-S, Kim D-K. 2022. Melatonin regulates iron homeostasis by inducing hepcidin expression in hepatocytes. *Int J Mol Sci* 23:3593.
- Pastores GM, Hughes DA. 1993. Gaucher disease. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, editors. *GeneReviews*®, Seattle (WA): University of Washington, Seattle,.
- Pelucchi S, Mariani R, Calza S, Fracanzani AL, Modignani GL, Bertola F, Busti F, Trombini P, Fraquelli M, Forni GL, Girelli D, Fargion S, et al. 2012. CYBRD1 as a modifier gene that modulates iron phenotype in HFE p.C282Y homozygous patients. *Haematologica* 97:1818–1825.
- Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, et al. 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* 10:973–976.
- Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. 2013. Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLOS Genetics* 9:e1003709.
- Pickar-Oliver A, Gersbach CA. 2019. The next generation of CRISPR-cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:490–507.
- Pietrangelo A. 2017. Ferroportin disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* 102:1972–1984.
- Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, Ernst M, Klein C, Trautwein C. 2007. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 132:294–300.

-
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811–7819.
- Piperno A, Pelucchi S, Mariani R. 2020. Inherited iron overload disorders. *Transl Gastroenterol Hepatol* 5:25.
- Pires DEV, Ascher DB, Blundell TL. 2014a. mCSM: Predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* 30:335–342.
- Pires DEV, Ascher DB, Blundell TL. 2014b. DUET: A server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Res* 42:W314–319.
- Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35:35–54.
- Popovic Z, Templeton DM. 2004. Iron accumulation and iron-regulatory protein activity in human hepatoma (HepG2) cells. *Mol Cell Biochem* 265:37–45.
- Porter J, Taher A, Viprakasit V, Kattamis A, Coates TD, Garbowski M, Dürrenberger F, Manolova V, Richard F, Cappellini MD. 2021. Oral ferroportin inhibitor vamifeport for improving iron homeostasis and erythropoiesis in β -thalassemia: Current evidence and future clinical development. *Expert Rev Hematol* 14:633–644.
- Poss KD, Tonegawa S. 1997. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10919–10924.
- Praschberger R, Schranz M, Griffiths WJH, Baumgartner N, Hermann M, Lomas DJ, Pietrangelo A, Cox TM, Vogel W, Zoller H. 2014. Impact of D181V and A69T on the function of ferroportin as an iron export pump and hepcidin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842:1406–1412.
- Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, Sharma S, Waring A, Ganz T, Nemeth E. 2011. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *Journal of Clinical Investigation* 121:4880–4888.
- Princiotta JV, Zapolski EJ. 1976. Functional heterogeneity and pH-dependent dissociation properties of human transferrin. *Biochim Biophys Acta* 428:766–771.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152:1173–1183.
- Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez M-J, Ganz T, Nemeth E. 2012. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 15:918–924.

-
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. 2006. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127:917–928.
- Quang D, Chen Y, Xie X. 2015. DANN: A deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* 31:761–763.
- Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:123–132.
- Quistgaard EM, Löw C, Moberg P, Trésaugues L, Nordlund P. 2013. Structural basis for substrate transport in the GLUT-homology family of monosaccharide transporters. *Nat Struct Mol Biol* 20:766–768.
- Radestock S, Forrest LR. 2011. The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *Journal of Molecular Biology* 407:698–715.
- Raha AA, Biswas A, Henderson J, Chakraborty S, Holland A, Friedland RP, Mukaetova-Ladinska E, Zaman S, Raha-Chowdhury R. 2022. Interplay of ferritin accumulation and ferroportin loss in ageing brain: Implication for protein aggregation in down syndrome dementia, alzheimer's, and parkinson's diseases. *Int J Mol Sci* 23:1060.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, et al. 2008. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 40:1341–1347.
- Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M, Hamza I. 2008. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* 453:1127–1131.
- Rametta R, Fracanzani AL, Fargion S, Dongiovanni P. 2020. Dysmetabolic hyperferritinemia and dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS): Two related conditions or different entities? *Curr Pharm Des* 26:1025–1035.
- Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. 2014. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159:1665–1680.
- Ravasi G, Pelucchi S, Bertola F, Capelletti MM, Mariani R, Piperno A. 2021. Identification of novel mutations by targeted NGS panel in patients with hyperferritinemia. *Genes (Basel)* 12:1778.
- Ream MA, Mikati MA. 2014. Clinical utility of genetic testing in pediatric drug-resistant epilepsy: A pilot study. *Epilepsy & Behavior* 37:241–248.
- Regenboog M, Kuilenburg ABP van, Verheij J, Swinkels DW, Hollak CEM. 2016. Hyperferritinemia and iron metabolism in gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Rev* 30:431–437.

-
- Remeseiro S, Losada A. 2013. Cohesin, a chromatin engagement ring. *Curr Opin Cell Biol* 25:63–71.
- Renassia C, Peyssonnaud C. 2019. New insights into the links between hypoxia and iron homeostasis. *Curr Opin Hematol* 26:125–130.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehml HL, et al. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424.
- Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, Kheradpour P, Zhang Z, Wang J, Ziller MJ, Amin V, et al. 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518:317–330.
- Robinson PJJ, Fairall L, Huynh VAT, Rhodes D. 2006. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6506–6511.
- Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Férec C, Robson KJH. 2010. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum Genet* 128:233–248.
- Rodrigues CH, Pires DE, Ascher DB. 2018. DynaMut: Predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Research* 46:W350–W355.
- Roetto A, Merryweather-Clarke AT, Daraio F, Livesey K, Pointon JJ, Barbabietola G, Piga A, Mackie PH, Robson KJH, Camaschella C. 2002. A valine deletion of ferroportin 1: A common mutation in hemochromatosis type 4. *Blood* 100:733–734.
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C. 2003. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 33:21–22.
- Rosário C, Zandman-Goddard G, Meyron-Holtz EG, D’Cruz DP, Shoenfeld Y. 2013. The hyperferritinemic syndrome: Macrophage activation syndrome, still’s disease, septic shock and catastrophic antiphospholipid syndrome. *BMC Med* 11:185.
- Ross SL, Tran L, Winters A, Lee K-J, Plewa C, Foltz I, King C, Miranda LP, Allen J, Beckman H, Cooke KS, Moody G, et al. 2012. Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metab* 15:905–917.
- Rostoker G, Griuncelli M, Lorida C, Couprie R, Benmaadi A, Bounhiol C, Roy M, Machado G, Janikiewicz P, Drahi G, Dahan H, Cohen Y. 2012. Hemodialysis-associated hemosiderosis in the era of erythropoiesis-stimulating agents: A MRI study. *The American Journal of Medicine* 125:991–999.e1.
- Roy CN, Andrews NC. 2005. Anemia of inflammation: The hepcidin link. *Current Opinion in Hematology* 12:107–111.

Ryter SW, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28:289–309.

Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tietze E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, Kamp H van der, Kapeller J, Tickle C, et al. 2007. Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet* 16:210–222.

Saliou P, Le Gac G, Mercier A-Y, Chanu B, Guéguen P, Mérour M-C, Gourlaouen I, Autret S, Le Maréchal C, Rouault K, Nouisbaum J-B, Férec C, et al. 2013. Evidence for the high importance of co-morbid factors in HFE C282Y/H63D patients cared by phlebotomies: Results from an observational prospective study. *PLoS ONE* 8:e81128.

San Martin CD, Garri C, Pizarro F, Walter T, Theil EC, Núñez MT. 2008. Caco-2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by μ 2 (AP2)-dependent endocytosis. *J Nutr* 138:659–666.

Sanborn AL, Rao SSP, Huang S-C, Durand NC, Huntley MH, Jewett AI, Bochkov ID, Chinnappan D, Cutkosky A, Li J, Geeting KP, Gnirke A, et al. 2015. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E6456–6465.

Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. 2007. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 α expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 14:420–426.

Sanders MR, Findlay HE, Booth PJ. 2018. Lipid bilayer composition modulates the unfolding free energy of a knotted α -helical membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1799–E1808.

Sandnes M, Ulvik RJ, Vorland M, Reikvam H. 2021. Hyperferritinemia—a clinical overview. *J Clin Med* 10:2008.

Sangkhae V, Fisher AL, Wong S, Koenig MD, Tussing-Humphreys L, Chu A, Lelić M, Ganz T, Nemeth E. 2020. Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. *J Clin Invest* 130:625–640.

Sangokoya C, Doss JF, Chi J-T. 2013. Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. *PLOS Genet* 9:e1003408.

Santiago-Algarra D, Dao LTM, Pradel L, España A, Spicuglia S. 2017. Recent advances in high-throughput approaches to dissect enhancer function. *F1000Res* 6:

Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436:138–141.

Schimanski LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJH, Townsend ARM. 2005. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood* 105:4096–4102.

-
- Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y. 1985. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* 260:5131–5138.
- Schug J, Schuller W-P, Kappen C, Salbaum JM, Bucan M, Stoeckert CJ. 2005. Promoter features related to tissue specificity as measured by shannon entropy. *Genome Biol* 6:1–24.
- Schutz S, Monod-Broca C, Bourneuf L, Marijon P, Montier T. 2022. Cutevariant: A standalone GUI-based desktop application to explore genetic variations from an annotated VCF file. *Bioinformatics Advances* 2:vbab028.
- Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. 2005. The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Res* 33:W382–388.
- Scotet V, Mérour M-C, Mercier A-Y, Chanu B, Le Faou T, Raguénes O, Le Gac G, Mura C, Nousbaum J-B, Férec C. 2003. Hereditary hemochromatosis: Effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol* 158:129–134.
- Semenza GL. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148:399–408.
- Sen N, Anishchenko I, Bordin N, Sillitoe I, Velankar S, Baker D, Orengo C. 2022. Characterizing and explaining the impact of disease-associated mutations in proteins without known structures or structural homologs. *Brief Bioinform* 23:bbac187.
- Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim S-H, Gonzalez FJ. 2009. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metabolism* 9:152–164.
- Shahidi NT, Nathan DG, Diamond LK. 1964. Iron deficiency anemia associated with an error of iron metabolism in two siblings. *J Clin Invest* 43:510–521.
- Shanmugam NKN, Chen K, Cherayil BJ. 2015. Commensal bacteria-induced interleukin 1 β (IL-1 β) secreted by macrophages up-regulates hepcidin expression in hepatocytes by activating the bone morphogenetic protein signaling pathway*. *Journal of Biological Chemistry* 290:30637–30647.
- Shanmugam NKN, Cherayil BJ. 2013. Serum-induced up-regulation of hepcidin expression involves the bone morphogenetic protein signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 441:383–386.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, et al. 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122:789–801.
- Shenoy N, Vallumsetla N, Rachmilewitz E, Verma A, Ginzburg Y. 2014. Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 124:873–881.
- Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. 2008. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 320:1207–1210.

Silvestri L, Nai A, Dulja A, Pagani A. 2019. Heparin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitamins and Hormones*, Elsevier, p 71–99.

Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. 2008a. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: A new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111:924–931.

Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. 2008b. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism* 8:502–511.

Smale ST, Kadonaga JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72:449–479.

Smirnova I, Kasho V, Kaback HR. 2011. Lactose permease and the alternating access mechanism. *Biochemistry* 50:9684–9693.

Soares MP, Hamza I. 2016. Macrophages and iron metabolism. *Immunity* 44:492–504.

Solcan N, Kwok J, Fowler PW, Cameron AD, Drew D, Iwata S, Newstead S. 2012. Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *EMBO J* 31:3411–3421.

Splinter E, Heath H, Kooren J, Palstra R-J, Klous P, Grosveld F, Galjart N, Laats W de. 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev* 20:2349–2354.

Srinivasan L, Atchison ML. 2004. YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev* 18:2596–2601.

Stadhouders R, Kolovos P, Brouwer R, Zuin J, Heuvel A van den, Kockx C, Palstra R-J, Wendt KS, Grosveld F, Ijcken W van, Soler E. 2013. Multiplexed chromosome conformation capture sequencing for rapid genome-scale high-resolution detection of long-range chromatin interactions. *Nat Protoc* 8:509–524.

Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM, Pappas AE, Peterson RT, Bloch DB, Yu PB, Fleming MD, Bloch KD. 2011. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood* 118:4224–4230.

Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD, Cooper DN. 2017. The human gene mutation database: Towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 136:665–677.

Tabuchi M, Yoshimori T, Yamaguchi K, Yoshida T, Kishi F. 2000. 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.

-
- Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. 2021a. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications. *Cell Res* 31:107–125.
- Tang Z, Jiang W, Mao M, Zhao J, Chen J, Cheng N. 2021b. Deubiquitinase USP35 modulates ferroptosis in lung cancer via targeting ferroportin. *Clin Transl Med* 11:e390.
- Taniguchi R, Kato HE, Font J, Deshpande CN, Wada M, Ito K, Ishitani R, Jormakka M, Nureki O. 2015. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat Commun* 6:8545.
- Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, Gonzalez FJ, Shah YM. 2011. Hypoxia-inducible factor-2 α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology* 140:2044–2055.
- Tayrac M de, Roth M-P, Jouanolle A-M, Coppin H, Gac G le, Piperno A, Férec C, Pelucchi S, Scotet V, Bardou-Jacquet E, Ropert M, Bouvet R, et al. 2015. Genome-wide association study identifies TF as a significant modifier gene of iron metabolism in HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 62:664–672.
- Thomas MC, Chiang C-M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41:105–178.
- Thurlow V, Vadher B, Bomford A, DeLord C, Kannengiesser C, Beaumont C, Grandchamp B. 2012. Two novel mutations in the *HFE* ferritin coding sequence associated with benign hyperferritinaemia unmasked by glycosylated ferritin assay. *Ann Clin Biochem* 49:302–305.
- Timmermans S, Tietbohl C, Skaperdas E. 2017. Narrating uncertainty: Variants of uncertain significance (VUS) in clinical exome sequencing. *BioSocieties* 12:439–458.
- Toki T, Itoh J, Kitazawa J, Arai K, Hatakeyama K, Akasaka J, Igarashi K, Nomura N, Yokoyama M, Yamamoto M, Ito E. 1997. Human small maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene* 14:1901–1910.
- Tolosano E, Altruda F. 2002. Hemopexin: Structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol* 21:297–306.
- Torti SV, Manz DH, Paul BT, Blanchette-Farra N, Torti FM. 2018. Iron and cancer. *Annu Rev Nutr* 38:97–125.
- Traeger L, Enns CA, Krijt J, Steinbicker AU. 2018. The hemochromatosis protein HFE signals predominantly via the BMP type I receptor ALK3 in vivo. *Commun Biol* 1:1–7.
- Traeger L, Wiegand SB, Sauer AJ, Corman BHP, Peneyra KM, Wunderer F, Fischbach A, Bagchi A, Malhotra R, Zapol WM, Bloch DB. 2021. UBA6 and NDFIP1 regulate the degradation of ferroportin. *Haematologica*.

-
- Tran TN, Eubanks SK, Schaffer KJ, Zhou CYJ, Linder MC. 1997. Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. *Blood* 90:4979–4986.
- Troadec M-B, Ward DM, Lo E, Kaplan J, Domenico ID. 2010. Induction of FPN1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux. *Blood* 116:4657–4664.
- Tsuji Y, Moran E, Torti SV, Torti FM. 1999. Transcriptional regulation of the mouse ferritin h gene. Involvement of p300/CBP adaptor proteins in FER-1 enhancer activity. *J Biol Chem* 274:7501–7507.
- Turner BM. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111:285–291.
- Uguen K, Scotet V, Ka C, Gourlaouen I, L’hostis C, Merour M-C, Cuppens T, Ferec C, Le Gac G. 2017. Diagnostic value of targeted next-generation sequencing in suspected hemochromatosis patients with a single copy of the HFE p.Cys282Tyr causative allele. *Am J Hematol* 92:E664–E666.
- Valent P, Büsche G, Theurl I, Uras IZ, Germing U, Stauder R, Sotlar K, Füreder W, Bettelheim P, Pfeilstöcker M, Oberbauer R, Sperr WR, et al. 2018. Normal and pathological erythropoiesis in adults: From gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica* 103:1593–1603.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. 2016. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 90:1–37.
- Valore EV, Ganz T. 2008. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis* 40:132–138.
- Vears DF, Sénécal K, Borry P. 2017. Reporting practices for variants of uncertain significance from next generation sequencing technologies. *European Journal of Medical Genetics* 60:553–558.
- Vietri Rudan M, Barrington C, Henderson S, Ernst C, Odom DT, Tanay A, Hadjur S. 2015. Comparative hi-c reveals that CTCF underlies evolution of chromosomal domain architecture. *Cell Rep* 10:1297–1309.
- Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, et al. 2009. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 457:854–858.
- Visel A, Minovitsky S, Dubchak I, Pennacchio LA. 2007. VISTA enhancer browser—a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res* 35:D88–92.
- Vissers LELM, Gilissen C, Veltman JA. 2016. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews Genetics* 17:9–18.
- Vitsios D, Dhindsa RS, Middleton L, Gussow AB, Petrovski S. 2021. Prioritizing non-coding regions based on human genomic constraint and sequence context with deep learning. *Nat Commun* 12:1504.

Vlasveld LT, Janssen R, Bardou-Jacquet E, Venselaar H, Hamdi-Roze H, Drakesmith H, Swinkels DW. 2019. Twenty years of ferroportin disease: A review or an update of published clinical, biochemical, molecular, and functional features. *Pharmaceuticals* 12:132.

Vogelstein B, Kinzler KW. 1999. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9236–9241.

Vogt A-CS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. 2021. On iron metabolism and its regulation. *Int J Mol Sci* 22:4591.

Võsa U, Claringbould A, Westra H-J, Bonder MJ, Deelen P, Zeng B, Kirsten H, Saha A, Kreuzhuber R, Yazar S, Brugge H, Oelen R, et al. 2021. Large-scale cis- and trans-eQTL analyses identify thousands of genetic loci and polygenic scores that regulate blood gene expression. *Nat Genet* 53:1300–1310.

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the mouse. *Nat Genet* 21:195–199.

Wallace DF, Harris JM, Subramaniam VN. 2010. Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 298:C75–C84.

Wallace DF, McDonald CJ, Ostini L, Iser D, Tuckfield A, Subramaniam VN. 2017. The dynamics of hepcidin-ferroportin internalization and consequences of a novel ferroportin disease mutation. *Am J Hematol* 92:1052–1061.

Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, Stephenson P, Searle JW, Powell LW, Subramaniam VN. 2002a. Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood* 100:692–694.

Wallace DF, Subramaniam VN. 2015. The global prevalence of HFE and non-HFE hemochromatosis estimated from analysis of next-generation sequencing data. *Genet Med*.

Wallace DF, Walker AP, Pietrangelo A, Clare M, Bomford AB, Dixon JL, Powell LW, Subramaniam VN, Dooley JS. 2002b. Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y. *J Hepatol* 36:474–479.

Wallace JA, Felsenfeld G. 2007. We gather together: Insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev* 17:400–407.

Walters GO, Miller FM, Worwood M. 1973. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol* 26:770–772.

Wang C-Y, Xu Y, Traeger L, Dogan DY, Xiao X, Steinbicker AU, Babitt JL. 2020. Erythroferrone lowers hepcidin by sequestering BMP2/6 heterodimer from binding to the BMP type i receptor ALK3. *Blood* 135:453–456.

-
- Wang L, Zhang J, Wang D, Song C. 2022. Membrane contact probability: An essential and predictive character for the structural and functional studies of membrane proteins. *PLOS Computational Biology* 18:e1009972.
- Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. 2010. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800:760–769.
- Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. 2014. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 13:1045–1060.
- Waskom ML. 2021. Seaborn: Statistical data visualization. *Journal of Open Source Software* 6:3021.
- Wassell J. 2000. Haptoglobin: Function and polymorphism. *Clin Lab* 46:547–552.
- Watson JD, Crick FHC. 1953. The structure of dna. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18:123–131.
- Wei D, Ke Y-Q, Duan P, Zhou L, Wang C-Y, Cao P. 2021. MicroRNA-302a-3p induces ferroptosis of non-small cell lung cancer cells via targeting ferroportin. *Free Radic Res* 55:821–830.
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, et al. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451:796–801.
- Wesselius LJ, Nelson ME, Skikne BS. 1994. Increased release of ferritin and iron by iron-loaded alveolar macrophages in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 150:690–695.
- White C, Yuan X, Schmidt PJ, Bresciani E, Samuel TK, Campagna D, Hall C, Bishop K, Calicchio ML, Lapierre A, Ward DM, Liu P, et al. 2013. HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab* 17:261–270.
- Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. 2013. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153:307–319.
- Willemetz A, Beatty S, Richer E, Rubio A, Auriac A, Milkereit RJ, Thibaudeau O, Vaultont S, Malo D, Canonne-Hergaux F. 2017. Iron- and hepcidin-independent downregulation of the iron exporter ferroportin in macrophages during salmonella infection. *Frontiers in Immunology* 8:
- Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ, Kaufman RJ. 1990. Expression of a human proprotein processing enzyme: Correct cleavage of the von willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:9378–9382.
- Wrighting DM, Andrews NC. 2006. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108:3204–3209.
- Wu J, Zhang L, Wu S, Yi X, Liu Z. 2020. miR-194-5p inhibits SLC40A1 expression to induce cisplatin resistance in ovarian cancer. *Pathol Res Pract* 216:152979.

-
- Wu X, Wang Y, Wu Q, Cheng W-H, Liu W, Zhao Y, Mayeur C, Schmidt PJ, Yu PB, Wang F, Xia Y. 2014. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood* 124:1335–1343.
- Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. 2008. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 111:5195–5204.
- Xiao T, Wallace J, Felsenfeld G. 2011. Specific sites in the C terminus of CTCF interact with the SA2 subunit of the cohesin complex and are required for cohesin-dependent insulation activity. *Mol Cell Biol* 31:2174–2183.
- Yokomori N, Iwasa Y, Aida K, Inoue M, Tawata M, Onaya T. 1991. Transcriptional regulation of ferritin messenger ribonucleic acid levels by insulin in cultured rat glioma cells. *Endocrinology* 128:1474–1480.
- Zerbino DR, Wilder SP, Johnson N, Juettemann T, Flicek PR. 2015. The Ensembl regulatory build. *Genome Biol* 16:56.
- Zhang A-S, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R, Nizzi CP, Eisenstein RS, Tsukamoto H, Enns CA. 2011. Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matrilysin-2 protein. *Blood* 117:1687–1699.
- Zhang D-L, Ghosh MC, Ollivierre H, Li Y, Rouault TA. 2018a. Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. *Blood* 132:2078–2087.
- Zhang D-L, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. 2009. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metabolism* 9:461–473.
- Zhang D-L, Wu J, Shah BN, Greutelaers KC, Ghosh MC, Ollivierre H, Su X-Z, Thuma PE, Bedu-Addo G, Mockenhaupt FP, Gordeuk VR, Rouault TA. 2018b. Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science* 359:1520–1523.
- Zhang W, Li Y, Xu A, Ouyang Q, Wu L, Zhou D, Wu L, Zhang B, Zhao X, Wang Y, Wang X, Duan W, et al. 2022. Identification of novel non-HFE mutations in Chinese patients with hereditary hemochromatosis. *Orphanet J Rare Dis* 17:216.
- Zhang W, Xu A, Li Y, Zhao S, Zhou D, Wu L, Zhang B, Zhao X, Wang Y, Wang X, Duan W, Wang Q, et al. 2018c. A novel SLC40A1 p.Y333H mutation with gain-of-function of ferroportin: A recurrent cause of hemochromatosis in China. *Liver International*.
- Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, Göndör A, Mariano P, Wang S, Kanduri C, Lezcano M, Singh Sandhu K, Singh U, Pant V, Tiwari V, et al. 2006. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38:1341–1347.

Titre : Identification et caractérisation de formes rares de surcharge en fer : analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine et étude de la régulation à distance du gène *SLC40A1*.

Mots clés : Métabolisme du fer, surcharges en fer liées au gène *SLC40A1*, ferroportine, hepcidine, protéines MFS, régulation à distance.

Résumé : La ferroportine (FPN1) est le seul exportateur de fer connu chez les mammifères. Cette protéine de 12 domaines transmembranaires fait partie de la famille des transporteurs MFS (« Major Facilitator Superfamily ») et est régulée négativement par l'hepcidine. Les mutations dans le gène *SLC40A1* codant FPN1 sont responsables de deux phénotypes distincts, la maladie de la ferroportine et l'hémochromatose de type 4, en fonction de l'impact fonctionnel des variations : perte ou gain de fonction. A ce jour, plus de 60 variations, quasi-exclusivement faux-sens, sont décrites dans la littérature. Durant ma thèse, je me suis d'abord attaché à mieux rendre compte de hétérogénéité allélique au locus *SLC40A1*. Au travers d'une analyse exhaustive de la littérature, j'ai réalisé une interprétation clinique, structurale et fonctionnelle d'un ensemble de 65 variants rares à très rares et proposé des corrélations génotype-phénotype originales dans le cadre d'un premier article et de la création d'une base de données spécialisée. J'ai caractérisé huit nouvelles variations faux-sens identifiées dans le cadre de différentes collaborations nationales avec, à la clé, la description de nouveaux mécanismes physiopathologiques associant perte et gain de fonction. Des analyses structurales basées sur les structures tridimensionnelles de FPN1 chez l'homme et la bactérie (BbFPN) m'ont permis d'expliquer cette ambivalence et de révéler des aspects nouveaux du mécanisme d'export du fer chez l'homme et de sa régulation par l'hepcidine. Ces différents points seront à la base de deux autres publications originales. Enfin, j'ai exploré les possibles mécanismes de régulation à distance du gène *SLC40A1*, à travers la combinaison d'études *in silico* et de validations *in vitro* (tests luciférase, capture de la chromatine, édition génique).

Title: Identification and characterization of rare forms of iron overload: structural and functional analyses of ferroportin and study of the long-range regulation of the *SLC40A1* gene.

Keywords: Iron metabolism, iron overload linked to the *SLC40A1* gene, ferroportin, hepcidin, MFS proteins, long-range regulation.

Abstract: Ferroportin (FPN1) is the sole known iron exporter in mammals. This 12 transmembrane domain protein is a member of the Major Facilitator Superfamily (MFS) of transporters and is negatively regulated by hepcidin. Mutations in the *SLC40A1* gene encoding FPN1 are responsible for two distinct phenotypes, ferroportin disease and hemochromatosis type 4, depending on the functional impact of the variations: loss- or gain-of-function. To date, more than 60 variations, almost exclusively missense, are described in the literature. During my thesis, I first tried to better account for allelic heterogeneity at the *SLC40A1* locus. Through an exhaustive analysis of the literature, I performed a clinical, structural and functional interpretation of a set of 65 rare to very rare variants and proposed original genotype-phenotype correlations in the context of a first article and the creation of a locus-specific database. I characterized eight new missense variations identified thanks to different national collaborations with, as a result, the description of new physiopathological mechanisms associating both loss- and gain-of-function. Structural analyses based on the three-dimensional structures of FPN1 in humans and bacteria (BbFPN) allowed me to explain this ambivalence and to reveal new aspects of the iron export mechanism in humans and its regulation by hepcidin. These different points will be the basis of two other original publications. Finally, I explored the putative mechanisms of long-range regulation of the *SLC40A1* gene, through a combination of *in silico* studies and *in vitro* validations (luciferase assays, chromatin capture, gene editing).