



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : *Physiopathologie moléculaire, cellulaire et intégrée*

Présentée et soutenue par *Léon Kautz*
Le 18 décembre 2009

Titre : *Rôle de BMP6 et de HFE dans la régulation de l'entrée du fer dans l'organisme*

JURY

Pr Jean-Marie Péron - Président
Pr Claude Férec - Rapporteur
Dr Olivier Loréal - Rapporteur
Dr Sophie Vulont - Examineur
Dr Hélène Coppin - Directeur de thèse
Dr Marie-Paule Roth - Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie*
Unité de recherche : *Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan U563*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Hélène Coppin et Marie-Paule Roth*
Rapporteurs : /

MERCI !!!!!

Je tiens à remercier en premier lieu mes « CHEFS », les Dr Marie-Paule Roth et Hélène Coppin, un simple mot vaut bien plus que de grand discours : MERCI POUR TOUT ! De mes débuts jusqu'à la rédaction de ce manuscrit. Merci de me faire confiance et de m'avoir transmis l'envie et la motivation de poursuivre car ce n'est finalement que le commencement !

Je remercie également les membres du jury : Pr. Claude Férec, Dr Olivier Loréal, Dr. Sophie Vaultont d'avoir accepté d'évaluer ce travail et le Pr. Jean-Marie Péron d'avoir accepté d'assurer au pied levé la présidence de ce jury.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale pour le financement de ma 3^{ème} année.

A tous les membres de l'équipe et tout particulièrement Valérie, pour toutes ces heures passées à l'animalerie et le nombre ahurissants de souris sacrifiées, d'extractions ou encore de génotypages durant les 2 ans où l'on a travaillé ensemble. Ton implication a été aussi précieuse qu'inestimable et ce travail ne serait pas ce qu'il est sans ta participation. Toute l'équipe t'en est énormément reconnaissante !! Delphine avec qui j'ai partagé pendant 3 ans ce que l'on ne peut raisonnablement plus appelé « un bureau » où « une paillasse » après son passage, Céline, Laura et les stagiaires que j'ai eu à encadrer, Yoan & Laurence, qui ont également apporté leur contribution.

Sans oublier bien évidemment les membres du personnel de zootechnie de l'unité : Aline, Julie, Corinne et le personnel de l'expé sans qui ce travail n'aurait pu être possible, toute l'équipe PLAGE de la plateforme de génomique de l'INRA d'Auzeville et surtout tous les membres de « l'étage bleu » pour la bonne humeur quotidienne en particulier Matthias, notre fournisseur officiel de café.

Je n'oublierai pas mes premiers pas dans la recherche. Merci à Mario Keller et Lyuba Ryabova, chez qui j'ai effectué mon DEA, pour m'avoir donné l'envie et la motivation de commencer cette thèse sans oublier Greg et Gabrielle.

Merci également à Nespresso, Picon et *Mus Musculus* pour leur soutien permanent durant ces 3 années.

A tous ceux qui sont là pour m'accompagner dans la vie de tous les jours: Anaïs, Bernie et toute la bande de toulousains en particulier Yo & Nico, grands sportifs devant l'éternel, pour toutes ces soirées Foot/rugby (à la tv bien sûr) qui ont rythmé les semaines de mes 3 ans de thèse & mes compères strasbourgeois pour ces années de fac mémorables qui m'ont amenées là où j'en suis aujourd'hui: Portos, Bernie (il est partout celui-là), Laurent (mon binôme/boulet de choc), Bastien & José, Ridus, Eric, Adrien, Loïc, Manu, Lucas, Cyrille, Samir... à et tous qui me sont cher mais que je n'ai pas cité sans pour autant penser à eux.

Enfin, un grand merci à ma famille, spécialement à mes parents et à ma grand mère qui ont cru en moi et qui ont toujours été là pour m'encourager et me soutenir sans toujours trop comprendre de quoi je parlais...je vous dédis cette réussite, témoignage de ma reconnaissance ! Benoît, je compte sur toi pour faire mieux !

INTRODUCTION	4
A. L'HEPCIDINE : LE SENSEUR	7
I. DECOUVERTE, STRUCTURE, SYNTHÈSE ET CLAIRANCE DE L'HEPCIDINE.....	7
1. La découverte de l'hepcidine.....	7
2. Structure de l'hepcidine.....	8
3. Synthèse et maturation de l'hepcidine.....	8
4. Mutations dans le gène de l'hepcidine et pathologies associées.....	10
5. Clairance et détection de l'hepcidine.....	10
II. MODE D'ACTION DE L'HEPCIDINE.....	11
1. Interaction avec la ferroportine.....	11
2. Mutations dans le gène de la ferroportine et pathologies associées.....	12
B. LA REGULATION DE L'HEPCIDINE	13
I. LE FER.....	13
1. L'hémojuvénine.....	13
2. La voie de signalisation des « Bone Morphogenetic protein » (BMP).....	17
II. L'ERYTHROPOÏÈSE.....	21
1. L'erythropoïétine.....	22
2. GDF15.....	22
3. TWSG1.....	23
III. L'HYPOXIE.....	23
1. HIF1 α	23
2. HIF2 α	24
IV. L'INFLAMMATION.....	24
1. La voie de l'IL6.....	25
2. La voie des BMPs.....	25
C. DEUX AUTRES ACTEURS DE LA REGULATION DE L'HOMEOSTASIE MARTIALE PAR LE FOIE : HFE ET TFR2	26
I. LE RÔLE DE HFE.....	26
1. Structure.....	26
2. HFE et hémochromatose.....	26
3. Fonction de HFE.....	27
II. LES RECEPTEURS DE LA TRANSFERRINE.....	28
1. Le récepteur I de la transferrine.....	28
2. Le récepteur II de la transferrine.....	29
III. L'INTERACTION HFE/TFR2.....	31
OBJECTIFS	32

MATERIEL ET METHODES	33
1. Les souris	34
2. Dosage du fer intra-hépatique	34
3. RT-PCR quantitative en temps réel.....	34
4. Immunohistochimie.....	39
5. Immunofluorescence	40
6. Western Blot.....	41
RESULTATS	44
ARTICLE 1	45
IRON REGULATES PHOSPHORYLATION OF SMAD1/5/8 AND GENE EXPRESSION OF BMP6, SMAD7, ID1, AND ATOH8 IN THE MOUSE LIVER	45
I. INTRODUCTION.....	45
II. RESULTATS.....	45
1. Comparaison des transcriptomes hépatiques	46
2. La voie Smad 1/5/8.....	47
3. Les souris invalidées pour les gènes <i>Smad4</i> et <i>Hamp</i>	48
III. DISCUSSION.....	49
ARTICLE 2	51
LACK OF THE BONE MORPHOGENETIC PROTEIN BMP6 INDUCES MASSIVE IRON OVERLOAD.....	51
I. INTRODUCTION.....	51
II. RESULTATS.....	52
1. Les souris <i>Bmp6</i> ^{-/-} développent une surcharge en fer intrahépatique massive	52
2. La voie des BMPs n'est pas activée malgré la surcharge.....	52
3. Mais qu'en est-il de l'absorption duodénale de fer ?	53
4. BMP6 joue-t-il un rôle dans l'induction de l'hepcidine par l'inflammation ?	54
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	54
1. Quel est le ligand activateur de la voie des BMPs en réponse à l'inflammation ?.....	55
2. Le TGF-β est-il impliqué dans la régulation de l'hepcidine ?.....	56
IV. DISCUSSION	57
ARTICLE 3	59
BMP/SMAD SIGNALING IS NOT ENHANCED IN HFE-DEFICIENT MICE DESPITE INCREASED BMP6 EXPRESSION.....	59
I. INTRODUCTION.....	59
II. RESULTATS.....	60
1. L'invalidation de <i>Hfe</i> agit-elle sur l'expression de BMP6 ?	60
2. L'invalidation de <i>Hfe</i> agit-elle sur la phosphorylation des molécules Smad1/5/8?	61
3. Pourquoi y a-t-il une surcharge intrahépatique chez les souris <i>Hfe</i> ^{-/-} âgées de 7 semaines alors que la quantité d'hepcidine est proche de la normale ?.....	61
III. DISCUSSION.....	63

DISCUSSION GENERALE	65
I. BMP6 : UN NOUVEL ACTEUR DE LA VOIE DE REGULATION DE L'HEPCIDINE	67
1. Quel est le signal qui régule l'expression de <i>Bmp6</i> en cas de surcharge martiale?....	67
2. BMP6 intervient-il dans l'intestin ?	67
3. Comment l'expression de <i>Bmp6</i> est-elle régulée ?.....	68
II. COMMENT LA VOIE BMP/SMAD AGIT-ELLE SPECIFIQUEMENT SUR LA REGULATION DE L'HEPCIDINE ?	70
1. Les partenaires des Smads lors de l'activation de la transcription	70
2. Atoh8	71
3. Id1	72
4. Smad7	72
III. QUELS SONT LES ROLES DE HFE ET TFR2 DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'HEPCIDINE ?	73
1. Quel serait le rôle de HFE dans la voie des BMPs ?	73
2. Les protéines HFE et TFR2 sont-elles associées pour réguler la voie des BMPs ?....	74
3. Un modèle de souris double mutant <i>Hfe^{-/-}Tfr2^{-/-}</i>	74
4. HFE, TFR2, les voies des BMPs et des MAP kinase et la régulation de l'hepcidine...	75
IV. LES DIVERGENCES DE LA LITTERATURE	76
V. HEPcidine ET INFLAMMATION : EXISTE-T-IL UNE COOPERATION AVEC LA VOIE DU FER ?.....	77
VI. CONCLUSION GENERALE	78
BIBLIOGRAPHIE	79
ANNEXE.....	94

INTRODUCTION

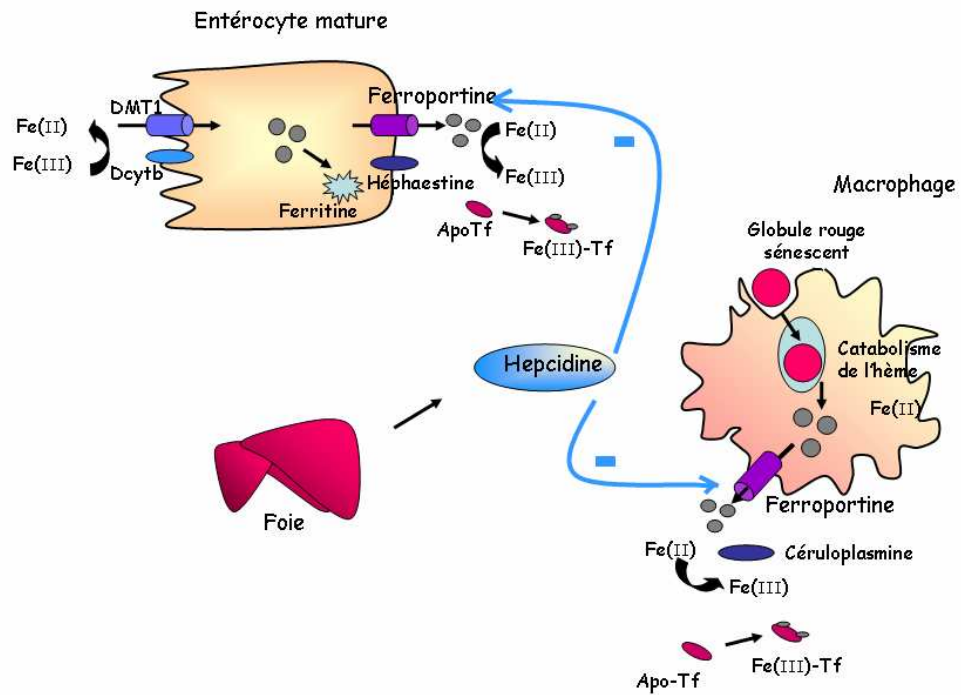


Figure 1 : Représentation du mécanisme d'absorption du fer alimentaire et du recyclage par le macrophage

Le fer est un élément indispensable à toute forme de vie. Il se caractérise par sa capacité à échanger facilement un électron et ainsi passer de la forme ferreuse (Fe^{2+}) à la forme ferrique (Fe^{3+}), qui lui confère un rôle de cofacteur dans certaines réactions enzymatiques. Le fer est impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la respiration cellulaire, la réparation et la synthèse d'ADN et surtout le transport de l'oxygène.

Un organisme adulte contient 3 à 5 g de fer. La majeure partie du fer est répartie dans l'hémoglobine des globules rouges (60%), dans le foie sous forme de ferritine (25%) et dans la myoglobine et les enzymes héminiques (cytochromes, catalases et peroxydases) ou non-héminiques (ribonucléotide réductase) (12%) [1]. La moelle osseuse est le plus grand consommateur de fer (20 mg par jour) pour assurer la production d'érythrocytes. Ce fer provient principalement du recyclage des globules rouges sénescents par les macrophages. Toutefois, seul 1 à 2 mg de fer entre quotidiennement dans l'organisme, ce qui compense à peine les pertes occasionnées par la desquamation des cellules épithéliales intestinales, les pertes de sangs et les pertes biliaires. Le fer présent dans l'organisme provient exclusivement de l'alimentation.

L'homéostasie du fer dans l'organisme est conditionnée par la balance des apports et des pertes et il n'existe pas de système actif d'excrétion du fer excédentaire. En conditions physiologiques, le fer ferreux libre catalyse la réaction de Fenton qui génère des radicaux hydroxyles OH^\cdot capables de dégrader pratiquement toutes les biomolécules : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$. En cas d'absorption excessive, le fer peut donc rapidement devenir toxique, en particulier pour le foie où il est stocké en grande majorité. L'absorption nécessite donc d'être finement régulée en fonction des besoins afin d'éviter une surcharge potentiellement délétère.

Le mécanisme d'acquisition du fer par les cellules commence à être bien caractérisé (figure1). L'absorption du fer alimentaire a lieu au niveau des entérocytes des villosités du duodénum. Le fer apporté par l'alimentation sous forme Fe^{3+} est d'abord réduit en Fe^{2+} par la ferriréductase Dcytb (duodenal cytochrome b ou Cybrd1) [2] présente à la surface des entérocytes puis il entre dans l'entérocyte au pôle apical grâce au transporteur de cation divalent DMT1, pour « Divalent metal transporteur 1 » [3]. Le fer est ensuite stocké sous forme de ferritine ou libéré dans la circulation sanguine *via* le seul exportateur de fer connu : la ferroportine [4-6], localisée au pôle basolatéral de la cellule. Le fer ainsi libéré sera capté par la transferrine [7] puis dirigé vers les organes qui en ont besoin.

Le fer est exporté par la ferroportine sous forme Fe^{2+} . La transferrine ne transportant le fer que sous forme Fe^{3+} , une oxydation est assurée par une ferroxidase appelée héphaestine [8]. La transferrine existe sous deux formes, une dépourvue de fer, l'apotransferrine, et une forme liée à deux atomes de fer, l'holotransferrine qui véhicule le fer dans la circulation. Le macrophage représente également un lieu de passage du fer puisqu'il assure la dégradation des globules rouges sénescents [1, 9]. Le fer est ensuite relargué dans la circulation par la ferroportine, oxydé par une autre ferroxidase, la céruloplasmine [10, 11] et pris en charge par la transferrine. Il s'agit d'un mécanisme de recyclage du fer par le macrophage puisque le fer sera réutilisé pour la synthèse de l'hème [1, 9].

Afin de prévenir une absorption excessive, la quantité de fer doit être finement régulée au niveau de sa sortie hors de l'entérocyte. Cette régulation est assurée par l'hepcidine, un petit peptide synthétisé par le foie qui intervient comme le régulateur central de l'homéostasie martiale [12-15]. En effet, l'hepcidine fixe la ferroportine et induit son internalisation et sa dégradation [16] de sorte que le fer reste séquestré soit dans le macrophage, soit dans l'entérocyte, où il est excrété par voie naturelle. La production de l'hepcidine est augmentée lorsque les stocks en fer deviennent trop importants, limitant ainsi l'absorption intestinale du fer par un mécanisme de rétrocontrôle. A l'inverse, lorsque l'organisme doit faire face à une situation de carence martiale, sa synthèse est inhibée tandis que l'absorption du fer par les entérocytes est augmentée [13].

A. L'hepcidine : le senseur

I. Découverte, structure, synthèse et clairance de l'hepcidine

1. La découverte de l'hepcidine

En 2000, deux laboratoires indépendants purifiaient un petit peptide avec une activité antimicrobienne respectivement dans le sang et les urines de volontaires sains [12, 15]. Originellement appelée LEAP-1 pour « liver expressed antimicrobial peptide 1 », il prendra le nom hepcidine, « hepc » en rapport à l'hépatocyte où il est produit et « idine » pour son rôle antimicrobien (bactéricide). Ces deux laboratoires cherchaient à identifier de telles molécules car elles exercent leur activité la plupart du temps en détruisant la membrane cellulaire des pathogènes, une propriété partagée avec les antibiotiques à spectre large. Ces peptides pouvaient ainsi constituer une alternative intéressante aux antibiotiques pour contourner la résistance des bactéries qui s'installe au cours du temps. L'hepcidine présentait une faible activité antimicrobienne contre certaines bactéries Gram positives et Gram négatives. Peu après son identification, deux équipes différentes ont mis en évidence à l'aide de banques soustractives de foie de souris le rôle de l'hepcidine dans la régulation de l'homéostasie du fer.

L'équipe d'Olivier Loréal s'attachait à identifier des gènes dont l'expression hépatique était positivement régulée par le fer. En utilisant des banques soustractives de foies de souris nourries avec des alimentations enrichies en fer et en étudiant les gènes différentiellement exprimés, ils ont isolé un cDNA de 225 paires de bases surexprimé dans le foie des souris surchargées et correspondant au messenger de l'hepcidine. Ils ont également montré que l'expression de l'hepcidine était induite non seulement par injection de fer dextran mais aussi par l'inflammation, après injection de LPS. Il s'agissait alors de la première démonstration que le fer régulait l'expression de l'hepcidine *in vivo* [13].

D'autre part, l'équipe de Sophie Vaulont travaillait sur un modèle de souris invalidées pour le gène *Usf2* (Upstream Stimulatory Factor 2), un facteur de transcription. De façon surprenante, bien que ce gène ne soit pas à priori relié au métabolisme du fer, ces souris développaient une surcharge en fer multiviscérale, notamment dans le foie, le pancréas et le

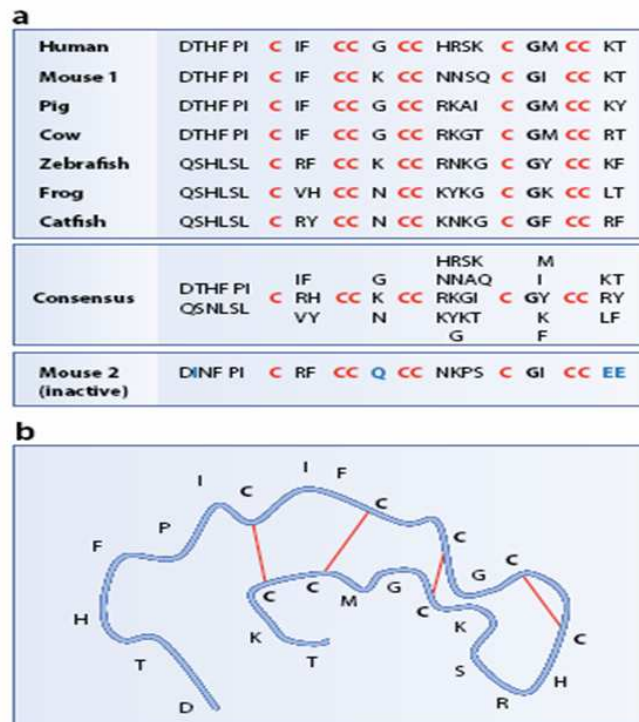


Figure 2 : L'hepcidine (d'après [55])

- Comparaison de la séquence peptidique de l'hepcidine entre les espèces
- Prédiction de la structure secondaire de l'hepcidine humaine.

cœur alors que la rate était anormalement dépourvue en fer en comparaison des souris sauvages. Dans le but d'identifier les gènes responsables de la dérégulation de l'homéostasie du fer chez ces souris, ils ont réalisé des banques soustractives chez des souris *Usf2*^{-/-} et sauvages et également isolé l'ADNc codant pour l'hepcidine. A l'inverse, les souris transgéniques surexprimant l'hepcidine présentent une sévère anémie microcytaire hypochrome qui est létale quelques heures après la naissance ou accompagné de troubles du développement [14]. Pour confirmer ces résultats, cette même équipe a généré un modèle de souris invalidé exclusivement pour le gène *Hamp* et démontré le rôle prépondérant de l'hepcidine dans la régulation du fer [17]. L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence le rôle de l'hepcidine en tant que régulateur central de l'homéostasie du fer.

2. Structure de l'hepcidine

Chez l'homme, l'hepcidine est codée par le gène *HAMP* qui est localisé sur le chromosome 19 en position q13.1 [12, 15]. En revanche, il existe chez la souris deux gènes avec 90% d'homologie codant pour l'hepcidine 1 (*Hamp*) et l'hepcidine 2 (*Hamp2*) situés dans la même région sur le chromosome 7 [13]. Bien que l'expression à la fois de *Hamp* et de *Hamp2* soit augmentée lors d'une surcharge en fer, seul l'hepcidine 1 joue un rôle dans la régulation de l'absorption duodénale [18, 19]. La forme biologiquement active de l'hepcidine est un petit peptide cationique de 25 acides aminés contenant 8 résidus cystéine qui forment 4 ponts disulfures [15] (figure 2). Ce contenu en cystéine est très conservé entre les différentes espèces, du poisson zèbre à l'homme [20]. Les analyses structurales montrent que la structure secondaire se présente en épingle à cheveux formée de deux feuillets β anti-parallèles, constituant une région hydrophobe de la molécule, séparés par un coude β [21]. Un des ponts disulfures, localisé à proximité de la cavité de la tige boucle, jouerait un rôle crucial dans l'activité de la molécule [22]. Toutefois, les interactions entre les différents ponts disulfures ne sont pas clairement précisées et les avis divergent suivant les études [15, 21, 23]. La structure de l'hepcidine n'est donc pas définitivement établie.

3. Synthèse et maturation de l'hepcidine

Le gène humain de l'hepcidine (*HAMP*) code pour un peptide précurseur de la protéine, ou prépeptide, de 84 acides aminés appelé prohepcidine. Ce peptide est synthétisé par les hépatocytes et la maturation complète a lieu dans le foie [15]. Ce précurseur contient dans sa partie N terminale un peptide signal d'adressage au réticulum endoplasmique de 24 acides aminés et un propeptide d'environ 35 acides aminés avec un site consensus de

clivage de type furine suivi du peptide biologiquement actif de 25 acides aminés du côté C terminal [24]. La furine est un membre de la famille des prohormones convertases. Cette convertase de pré-protéine active les hormones par clivage du précurseur protéique inactif au niveau d'un site consensus RX(K/R)R [25]. Le site consensus de clivage par la furine de la prohepcidine est conservé entre les espèces [26]. Durant son exportation, le peptide précurseur subit deux clivages enzymatiques. Le peptide signal est d'abord clivé et le peptide prohepcidine de 60 acides aminés est dirigé dans le réticulum où un clivage assuré par la furine donne ensuite naissance au peptide mature actif de 25 acides aminés, qui sera rapidement sécrété par les cellules. [24]. Chez l'homme, des fragments de 20 et 22 acides aminés ont été retrouvés dans les urines et sont considérés comme des isoformes du peptide mature de 25 acides aminés (AA), tronquées du côté N-terminal. Les isoformes de 20 et 25 AA sont détectables à la fois dans les urines et le sérum humain, alors que la forme de 22 AA ne peut être détectée que dans les urines [15]. Des délétions séquentielles de la partie N terminale du peptide de 25 à 20 acides aminés provoquent une perte de la capacité à inhiber la ferroportine et causent une accumulation de ferritine dans les cellules [27] suggérant que les 5 acides aminés N terminaux du peptide mature sont critiques pour la liaison à la ferroportine.

Enfin, il a été montré que la pro-hepcidine est biologiquement inactive et que le clivage par la furine est indispensable pour générer la forme active mature de l'hepcidine [28].

Chez la souris, l'hepcidine se présente également sous une forme mature de 25 acides aminés et son processing est similaire à celui chez l'homme [24, 29]. Alors que les souris transgéniques surexprimant l'hepcidine sont anémiques [18] ou présentent une hypoferrémie et une érythropoïèse limitée [30], les animaux transgéniques pour l'hepcidine 2 présentent des paramètres hématologiques normaux, suggérant que l'hepcidine 2 murine n'est pas impliquée dans le métabolisme du fer [18]. L'hepcidine 2 est incapable de lier la ferroportine alors que, parmi les cinq acides aminés critiques en N terminal, seul le deuxième (Isoleucine) est différent de l'hepcidine (Thréonine) [19], confirmant ainsi ce que l'on observe chez l'homme.

4. Mutations dans le gène de l'hepcidine et pathologies associées

Plusieurs mutations dans le gène de l'hepcidine ont été décrites chez l'homme (figure3) :

- des substitutions au niveau des cystéines essentielles à la structure tridimensionnelle de la molécule [31, 32]
- une substitution d'une guanine en arginine en position -25 du messenger créant un nouveau codon initiateur et un peptide complètement différent [33]
- un codon stop prématuré [34]
- une délétion entraînant un décalage de phase de lecture générant un peptide anormalement long [34]
- ou encore une mutation dans le promoteur [35]

Ces mutations conduisent généralement à un peptide tronqué qui ne sera pas maturé. A l'état homozygote, elles entraînent une forme précoce et sévère d'hémochromatose, l'hémochromatose juvénile [36], qui s'accompagne souvent de cirrhose, d'hypogonadisme, de diabète, de cardiomyopathie ou encore d'arthrite. Ces formes d'hémochromatose se déclarent en général vers l'âge de 20 ans et deviennent, en l'absence de traitement, rapidement létales. Associées à l'homozygotie pour la mutation C282Y du gène *HFE*, elles peuvent expliquer des phénotypes sévères de la forme classique de l'hémochromatose [35, 37].

5. Clairance et détection de l'hepcidine

Une fois maturée, l'hepcidine est sécrétée dans la circulation par l'hépatocyte et éliminée dans les urines. Chez la souris, pour diminuer le fer sérique, l'hepcidine apparaît en 4 heures de façon dose dépendante et reste maintenue pendant plus de 48 heures [38]. Lors d'une administration orale de fer pendant 3 jours chez des volontaires sains, le niveau d'hepcidine urinaire est augmenté significativement après 24 heures mais retourne à son niveau basal dès le lendemain malgré la poursuite de l'ingestion de fer. L'hepcidine serait donc rapidement synthétisée et éliminée. En effet, le pic d'hepcidine dans les urines dénote une clairance rapide de la circulation alors que paradoxalement l'effet inhibiteur de l'absorption de fer est maintenu puisque les paramètres ferriques demeurent inchangés les jours suivants l'administration [39]. L'induction de l'expression de l'hepcidine par injection d'IL-6 ou de LPS est rapidement suivie d'une excrétion dans les urines suggérant que l'hepcidine agit comme une protéine de réponse aigüe avec un pic d'action après 6 heures [39, 40].

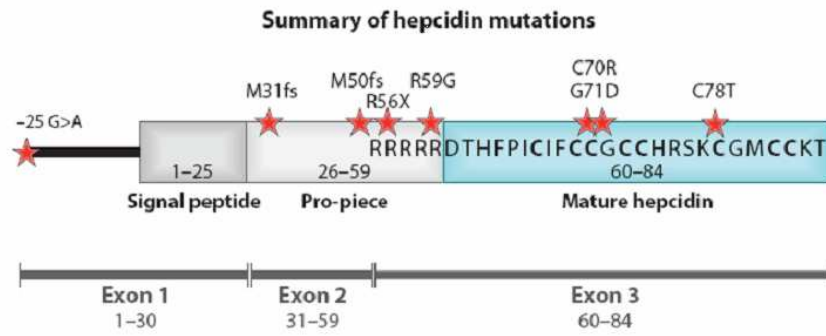


Figure 3 : Les différentes mutations retrouvées dans l'hepcidine (d'après [55])

Afin de mieux évaluer les désordres de l'homéostasie du fer chez l'homme, une méthode fiable pour doser l'hepcidine était indispensable. Toutefois, la structure complexe et compacte de l'hepcidine ainsi que sa petite taille et sa conservation entre les espèces ont rendu difficile la production d'un anticorps valide. Depuis peu, plusieurs techniques permettent de doser l'hepcidine dans le sérum et les urines chez l'homme. Dans un premier temps, seule une équipe avait réussi à produire un anticorps dirigée contre la partie active du peptide [41] pour mesurer par dot blot l'hepcidine urinaire. Récemment, cette même équipe a mis au point un ELISA qui permet le dosage de l'hepcidine dans le sérum [42]. D'autres laboratoires ont développé des méthodes de détection semi-quantitative de l'hepcidine sérique et urinaire par spectrométrie de masse [22, 43]. Néanmoins ces méthodes présentent encore des limites de détection et de reproductibilité et nécessitent d'être améliorées.

II. Mode d'action de l'hepcidine

1. Interaction avec la ferroportine

En résumé, l'hepcidine est une hormone peptidique synthétisée par le foie en réponse aux variations des besoins en fer de l'organisme mais les mécanismes de régulation mis en jeu sont restés longtemps inconnus. La ferroportine, le seul exportateur de fer connu est présent à la surface des entérocytes, des macrophages et des hépatocytes. Il était donc possible que l'hepcidine puisse se lier à la ferroportine de manière à limiter l'incorporation de fer. Pour répondre à cette question, Nemeth *et al.* ont généré en 2004 une lignée cellulaire stable exprimant la ferroportine murine fusionnée dans sa partie C-terminale à la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ils ont montré que la forme mature de l'hepcidine lie *in vitro* la ferroportine dans des cultures de tissus et induit non seulement son internalisation dans les vésicules de clathrine mais aussi la dégradation de la ferroportine dans les lysosomes [16].

Les 5 acides aminés N terminaux de l'hepcidine sont absolument requis pour la fixation à la ferroportine [27]. La ferroportine possède un domaine de liaison à l'hepcidine (HBD pour « hepcidin Binding domain ») constitué d'une boucle extracellulaire adjacente à la boucle intracellulaire. [44]. Ce domaine permet à l'hepcidine d'interagir avec la ferroportine à la surface membranaire. L'interaction avec l'hepcidine induit la phosphorylation de deux tyrosines adjacentes situées dans la partie intracellulaire de la ferroportine. La phosphorylation est indispensable à l'internalisation de la molécule. Une fois internalisée

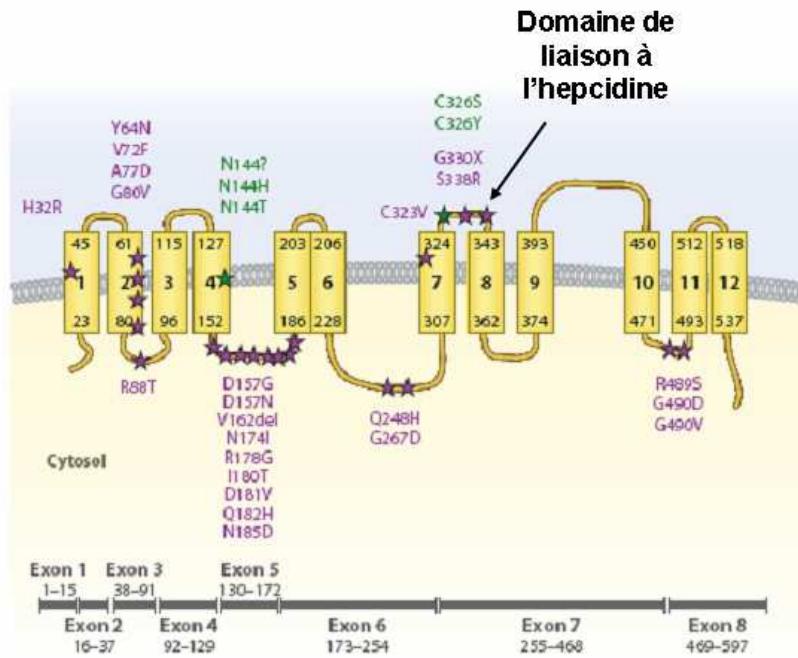


Figure 4 : La structure de la ferroportine et du domaine de liaison à l'hepcidine (d'après [55]).

★ Mutations retrouvées dans le gène humain de la ferroportine

dans l'endosome, la ferroportine est déphosphorylée puis ubiquitinylée et dégradée dans l'endosome tardif [45]. Récemment le mécanisme impliqué dans la phosphorylation des tyrosines a été établi. La liaison de l'hepcidine à la ferroportine induit la fixation et l'activation de la protéine kinase Jak2 (Janus kinase 2) qui va alors assurer la phosphorylation des deux tyrosines intracellulaires [46]. Cependant, la ferroportine est présente à la surface cellulaire sous forme de dimère et chaque monomère doit interagir avec l'hepcidine pour que Jak2 puisse se fixer à la ferroportine suggérant que les deux HBD doivent être fonctionnels. De façon intéressante, la ferroportine est incapable de lier l'hepcidine urinaire ce qui laisse penser que l'hepcidine présente dans les urines n'est pas biologiquement identique à celle retrouvée dans le sérum [45].

2. Mutations dans le gène de la ferroportine et pathologies associées

Chez l'homme, les mutations dans la ferroportine, toutes faux sens [47], aboutissent à une pathologie à transmission dominante avec deux aspects cliniques différents (figure 4). Dans un cas il s'agit d'une résistance à l'hepcidine, la ferroportine n'est pas dégradée, ce qui aboutit à une saturation de la transferrine élevée et une surcharge en fer dans les hépatocytes. Plusieurs scénarios sont envisageables pour expliquer cette résistance. Les mutations pourraient empêcher l'interaction hepcidine/ferroportine ou encore inhiber l'interaction avec Jak2 et la phosphorylation des tyrosines [46, 48-52]. Dans l'autre cas, le plus fréquent, les mutations ne permettent pas l'expression membranaire de la ferroportine ou bien affectent la capacité de la ferroportine à transporter le fer ce qui aboutit à un faible taux de saturation de la transferrine, une ferritine élevée et une surcharge en fer des cellules de küpffer [53]. Cette dernière forme est retrouvée chez la souris « flat iron » qui présente une mutation faux sens (H32R) dans le gène de la ferroportine [54].

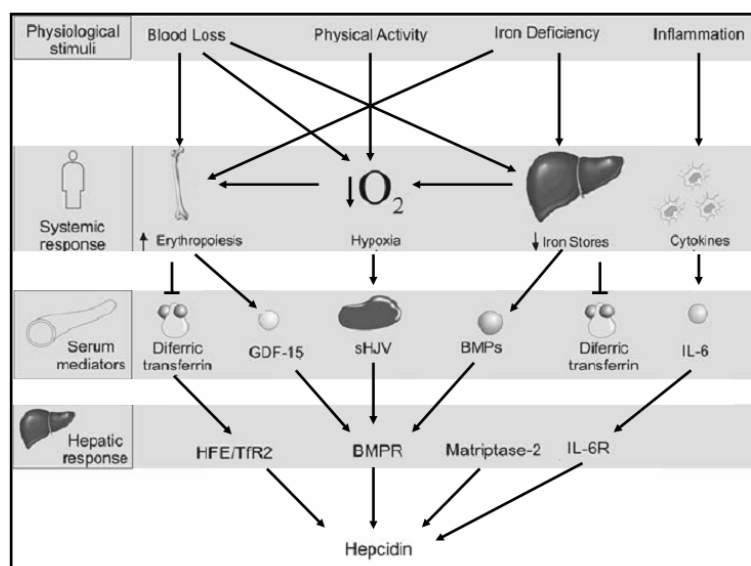


Figure 5 : Les différents signaux qui dirigent l'expression de l'hepcidine (d'après [56])

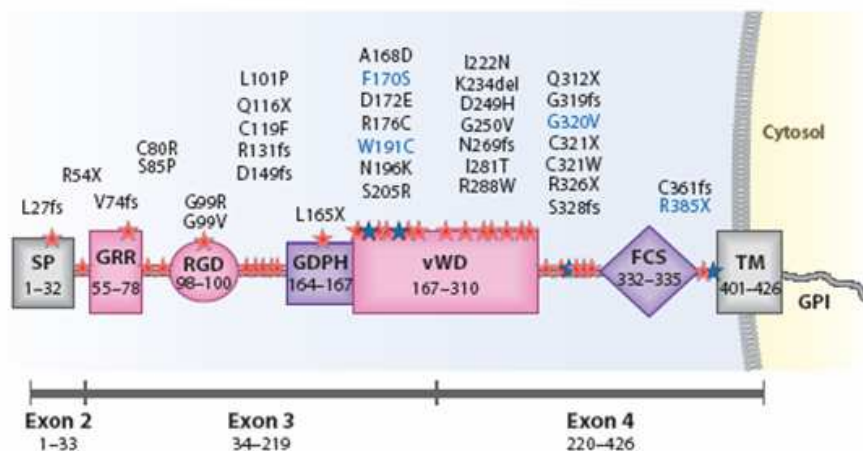


Figure 6 : La structure de l'hémojuvéline et les mutations du gène humain de l'hémojuvéline (d'après [55])

Les mutations retrouvées dans l'hémojuvéline responsables de l'hémochromatose juvénile sont énumérées et représentées par des étoiles. Les différents domaines de la protéine sont représentés selon les abréviations suivantes :

SP : peptide signal, GRR : région riche en glycine, RGD : motif d'adhésion, GDPH : site de clivage protéolytique conservé de quatre acides aminés, vWD : domaine von Willebrand de type D, FCS : site de clivage protéolytique des furines, TM : domaine transmembranaire.

B. La régulation de l'hepcidine

(pour revue [55, 56])

La première régulation qui a permis la découverte de l'hepcidine est la régulation par le fer. Depuis, il a été montré que différentes voies physiologiques ou pathologiques reliées directement ou indirectement au fer telles que l'érythropoïèse, l'anémie, l'hypoxie, l'inflammation chronique et les surcharges martiales secondaires utilisent l'hepcidine comme régulateur pour ajuster les besoins de l'organisme (figure 5). Toutefois, les facteurs impliqués dans ces régulations sont spécifiques de chaque voie et sont synthétisés dans les paragraphes suivants.

I. Le fer

Il est désormais établi que l'expression de l'hepcidine est dirigée par la voie des BMPs dans laquelle le cofacteur principal, l'hémojuvéline, est indispensable à la transduction du signal responsable de l'activation de l'hepcidine.

1. L'hémojuvéline

Nous avons vu précédemment que des mutations dans le gène codant pour l'hepcidine étaient responsables de certaines formes d'hémochromatose juvénile. Cependant, la majorité des cas de cette forme sévère de surcharge en fer sont attribués à des mutations dans le gène *HFE2 (HJV)* codant pour l'hémojuvéline [57, 58] (figure 6). Les patients porteurs de ces mutations présentent de faibles niveaux d'hepcidine malgré une surcharge en fer importante, établissant ainsi pour la première fois un lien entre l'hémojuvéline et la production de l'hepcidine. D'autres mutations retrouvées à l'état hétérozygotes constituent des facteurs aggravant des formes classiques d'hémochromatoses [59]. L'hémojuvéline est une protéine membranaire avec une ancre glycoposphatidylinositol (GPI) qui est fortement exprimée dans le foie, et plus précisément par les hépatocytes entourant la veine portale [39], le cœur et le muscle strié. Les souris invalidées pour le gène *Hjv* reproduisent les symptômes retrouvés chez l'homme, c'est-à-dire une accumulation du fer dans le foie, le cœur et le pancréas parallèlement à une diminution dramatique de l'expression de l'hepcidine alors que la rate est dépourvue de fer [39, 40]. Ces

souris sont toutefois capables d'induire l'expression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation, suggérant que la voie de l'inflammation est indépendante de l'hémojuvéline.

a. Fonction de l'hémojuvéline

L'hémojuvéline est un membre de la famille des « repulsive guidance molecule » qui se compose de trois membres : RGMa, RGMb, également appelé DRAGON [60] et enfin RGMc qui est homologue à l'hémojuvéline [61-64]. Alors qu'il était bien établi que RGMa et DRAGON étaient des corécepteurs de la voie de signalisation des « Bone Morphogenetic Protein » [65], la fonction moléculaire de l'hémojuvéline n'était pas connue. En 2006, l'équipe de Jodie Babitt et Herbert Lin montrait que l'hémojuvéline agissait également comme corécepteur de la voie des BMPs pour activer l'expression de l'hepcidine *in vitro* dans des cellules de foie [66]. Cependant, un aspect intrigant de l'hémojuvéline demeure sa forte expression dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique. Les patients atteints d'hémochromatose juvénile et les souris *Hjv*^{-/-} ne présentent aucun défaut du muscle squelettique excluant un rôle potentiel de l'hémojuvéline dans le développement du muscle. Toutefois le muscle est un grand consommateur de fer en particulier pour la formation de la myoglobine ce qui suggérerait que l'hémojuvéline pourrait jouer un rôle dans la régulation du fer dans le muscle squelettique.

b. Structure et maturation

La protéine HJV est exprimée sous deux isoformes : l'hémojuvéline membranaire, fixée à la membrane par une ancre GPI [67] et l'hémojuvéline soluble (HJVs) dont la maturation (coupure dans la partie C terminale) est effectuée dans l'appareil de Golgi par la furine [68-70]. La forme soluble de l'hémojuvéline est en compétition avec l'hémojuvéline membranaire pour interagir avec les molécules BMP matures et inhiber leur fixation avec les récepteurs BMP. L'hémojuvéline soluble agit donc comme un répresseur de la voie des BMPs [69, 71, 72]. La production d'HJVs est augmentée lors de l'hypoxie ou de carence martiale et mène à une réduction de l'expression de l'hepcidine et une augmentation du fer dans le plasma [68, 72, 73].

HJVs est produite par l'action de la furine et le promoteur de la furine comporte un site de liaison pour le facteur de transcription HIF-1. On peut donc penser que lors d'une hypoxie le niveau de furine est augmenté dans les cellules exprimant l'hémojuvéline endogène, ce qui stimule la production d'HJVs et aboutit à une diminution de l'expression de l'hepcidine [68, 74]. Il a également été montré que l'exercice physique augmente les niveaux

de HIF1 α ainsi que sa capacité de liaison à l'ADN [75, 76] et permet probablement la production d'HJVs par le muscle. Cela permettrait au muscle de signaler ses besoins en oxygène et d'augmenter les apports de fer nécessaires pour la myoglobine.

L'ensemble de ces résultats suggère que la production d'HJVs par le foie et le muscle, induite conjointement par HIF et la furine, réprimerait l'expression de l'hepcidine de façon à satisfaire l'augmentation des besoins en fer de l'organisme en cas soit de carence en fer, soit d'hypoxie. Ceci s'ajouterait à la répression directe de l'hepcidine par HIF1 α .

c. L'interaction néogénine/hémojuveline

Il a également été montré que l'HJV interagit avec la néogénine, un récepteur membranaire impliqué dans différentes voies de signalisation [67]. Cette interaction est indispensable à la production d'hémojuveline soluble qui requière en plus une endocytose cholestérol-dépendante de l'hémojuveline membranaire. Toutefois, comme le transport de HJV du reticulum endoplasmique à la surface des cellules ne dépend pas de la néogénine, la libération de l'hémojuveline soluble intervient donc après que HJV ait été exprimée à la membrane. L'hémojuveline membranaire interagit avec la néogénine, le complexe est re-internalisé et retro-transporté vers le Golgi où l'HJV est tout d'abord clivée par la furine puis glycosylée avec des oligosaccharides complexes avant d'être relâchée sous forme soluble. [73, 77, 78]. Des résultats récemment publiés par l'équipe de Caroline Enns semblent montrer que le complexe HJV/néogénine est requis pour l'induction de la voie des BMPs et l'expression de l'hepcidine *in vitro* et *in vivo*. Malheureusement les études *in vitro* utilisent BMP4 et demandent donc à être confirmées avec BMP6 [79]. La néogénine hépatique posséderait donc deux fonctions : la régulation de la libération d'HJVs et la stimulation de l'expression de l'hepcidine par l'HJV. Cependant d'autres travaux sont nécessaires pour comprendre quel est le rôle précis de la néogénine dans la régulation de l'expression de l'hepcidine.

d. Rôle de TMPRSS6

Un dernier acteur impliqué dans la régulation de l'hepcidine a été caractérisé récemment. Il s'agit de la matriptase 2, une protéase à sérine transmembranaire codée par le gène *TMPRSS6*, exprimée principalement dans le foie et qui joue un rôle important en cas de carence martiale. Les mutations dans ce gène ont été découvertes chez des patients atteints d'une forme d'anémie réfractaire à une administration orale de fer (IRIDA pour « iron-refractory iron deficiency anemia) [80]. Ces résultats ont été confirmés par deux autres

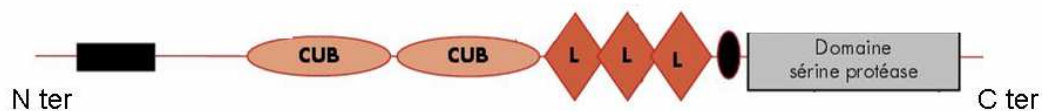


Figure 7 : Représentation schématique des différents domaines de TMPRSS6 (d'après Beaumont C. et Grandchamp B., Hématologie. Volume 14, Numéro 5, 335-8, Septembre-Octobre 2008)

La molécule est constituée depuis l'extrémité N terminale jusqu'à l'extrémité C terminale d'un court domaine intracytoplasmique, d'un segment transmembranaire, de différents modules communs à de nombreuses familles de protéines et qui sont des modules permettant des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand (2 motifs CUB et 3 motifs LDLR) et le domaine sérine protéase.

études qui montrent que des mutations dans le gène *TMPRSS6* conduisent à une anémie avec un défaut d'absorption du fer et une surexpression de l'hépcidine [81, 82].

De la même façon, une mutation récessive induite chimiquement dans le gène orthologue de la souris, *Tmprss6*, conduit à un phénotype particulier « *mask* » qui se caractérise par une perte de la pilosité corporelle (ou alopecie) à l'exception de la tête mais surtout à une anémie microcytaire [83]. Le phénotype *mask* est lié à un défaut d'épissage du gène *Tmprss6* et résulte d'une absorption réduite du fer alimentaire causée par des niveaux élevés d'hépcidine. En conditions normales, l'expression de la protéine TMPRSS6 permet la suppression de l'activation du promoteur du gène *Hamp* et abolit l'expression de l'hépcidine en réponse aux BMPs et à l'HJV [83].

Au même moment, une autre équipe a obtenu une souris invalidée pour le gène *Tmprss6*. Ces souris développent également une alopecie ainsi qu'une anémie sévère accompagnée d'une surexpression de l'hépcidine et d'une expression réduite de la ferroportine à la membrane basolatérale des entérocytes [84]. Le traitement de ces souris avec du fer dextran permet de réverser le phénotype ce qui confirme que l'anémie observée est consécutive à un blocage de l'export intestinal de fer dans la circulation après l'absorption alimentaire. La matriptase-2 agit donc comme répresseur de l'expression de l'hépcidine en conditions normales.

Le mécanisme de cette régulation est désormais connu. La matriptase-2 inhibe l'activation de l'hépcidine par clivage de l'hémojuvéline membranaire, le co-récepteur de la voie des BMPs [85]. Les mutants correspondant à la souris *mask* ou aux patients atteints d'IRIDA sont incapables de cliver l'hémojuvéline et permettent une expression continue de l'hépcidine. La matriptase-2 présente une structure complexe. Elle se compose d'une courte queue cytoplasmique N-terminale, d'un domaine composite CUB (facteur de croissance embryonnaire de l'oursin et BMP1), trois classes de domaines récepteurs aux lipoprotéines de faibles densités (LDLRA) ainsi que d'un domaine C-terminal sérine protéase [86]. Un cas d'IRIDA a été décrit chez un patient portant deux mutations hétérozygotes dans le second domaine LDLRA de la protéine [87]. Les mutations dans les domaines LDLRA et CUB conduisent respectivement à une absence de clivage et à un clivage réduit de l'hémojuvéline membranaire mais ces domaines conservent leur capacité de fixation à l'hémojuvéline [87]. Un schéma représentant la structure de la protéine TMPRSS6 est présenté en figure 7. Ces résultats soulignent l'importance des domaines LDLRA et CUB de la matriptase-2 dans la régulation de l'hépcidine.

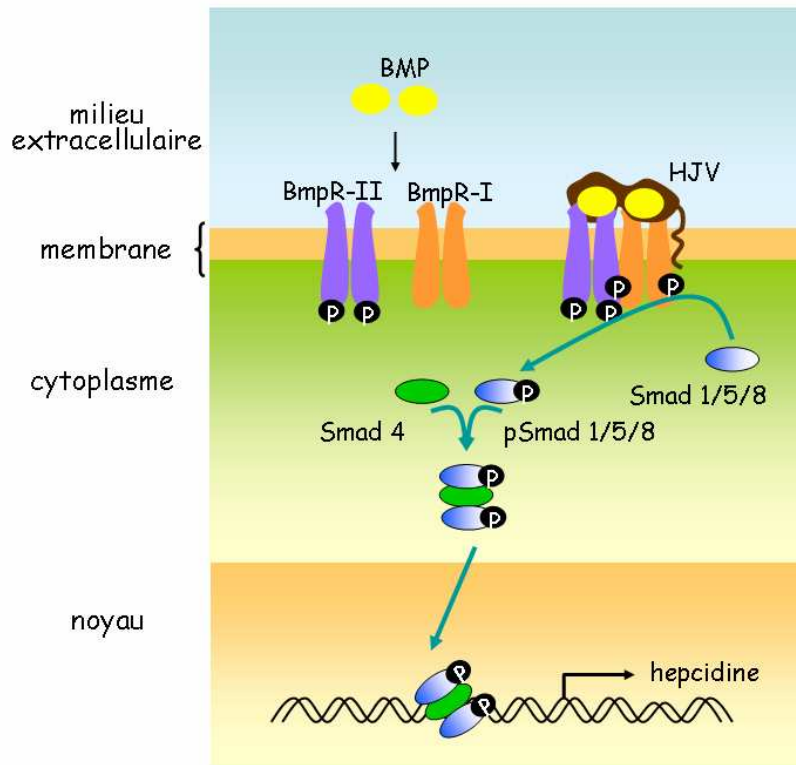


Figure 8 : Représentation de la voie de signalisation des « Bone Morphogenetic Protein »

Dernièrement, l'interaction entre la matriptase-2 et l'hémojuvéline membranaire a été confirmée *in vivo* [88]. Comme attendu, des souris invalidées à la fois pour les gènes *Hjv* et *Tmprss6* expriment très faiblement l'hepcidine et présentent des niveaux élevés de fer sérique et hépatique ainsi qu'une saturation élevée de la transferrine [88].

Deux criblages du génôme ont également montré qu'un polymorphisme localisé dans le domaine serine protéase de *TMPRSS6* était associé à des valeurs de différents paramètres sériques (fer, saturation de la transferrine, taux d'hémoglobine) plus basses que la moyenne générale et ceci dans différentes populations. Ce polymorphisme est relativement fréquent, *TMPRSS6* pourrait donc être considéré comme un gène modulateur dans les anémies et les hémochromatoses associées à *HFE* ou *TFR2* [89, 90].

2. La voie de signalisation des « Bone Morphogenetic protein » (BMP)

a. Les « Bone morphogenetic proteins »

Pour revue [91, 92].

Les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) sont un groupe de molécules phylogénétiquement conservées de la superfamille du TGF- β . Historiquement, ces molécules ont été identifiées pour leur capacité à induire la formation des os et du cartilage [93, 94]. La famille des BMPs compte une vingtaine de molécules qui sont impliquées dans divers processus biologiques, du développement embryonnaire au maintien de l'homéostasie des tissus après la naissance. Les BMPs sont sécrétées sous forme de précurseurs protéiques de 400 à 500 acides aminés composés d'un peptide signal, d'un pro domaine et du peptide mature. Après clivage du peptide signal, la protéine est glycosylée et forme un dimère. Le pro-domaine est alors scindé, puis le peptide actif est sécrété par la cellule. Les BMPs matures diffèrent par leur région carboxy-terminale en fonction du clivage protéolytique et sont sécrétées aussi bien sous forme d'homodimères que d'hétérodimères [95]. Tous les BMPs contiennent sept cystéines dont six sont impliquées dans la formation d'un coude alors que la septième est utilisée pour la dimérisation. Les BMPs se fixent à des récepteurs à sérine/thréonine kinase et plus précisément à deux récepteurs de type II et deux récepteurs de type I, qui sont tous requis pour la transduction du signal [96]. Les BMPs peuvent se fixer sur trois récepteurs de type II (le récepteur des BMPs BMPR-II) et les récepteurs de l'activine Act-RII et Act-RIIB) et trois récepteurs de type I, les récepteurs BMP de type IA BMPR-IA (ou ALK3) et de type IB BMPR-IB (ou ALK6) et un récepteur de l'activine de type IA ActRIA (ou ALK2) [97]. Ces récepteurs sont différenciellement exprimés

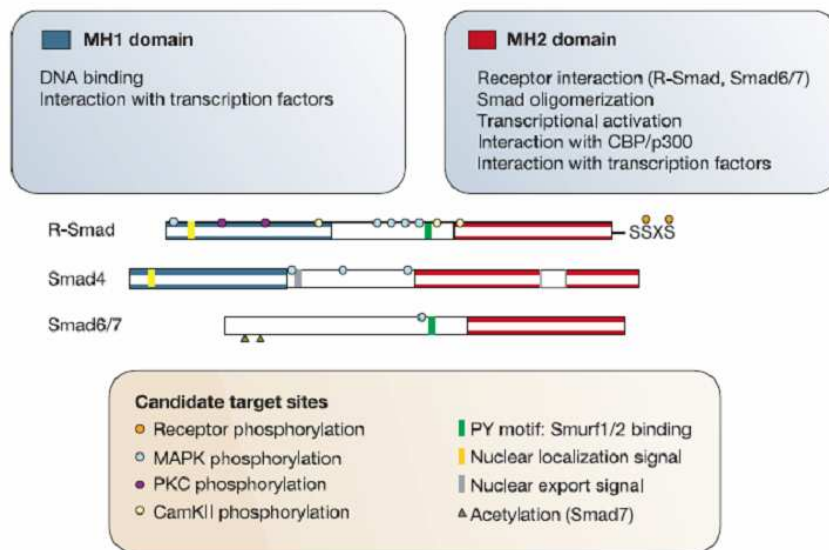


Figure 9 : Organisation structurale des protéines Smad (d'après [99])

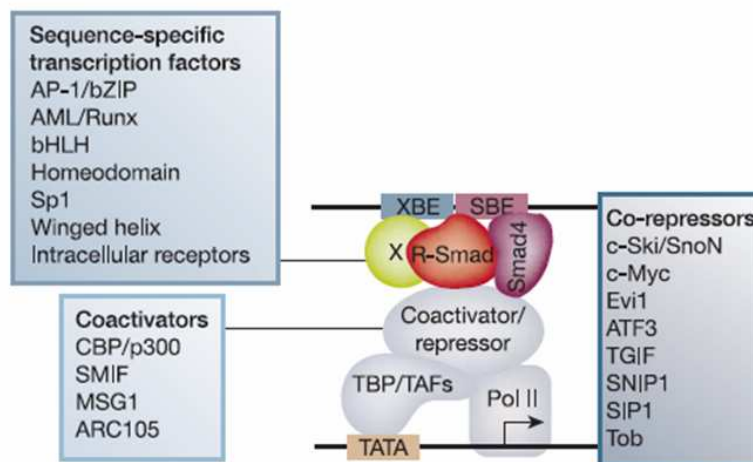


Figure 10 : Mécanisme d'activation de la transcription par les protéines R-Smads (d'après [99])

Les R-Smads coopèrent avec des facteurs de transcription spécifiques ainsi que des coactivateurs ou corépresseurs pour activer la transcription de gènes cibles en réponse à un ligand de la famille du TGF- β .

en fonction des tissus et se retrouvent sous forme d'homo ou d'hétérodimères dans des structures cavéolaires à la surface des cellules [98]. La fixation du ligand spécifique et la voie de signalisation en aval sont régies par les différentes combinaisons possibles entre ces récepteurs lors de la formation du tétramère [99].

b. la voie des BMP/Smads

La voie de signalisation est un système d'activation de la transcription. Elle est commune à tous les BMPs et repose sur une cascade d'activation de molécules par phosphorylation. La cascade est initiée lorsqu'un ligand BMP se fixe à un complexe composé de deux récepteurs de type II et deux récepteurs de type I. L'initiation de cette cascade repose sur différents cofacteurs activateurs ou inhibiteurs spécifiques du tissu et du signal. Par exemple, DRAGON et RGMa, deux protéines homologues, agissent comme corécepteurs des molécules BMP2 et BMP4 en facilitant l'interaction avec les récepteurs de type I et II des BMPs [65, 100]. Le récepteur de type II ainsi activé va alors phosphoryler les récepteurs de type I qui vont à leur tour permettre la phosphorylation d'un complexe formé par les protéines Smads pour « son of mother against decapentaplegic » [101]. Il existe huit protéines Smads chez l'homme et la souris divisées en trois classes [102, 103]:

- les Smads régulés par les récepteurs (ou R-Smad) qui peuvent être activés par les BMPs (Smad1, 5 et 8) ou par le TGF- β (Smad2 et 3)
- le médiateur commun de la voie des BMPs et de la voie du TGF- β : Smad4
- les Smads inhibiteurs (I-Smads): Smad6 et 7

Une fois phosphorylé, l'hétérodimère formé par les Smad1, 5 ou 8 [104] va alors rejoindre le partenaire commun Smad4 puis transloquer dans le noyau de la cellule pour activer la transcription de gènes cibles spécifiques (figure 8). Cette voie de transduction du signal est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et sa régulation, complexe, nécessite de nombreux cofacteurs.

Structure des Smads

Néanmoins, la voie de signalisation des Smads est bien documentée (pour revue [99]). Les protéines Smads sont composés de 500 acides aminés en moyenne et comportent deux domaines globulaires couplée par une région « linker » [101]. Les R-Smads et Smad4 contiennent un domaine N-terminal MH1 (pour « Mad Homology 1 ») et un domaine C-terminal MH2 conservés entre les différents Smads qui se différencient donc par leur région « linker ». Les I-Smad sont dépourvus de domaine MH1 mais possèdent le même domaine MH2. Le domaine MH1 permet la liaison à l'ADN alors que le domaine MH2 assure

l'oligomérisation des Smad et l'interaction avec les récepteurs. De plus, les deux domaines peuvent interagir avec des facteurs de transcription spécifiques et MH2 recrute et interagit avec les coactivateurs CBP (pour « CREB binding protein ») et p300. Enfin, un motif C-terminal SSXS permet l'activation des R-Smads par phosphorylation des deux sérines distales par les récepteurs de type 1 [105-107] (figure 9).

Localisation cellulaire et régulation

En l'absence de stimulation, les R-Smads se localisent dans le cytoplasme alors que la distribution de Smad4 est à la fois nucléaire et cytoplasmique [108-110]. Bien que Smad4 transloque avec les R-Smads, sa présence n'est pas requise. L'import nucléaire se fait grâce à une séquence de localisation nucléaire (NLS) riche en lysine dans le domaine MH1 conservée chez tous les R-Smads [109]. La phosphorylation en C-terminal du domaine MH2 entraîne un changement de conformation qui permet l'exposition de la séquence NLS et la liaison à l'importine β , le transporteur nucléaire [99]. Dans le noyau, les R-Smads sont constamment déphosphorylés ce qui conduit à la dissociation du complexe et l'export des Smads inactifs dans le cytoplasme [110, 111]. Smad4 est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à une NLS dans le domaine MH1 et une séquence d'export (NES) dans la région linker, toutes deux constitutivement actives [110].

Le complexe Smad se fixe directement au promoteur des gènes cibles sur des séquences de liaison aux Smad ou SBE pour « Smad binding element ». La coopération entre ces SBE, des séquences spécifiques de fixation de facteurs de transcription et les coactivateurs CBP et p300 permet l'activation de la transcription. Les Smads peuvent interagir avec un grand nombre de facteurs de transcription qui sont eux-mêmes régulés par de nombreuses voies. Smad4 intervient également comme un coactivateur de la transcription puisqu'il stabilise l'interaction des R-Smads avec l'ADN et CBP/p300 [99] (figure 10).

L'interaction du complexe avec différents coactivateurs ou corépresseurs dirige le niveau d'activation de la transcription.

Le contrôle post-transcriptionnel des Smads est assuré par des protéines de la famille des E3 ubiquitine ligases : Smurf1 et Smurf 2 (pour « Smad ubiquitination-regulatory factor »). Ces protéines interagissent avec les R-Smads et entraînent leur dégradation par le protéasome [112].

Smad6 et Smad7 régulent également la transcription tout d'abord en empêchant la phosphorylation des R-Smads par fixation de leur domaine MH2 aux récepteurs de type I [105-107]. Smad6 peut aussi prévenir la formation d'un complexe effecteur en interférant avec la liaison des R-Smads à Smad4. Enfin, Smad7 inhibe également la transduction du signal par un autre mécanisme en recrutant Smurf1 pour ubiquitinyler puis dégrader les récepteurs de type 1 [113].

c. L'expression de l'hepcidine est régulée par la voie des BMPs

L'étude du mécanisme de régulation de l'expression de l'hepcidine *in vivo* a constitué un axe majeur de mon projet de thèse. L'ensemble de ces travaux sera présenté dans la partie « résultats » de ce manuscrit. Je présenterai donc dans ce chapitre l'état des connaissances au début de ma thèse.

De la même façon que pour RGMA et DRAGON [65, 100], il a été montré que l'HJV agissait également comme un corécepteur des BMPs en liant directement BMP2 et BMP4 pour stimuler l'expression de l'hepcidine *in vitro* dans des lignées cellulaires d'hépatocytes [66]. Peu après, une autre équipe montrait que BMP9 et BMP4 induisaient de manière comparable l'expression de l'hepcidine, plus efficacement que BMP2, aussi bien dans des cultures d'hépatocytes primaires de souris que dans des lignées cellulaires d'hépatocytes humain [114]. Le lien entre la voie de signalisation des BMPs et l'expression de l'hepcidine était alors soutenu par la description d'un modèle de souris invalidé pour le gène *Smad4* spécifiquement dans le foie [115]. Ces souris présentaient une diminution dramatique de l'expression de l'hepcidine ainsi qu'une surcharge en fer multiviscérale, comparable à celle retrouvée chez les souris *Hamp*^{-/-} et *Hjv*^{-/-}.

Toutefois, *in vitro*, l'hémojuvélène soluble n'interagit pas avec BMP9, inhibe faiblement BMP7 et n'est active qu'avec BMP2, BMP4, BMP5 ou encore BMP6 qui se présentent donc comme des régulateurs endogènes potentiels de l'hepcidine [71]. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude qui montrait, toujours *in vitro*, que la synthèse d'hepcidine induite par l'holotransferrine était dépendante de BMP2 et BMP4 mais pas de BMP9 [116]. Enfin, une fois tous les ligands BMP testés dans toutes les lignées cellulaires de foie disponibles, BMP2, BMP4 et BMP6 étaient identifiés comme des ligands endogènes de l'hémojuvélène [117]. Ainsi, la voie de signalisation des BMP/Smad semblait intervenir dans la régulation de l'expression de l'hepcidine par l'intermédiaire d'un ensemble de ligand BMPs et de récepteurs et indépendamment du fer et *in vitro*.

L'étude du promoteur de l'hepcidine soutenait ces observations car il comporte des éléments de réponse aux BMPs (figure 11). Chez l'homme, deux séquences GGCGCC appelées BMP-RE (pour « BMP Responsive Element ») ont été identifiées en positions -84/-79 (BMP-RE1) et -2255/-2250 (BMP-RE2) du promoteur [118, 119]. Ces deux éléments coopèreraient aussi bien pour contrôler l'expression basale du messager de l'hepcidine que pour la réponse de l'hepcidine aux BMPs testés, BMP2 et BMP6. En revanche, contrairement à BMP-RE1, BMP-RE2 n'influence pas la réponse à l'inflammation. Un troisième élément peu conservé entre les espèces, BMP-RE3, a également été caractérisé proche du BMP-RE2 mais n'influencerait pas l'expression de l'hepcidine [119]. Parallèlement, une autre équipe a également mis en évidence ces éléments de réponse aux BMPs dans le promoteur murin de l'hepcidine, entre 140 et 200 paires de bases et entre 1,6 et 1,8 kilobases en amont du site d'initiation de la transcription [120]. De façon intéressante, ces deux régions contrôlent la réponse de l'hepcidine à une surcharge en fer par BMP4 et BMP9 chez des souris transfectées avec différentes constructions du promoteur murin de l'hepcidine [121]. D'autre part, une cartographie fine du promoteur de l'hepcidine a permis de montrer que les 50 paires de bases entourant le motif BMP-RE2 chez la souris sont importantes aussi bien pour la régulation basale de l'expression de l'hepcidine que pour la réponse à une stimulation et sont critiques pour l'expression maximale dirigée par le promoteur *Hamp* [122]. Cette région comporte des sites de fixations bZIP et HNF4/COUP et la délétion d'un seul de ces motifs conduit à une diminution de la réponse à HJV, aux BMPs ou à Smad1. De plus, la région homologue située entre -2,3 et 2,5 kilobases du promoteur humain *HAMP* est également déterminante pour la réponse aux BMPs alors que le BMP-RE3 n'apparaît pas fonctionnel. Enfin, une mutation dans le motif BMP-RE1 a récemment été associée à une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur humain de l'hepcidine et une altération de la réponse à l'IL-6. Cette mutation empêcherait la fixation du complexe protéique SMAD au BMP-RE [35].

II. L'érythropoïèse

La majorité du fer lié à la transferrine dans la circulation est destinée aux érythrocytes de la moelle osseuse pour la synthèse de l'hémoglobine. Environ 65 à 70% du fer dans le corps existe sous cette forme dans les globules rouges circulants [123]. Les besoins en fer sont contrôlés par l'érythropoïèse qui serait le régulateur dominant de l'expression de l'hepcidine. En effet, lorsque l'érythropoïèse est stimulée par une perte sanguine ou une hémolyse, l'expression de l'hepcidine est réduite [20, 124] même en présence d'une surcharge en fer comme cela a été observé chez les patients atteints de β thalassémie [125].

1. L'érythropoïétine

Le premier signal qui stimule l'érythropoïèse est l'érythropoïétine (EPO), un facteur de croissance stimulant la prolifération des cellules souches précurseurs des globules rouges dans la moelle osseuse et donc l'augmentation du nombre de globules rouges dans le sang. La stimulation de l'érythropoïèse est concomitante avec une diminution du fer dans le foie et dans les tissus. Le rôle direct de l'EPO sur les variations de l'hepcidine lors de l'érythropoïèse a été démontré *in vivo* et *in vitro*.

L'injection d'EPO à des souris aboutit à une diminution de l'hepcidine [126]. A l'inverse, l'érythropoïèse est inhibée lorsque des souris sont irradiées ou traitées avec des inhibiteurs d'EPO (carboplatine, doxorubicine) et l'expression de l'hepcidine augmente [126, 127]. Le traitement de lignées cellulaires d'hépatome avec de l'EPO conduit à une diminution de la synthèse d'hepcidine par les hépatocytes [128]. Ces résultats ont été confirmés dans cultures d'hépatocytes primaires de souris et la lignée cellulaire hépatique HepG2 [129]. L'EPO semble donc avoir un rôle direct dans la régulation de l'hepcidine *via* la modulation de l'expression de C/EBP α , une protéine impliquée dans la régulation de la transcription de l'hepcidine [130].

D'autres facteurs impliqués dans l'érythropoïèse pourraient aussi être impliqués dans la régulation de l'hepcidine.

2. GDF15

Une érythropoïèse exacerbée nécessite une expansion des compartiments érythroïdes et la maturation des érythroblastes. Ces changements sont accompagnés d'une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'un facteur de croissance et de différenciation GDF 15 (pour « growth differentiation factor »), un membre de la famille du TGF- β [131]. Bien que GDF15 soit présent en grande quantité chez les patients atteints de thalassémie chez lesquels l'absorption de fer est augmentée et l'expression de l'hepcidine diminuée, il semble n'avoir qu'un impact modeste sur l'inhibition de l'expression l'hepcidine *in vitro*. De plus, le suivi de patients ayant bénéficié d'une transplantation de cellules souches érythropoïétiques ne révèle aucune corrélation entre les niveaux de GDF15 et d'hepcidine [132], ce qui suggère que ce facteur ne jouerait pas un rôle de premier plan dans la régulation de l'hepcidine.

3. TWSG1

Récemment, un autre acteur possible de la régulation de l'érythropoïèse a été identifié. Tanno *et al.* ont exploré le rôle de TWSG1, une cytokine exprimée par les érythroblastes, comme régulateur érythroïde potentiel de l'expression de l'hepcidine. TWSG1 supprimerait l'expression de l'hepcidine en inhibant la voie des BMPs induite par BMP2 et BMP4 [133].

Bien que l'EPO, GDF15 et TWSG1 soient probablement impliqués dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine par l'érythropoïèse, les mécanismes complexes impliqués dans cette régulation sont encore mal connus et nécessitent d'être explorés plus en détail.

III. L'hypoxie

L'anémie se définit par une faible concentration en globules rouges et conduit non seulement à une augmentation de l'érythropoïèse mais également à une diminution de l'apport d'oxygène aux tissus ce qui provoque une hypoxie. L'anémie et l'hypoxie sont caractérisées par la diminution dramatique de l'expression de l'hepcidine dans le foie, la libération du fer par les cellules du système réticuloendothélial [20] et par une augmentation de l'absorption duodénale du fer [134].

1. HIF1 α

L'hypoxie induit la synthèse d'HIF1 α par les hépatocytes. HIF1 (pour « hypoxia inducible factor 1 ») est un facteur de transcription qui se présente sous la forme d'un hétérodimère composé d'une sous unité HIF1 α , régulée par l'oxygène, et d'une sous-unité HIF1 β qui est exprimée de façon constitutive. En condition normoxique, HIF1 α est synthétisée, hydroxylée et dégradée en continu. La dégradation de HIF1 α est dirigée par la protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) qui entraîne l'ubiquitylation de la sous-unité et sa dégradation par le protéasome [135-137]. Quand la disponibilité en oxygène devient insuffisante, la sous-unité n'est pas hydroxylée et la dégradation d'HIF1 α est donc inhibée. La protéine s'accumule et forme un dimère avec HIF1 β pour aller se fixer sur les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE pour « hypoxia responsive element ») des gènes cibles. De cette façon, HIF1 régulerait la transcription de centaines de gènes spécifiquement selon le tissu considéré [138]. De façon tout à fait intéressante, il a été montré par des expériences d'immunoprécipitation que HIF1 α s'associe aux promoteurs humains et murins

de l'hepcidine [139]. L'induction de HIF1 lors de carence en fer de même que l'invalidation du gène *vhl* chez la souris sont associées à une diminution notable de l'expression de l'hepcidine, confirmant ainsi que la voie VHL/HIF1 est impliquée dans la régulation de l'hepcidine et de l'homéostasie du fer [139]. Enfin, HIF1 α intervient également dans l'induction de l'expression de la furine en situation de carence martiale ou d'hypoxie pour réguler la synthèse d'hepcidine. En effet, la furine assure le clivage de l'hémojuvéline membranaire en hémojuvéline soluble, un inhibiteur de l'expression de l'hepcidine [68]. Ce mécanisme est détaillé dans le paragraphe « hémojuvéline ».

2. HIF2 α

HIF2 α est une autre sous-unité de HIF et jouerait un rôle crucial dans l'absorption intestinale de fer. Contrairement à *Hif1 α* , la délétion du gène *Hif2 α* spécifiquement dans l'épithélium intestinal chez la souris conduit à une réduction de l'expression du gène *Dmt1* parallèlement à une diminution du fer sérique, du fer dans le foie et de l'expression hépatique de l'hepcidine [140]. De plus, il a été montré que l'inactivation de *Hif1 β* (et par conséquent l'inactivation de toutes les isoformes HIF- α) dans l'intestin de souris ne permet plus, en cas de carence, d'augmenter l'absorption intestinale de fer alors que l'inactivation de HIF-1 α dans l'intestin est sans effet. Or, une privation en fer induit l'expression protéique de HIF2 α . De même, la surexpression de HIF2 α dans l'intestin conduit à une augmentation de l'expression de *Dcytb* et *DMT1* qui seraient donc des cibles directes de HIF2 α [141]. Ces données suggèrent que *Hif2 α* est également impliquée dans la régulation de l'absorption intestinale de fer.

IV. L'inflammation

Le dernier volet de ce chapitre se focalise sur la régulation de l'expression de l'hepcidine par l'inflammation. Le lien entre l'inflammation et l'hepcidine a été tout d'abord évoqué car des patients atteints d'anémie chronique due à une inflammation ou ACD pour « anemia of chronic disease » présentaient une hypoferrémie liée à une expression excessive de l'hepcidine [142]. L'expression de l'hepcidine est stimulée par les cytokines inflammatoires IL-6, IL-1 α et IL-1 β [143, 144]. En effet, le traitement d'hépatocytes en culture ou de lignées cellulaires d'hépatocytes avec de l'IL-6 stimule l'expression de l'hepcidine [143]. De même, l'administration d'IL-6 chez l'homme conduit à une hypoferrémie consécutive à une augmentation de la synthèse d'hepcidine alors que les souris invalidées pour le gène *Il-6* sont incapables de produire de l'hepcidine et ne deviennent pas anémiques

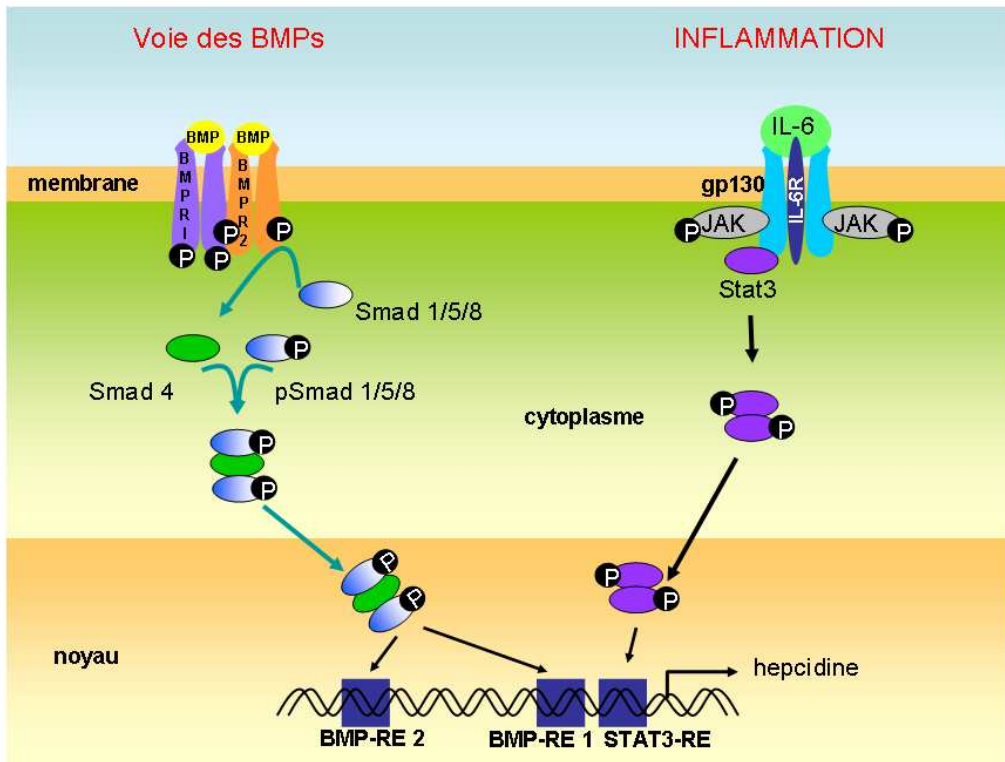


Figure 11 : Schéma représentant la voie d'activation de la transcription de en l'hepcidine en réponse à l'inflammation.

A droite, la voie des BMPs et à gauche la voie initiée par l'IL-6. Les deux voies aboutissent à l'activation du promoteur de l'hepcidine.

après traitement avec une endotoxine [41]. L'IL-6 est donc un régulateur majeur de la réponse aiguë à l'inflammation dans l'hépatocytes.

1. La voie de l'IL6

Sous l'influence d'un stimulus inflammatoire, l'IL-6 est libérée et se fixe à un complexe composé du récepteur α de l'IL-6 et de la glycoprotéine gp130 [145] (figure 11). Cette interaction conduit à l'activation de protéines kinases Janus JAK qui vont phosphoryler les protéines de transduction du signal et d'activation de la transcription STAT (pour « signal transducers and activators of transcription », en particulier STAT3. Une fois phosphorylé et sous forme d'homodimère, STAT3 entre dans le noyau pour réguler la transcription de nombreux gènes cibles [146]. L'IL-6 régule l'expression de l'hepcidine par liaison directe de STAT3 au promoteur de l'hepcidine [147] et plus précisément sur un motif de liaison à STAT3 situé en position -64/-72 du promoteur [148]. Une autre étude a ensuite confirmé le rôle de STAT3 dans l'expression hépatique de l'hepcidine en réponse à l'IL-6 à la fois *in vitro* et *in vivo* [149]. D'autre part, bien que l'IL-6 ait été extensivement étudiée pour son rôle de régulateur principal de l'inflammation, l'IL-1 peut également induire l'hepcidine dans les hépatocytes de souris *IL-6^{-/-}* [144].

2. La voie des BMPs

D'autres travaux suggèrent l'existence d'une voie parallèle pour réguler l'expression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation qui impliquerait la voie des BMPs et rejoindrait donc la voie de régulation de l'hepcidine par le fer (figure 11). En effet, les souris invalidées pour le gène *Smad4* présentent de faibles niveaux d'hepcidine ainsi qu'une surcharge en fer multi-viscérale et sont incapables d'augmenter leur niveau d'hepcidine lorsqu'elle sont traitées avec de l'IL-6 [115], suggérant un rôle de Smad4 dans la régulation de l'hepcidine par l'inflammation. Or Smad4 est un médiateur commun à la voie des « Bone Morphogenetic Protein » impliquée dans la régulation de l'hepcidine par le fer. Cette hypothèse est renforcée par l'observation que l'ablation de l'élément de réponse proximal des BMPs dans le promoteur de l'hepcidine [118] ou l'inhibition du récepteur des BMPs à l'aide d'un inhibiteur spécifique, la dorsomorphine [150], abolit l'induction de l'expression de l'hepcidine par l'IL-6. La possibilité d'une voie commune pour la régulation de l'expression de l'hepcidine par le fer et l'inflammation sera discutée dans la partie « résultats » de ce manuscrit.

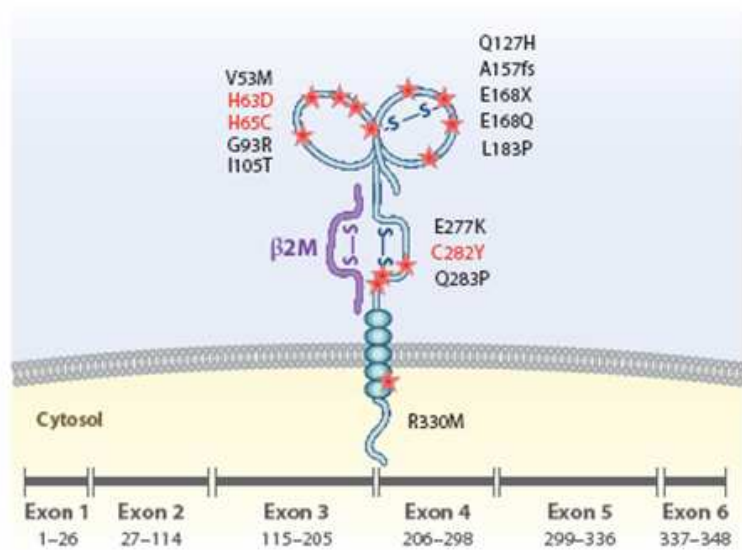


Figure 12 : Représentation schématique de la structure de la molécule HFE (d'après [55])

Les mutations impliquées dans les formes d'hémochromatose liée à HFE sont énumérées. Les mutations les plus communes sont représentées par une étoile rouge.

C. Deux autres acteurs de la régulation de l'homéostasie martiale par le foie : HFE et TFR2

Nous avons vu que les désordres héréditaires du métabolisme du fer pouvaient être dus à des mutations dans les gènes de l'hepcidine, de l'hémojuvéline ou encore de la ferroportine. Cependant, des mutations dans les gènes *HFE* ou *TFR2* sont également associées à des syndromes de surcharge martiale de type hémochromatose avec des sévérités variables et un déficit de synthèse de l'hepcidine. Cette régulation intervient dans le foie, et plus précisément dans les hépatocytes. Plusieurs questions demeurent sans réponse en particulier quelle est la fonction exacte de HFE et de TFR2 dans la régulation de l'hepcidine et est-ce que ces deux molécules sont impliquées dans la voie BMP/Smad pour réguler l'hepcidine.

I. Le rôle de HFE

1. Structure

Le gène *HFE* (pour « High Fer ») est localisé chez l'homme sur le chromosome 6 en position p21.3 et code pour une glycoprotéine transmembranaire de 343 acides aminés, une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I non classique. En effet, la protéine HFE se compose de trois domaines extramembranaires α_1 , α_2 , et α_3 , un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Comme la plupart des molécules de classe I, HFE est associée à la β_2 microglobuline et seul l'hétérodimère est exprimé à la surface de la cellule [151] (figure 12). La protéine est faiblement exprimée dans de nombreux tissus, dont les hépatocytes, le lieu de synthèse de l'hepcidine [152].

2. HFE et hémochromatose

Le gène *HFE* est impliqué dans l'hémochromatose héréditaire, une maladie autosomique récessive fréquente dans le nord de l'Europe. La maladie se caractérise par une absorption excessive du fer alimentaire par le duodénum et par une augmentation de la libération du fer des cellules réticuloendothéliales. Ceci aboutit à une surcharge en fer dans les cellules parenchymateuses de différents tissus, en particulier dans le foie et, en l'absence de traitement, à une cirrhose ou un cancer du foie [153, 154]. La forme la plus courante de la maladie est due à la transition de la guanine 845 en adénine (G845A) dans l'exon 4 du gène

HFE qui provoque la substitution d'une cystéine par une tyrosine en position 282 de la protéine (figure 12). Cette mutation élimine la formation du pont disulfure du domaine α_3 et empêche l'association de la molécule avec la β_2 microglobuline [151]. La protéine mutée est rapidement dégradée et n'est alors plus adressée à la surface des cellules [155].

D'autres mutations dans le gène *HFE* ont été caractérisées notamment H63D [152] et S65C [156]. Le rôle de la mutation H63D dans l'apparition de la surcharge en fer est toujours sujet à débats. La mutation H63D est relativement fréquente dans la population du nord de l'Europe mais ce polymorphisme n'a probablement pas de conséquences fonctionnelles car la plupart des individus homozygotes H63D ne présentent pas de troubles de l'homéostasie du fer. Toutefois il y a un excès, parmi les patients atteints de surcharge en fer, d'hétérozygotes composites H63D/C282Y. Ces derniers présentent généralement des surcharges plus modérées que les individus homozygotes C282Y [152]. Il est donc possible que, associée à C282Y, la mutation H63D puisse perturber la fonction de la molécule.

Il faut également souligner que la surcharge en fer n'apparaît pas chez tous les individus porteurs du génotype C282Y homozygote [157, 158] car la pénétrance de la maladie est incomplète. L'expression du phénotype dépend de facteurs environnementaux et de gènes modificateurs [37, 159-161]. En effet, chez la souris, le phénotype varie selon le fond génétique, les souris DBA/2 *Hfe*^{-/-} accumulent naturellement plus de fer dans le foie que les souris C57BL/6 *Hfe*^{-/-} [162]. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse a généré des souris F2 issues d'un croisement entre ces deux souches et identifié 4 régions chromosomiques contenant des gènes modificateurs potentiels connus pour exercer un rôle important dans le métabolisme du fer [163], confirmant ainsi le caractère multi-génique aboutissant à la surcharge en fer.

3. Fonction de HFE

La fonction précise de *HFE* est toujours indéterminée. La molécule n'est pas requise pour limiter l'absorption intestinale de fer puisque l'absorption diminue au cours du temps chez des souris invalidées pour le gène *Hfe* [164]. L'installation de la surcharge s'explique par une expression inappropriée de l'hépcidine par rapport à la charge en fer de l'organisme lorsque *HFE* n'est pas fonctionnelle [165] aussi bien chez l'homme [166] que chez la souris [167]. Le croisement de souris *Hfe*^{-/-} avec des souris transgéniques surexprimant l'hépcidine conduit à une diminution de la surcharge en fer [168] ce qui a permis de prouver que cette surcharge est liée à une expression réduite de l'hépcidine en l'absence de *Hfe*. De plus, les patients homozygotes C282Y traités ont des niveaux d'hépcidine urinaire plus faibles que les

sujets sains [169, 170] et sont incapables d'augmenter leur hepcidine en réponse à un traitement oral de fer [169]. Le foie, où HFE est le plus fortement exprimée [152], apparaît comme le site principal de cette régulation. En effet, alors que les délétions du gène *Hfe* spécifiquement dans l'intestin ou dans le macrophage sont sans conséquence [171, 172], les souris invalidées pour le gène *Hfe* spécifiquement dans les hépatocytes développent une surcharge en fer intrahépatique [172]. De la même façon, il a été montré que des patients hémochromatosisques portant la mutation C282Y qui avaient bénéficié d'une transplantation hépatique ne présentaient pas de réaccumulation de fer dans le foie [173]. Pour résumer, ces données suggèrent que l'hépatocyte est le site d'action physiologique de HFE qui agirait en amont de l'hepcidine pour contrôler l'entrée du fer dans l'organisme.

II. Les récepteurs de la transferrine

1. Le récepteur I de la transferrine

Le fer est véhiculé dans la circulation sanguine par une glycoprotéine : la transferrine, qui peut fixer deux atomes de fer ferrique [7]. L'assimilation du fer lié à la transferrine se fait à la surface des cellules par endocytose après liaison au récepteur 1 de la transferrine (TFR1). Au pH extracellulaire, le récepteur a une affinité supérieure pour la transferrine diférrique que pour la transferrine monoférrique ou l'apo-transferrine. Après endocytose, l'acidification de l'endosome induit un changement de conformation de la transferrine et une perte d'affinité pour le fer conduisant ainsi à sa libération [174]. Le fer est alors transféré de l'endosome vers le cytosol par l'intermédiaire de Nramp1 [175]. L'apo-transferrine et son récepteur seront ensuite recyclés à la surface cellulaire [174].

Le récepteur 1 de la transferrine est un homodimère codé par le gène *TFR1* sur le chromosome 3 en position 3q29. Chaque sous-unité est composée d'une partie globulaire extracellulaire qui fixe la transferrine, une région transmembranaire hydrophobe et une partie cytoplasmique [176]. TFR1 est exprimé dans de nombreux tissus et dans les cellules érythroïdes mais plus faiblement dans le foie [177, 178]. L'expression de TFR1 est régulée par le fer de façon post-transcriptionnelle. Le transcrit *TFR1* contient 5 éléments de réponse au fer (IRE pour « iron responsive element ») dans sa région 3' non traduite. Lorsque le fer vient à manquer, des protéines de régulation du fer (IRP pour « iron regulatory protein ») se fixent sur les IRE ce qui entraîne la stabilisation du message, l'augmentation de sa demi-vie et donc de la traduction. A l'inverse, lorsque le fer est présent en excès, les IRP ne se fixent pas et le message instable est rapidement dégradé [179, 180]. Des éléments de réponse à

l'hypoxie sont également retrouvés dans le promoteur de *TFR1* et permettent d'augmenter la transcription en présence de HIF-1 [181-183]. Les souris invalidées pour le gène *Tfr1* ne sont pas viables et meurent prématurément durant le développement embryonnaire d'une anémie sévère liée à un défaut d'érythropoïèse accompagné d'anomalies neurologiques, soulignant ainsi le rôle essentiel de TFR1 dans le métabolisme du fer [184].

2. Le récepteur II de la transferrine

Un deuxième récepteur, le récepteur 2 de la transferrine, a été cloné en 1999. Il est codé par le gène *TFR2* en position 7q22 [177] et exprimé exclusivement dans les hépatocytes, les cellules hématopoïétiques et les cellules des cryptes duodénales [177, 185]. TFR2 est une protéine transmembranaire de type II similaire à TFR1 (45% d'identité et 66% de similarité) capable de fixer la transferrine mais avec une affinité 25 fois plus faible que TFR1 [186].

a. Fonction de TFR2

Les deux récepteurs exercent des fonctions différentes puisque chez la souris, *Tfr2* ne compense pas l'absence de *Tfr1* [184]. Dans le foie, TFR2 est exprimé préférentiellement dans les hépatocytes et assure l'assimilation cellulaire du fer lié à la transferrine [177, 187, 188].

Contrairement à TFR1, TFR2 n'est pas régulé par le fer. Le messageur ne contient pas d'IRE [189] et les niveaux de fer dans la cellule n'influent pas sur l'expression du messageur. L'expression hépatique du messageur *Tfr2* ne varie pas que ce soit chez des souris nourries avec des alimentations enrichies et carencées en fer ou des souris *Hfe^{-/-}* [178]. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* dans des lignées cellulaires hépatiques où le niveau de messageur *TFR2* ne varie pas lorsque les cellules sont exposées à de la transferrine differique [190]. En revanche, la protéine TFR2 augmente de manière dose-dépendante en réponse à la transferrine, probablement parce que la demi-vie de la protéine est augmentée [190]. De même, la quantité de protéine Tfr2 est augmentée dans le foie de rats nourris avec des alimentations surchargées en fer et de souris *Hfe^{-/-}* et diminuée dans le foie de rat carencés en fer, suggérant que l'expression protéique de Tfr2 est corrélée aux variations de saturation de la transferrine *in vivo* [188]. En résumé, l'expression protéique de TFR2 semble être induite par la saturation de la transferrine.

b. Pathologies associées à TFR2

Le lien entre TFR2 et la régulation de l'homéostasie du fer est apparu en 2000 avec la découverte d'une mutation dans le gène *TFR2* conduisant à une surcharge en fer qui fut baptisée hémochromatose de type 3 [191]. La transition d'une cytosine en une guanine dans l'exon 6 en position 750 du gène *TFR2* conduit au remplacement d'une tyrosine par un codon stop en position 250 de la protéine (Y250X). Les symptômes sont similaires à ceux associés à l'hémochromatose liée à *HFE* c'est-à-dire une augmentation du fer sérique, de la saturation de la transferrine et une surcharge en fer dans les hépatocytes [191]. Depuis, d'autres mutations dans le gène *TFR2* ont été mises en évidence [192-196]. Comme dans les surcharges liées à *HFE*, les patients atteints d'hémochromatose de type 3 présentent de très faibles niveaux d'hepcidine urinaire [197], inappropriés au regard de la surcharge en fer. L'expression hépatique de l'hepcidine est inversement corrélée à la saturation de la transferrine [198].

Les modèles de souris *Tfr2*^{-/-} reproduisent fidèlement la maladie avec une saturation de la transferrine élevée et une surcharge en fer hépatique alors que la rate est dépourvue de fer [199-201]. De plus l'expression hépatique de l'hepcidine est diminuée parallèlement à une augmentation de l'expression de *Dmt1* et l'injection intra-péritonéale de fer dextran ne permet pas d'élever les niveaux d'hepcidine [200]. L'ensemble de ces données indique que *TFR2* est un autre gène impliqué dans la régulation de l'expression de l'hepcidine et de l'homéostasie du fer.

Le rôle potentiel de TFR2 dans les anémies induites par l'inflammation a également été étudié et les résultats montrent que l'augmentation de l'expression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation est indépendante de TFR2. En effet, *in vitro*, les hépatocytes de souris *Tfr2*^{-/-} sont capables d'induire l'expression de l'hepcidine en réponse à un traitement avec de l'IL-6 [200, 202] et les souris *Tfr2*^{-/-} augmentent l'expression de l'hepcidine après injection de LPS [202]. De plus, les patients déficients pour *TFR2* souffrant d'inflammation chronique présentent des niveaux d'hepcidine urinaire plus élevés que les autres patients [197].

Malgré de nombreux travaux, le rôle exact de TFR2 dans l'établissement des surcharges en fer intrahépatique n'est toujours pas clair. Contrairement à TFR1, TFR2 est retrouvé dans les radeaux lipidiques à la membrane [203]. Une étude récente montre que, dans des cultures d'hépatocytes primaires, l'induction de la voie ERK1/2 par l'holotransferrine provoque la phosphorylation des Smad1/5/8 [204]. Les auteurs suggèrent

que la signalisation initiée par TFR2 et l'holotransferrine utiliserait une voie commune à ERK1/2 et la voie BMP/HJV par l'intermédiaire des protéines Smads pour réguler l'expression de l'hepcidine mais indépendamment de HFE qui ne serait nécessaire qu'à l'expression basale de l'hepcidine [204]. Une autre étude suggère que la liaison de la transferrine différique à TFR2 pourrait activer les voies de signalisation ERK1/2 et p38-MAPK [203]. Toutefois le rôle exact de TFR2 dans l'homéostasie du fer reste à déterminer.

III. L'interaction HFE/TFR2

Peu après la découverte de HFE, il a été mis en évidence que cette molécule interagissait physiquement avec TFR1 *via* les domaines α_1 et α_2 pour limiter l'entrée du fer lié à la transferrine dans les cellules [205-207]. Les résultats obtenus *in vitro* montraient que HFE bloquait non seulement la fixation de la transferrine sur TFR1 mais aussi l'internalisation de TFR1 [208].

HFE peut également former un complexe protéique avec TFR2 *in vitro* et les mutations dans les gènes *HFE* (à l'exception de C282Y) et *TFR2* associées aux formes d'hémochromatose n'empêchent pas cette interaction [209]. En revanche, TFR2 et TFR1 sont en compétition pour la liaison à HFE [209]. Des études récentes sur des souris présentant différentes mutations dans le gène *Tfr1* suggèrent qu'en conditions normales, TFR1 séquestre la molécule HFE et la maintient inactive [210]. TFR1 a plus d'affinité pour la transferrine différique [211] et les sites de fixation de HFE et de la transferrine se chevauchent [206, 207, 212]. Ainsi, lorsque la concentration en fer sérique augmente, la transferrine différique va déplacer HFE pour se fixer à TFR1. Une fois libérée de TFR1, HFE pourrait alors interagir avec TFR2 pour réguler la synthèse d'hepcidine [210, 213]. A l'inverse de HFE/TFR1, le complexe HFE/TFR2 ne se dissocie pas en présence de fortes concentrations en transferrine [214]. Le domaine α_3 de HFE est indispensable pour l'interaction avec TFR2 et le complexe HFE/TFR2 est requis pour la régulation de l'hepcidine en réponse à l'holotransferrine [213]. Néanmoins, il reste à déterminer par quel mécanisme le complexe accomplit cette régulation.

OBJECTIFS

L'hépcidine est le régulateur central de l'homéostasie du fer dans l'organisme. Il est désormais établi que l'expression de l'hépcidine peut être induite par la voie de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses et que l'hémojuvéline est un cofacteur indispensable à cette activation. Toutefois, lorsque j'ai commencé ma thèse, cette idée commençait tout juste à émerger.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'identifier les gènes différenciellement exprimés dans le foie de souris en fonction du contenu en fer intra-hépatique. Nous avons constaté que le gène *Bmp6* présentait le même profil d'expression que l'hépcidine c'est à dire que son expression variait en fonction du statut martial de l'organisme

Le deuxième objectif a été de confirmer l'importance physiologique de BMP6 dans la gestion des besoins en fer. Pour cela nous avons étudié des souris invalidées pour le gène *Bmp6* et montré qu'elles développaient une surcharge en fer massive dans le foie, le pancréas et le cœur.

Le troisième objectif a été de vérifier si HFE participait à la voie de signalisation des BMPs. Nous avons utilisé des souris déficientes pour le gène *Hfe* et nous avons effectivement montré que HFE participait à l'activation de cette voie en modulant la phosphorylation des molécules Smad 1/5/8 par un mécanisme intervenant en aval de BMP6.

MATERIEL ET METHODES

1. Les souris

Au cours de ce travail, des souris avec différents fonds génétiques ont été utilisées, principalement C57BL/6, DBA/2, Sv 129/J, Swiss. Toutes les lignées de souris sont maintenues dans l'animalerie de l'IFR30 où elles bénéficient en permanence d'un libre accès à la nourriture R03, (200 mg de fer par kg) et à l'eau. Les souris sont mises à jeun 14h avant leur sacrifice. Les organes sont prélevés puis immédiatement congelés en azote liquide en vue d'utilisations ultérieures, ou fixés dans du paraformaldéhyde pour les expériences d'histologie. Dans le cadre des expériences d'injection de LPS les souris ne subissent pas de jeûne préalable au sacrifice.

2. Dosage du fer intra-hépatique

Les foies sont broyés dans un tube contenant une bille de céramique à l'aide d'un broyeur FastPrep-24 (MP Biomedicals). Un aliquot de foie broyé (100 mg) est ensuite transféré dans un tube contenant 1 mL d'un mélange d'acide (30% d'acide chlorhydrique 12 N, 10% d'acide trichloroacétique 0,5M) puis chauffé à 65°C pendant 20h. Le mélange d'acide permet de rompre les liaisons fer-transferrine et d'éliminer les protéines. Un témoin négatif contenant uniquement 1 mL de solution acide est incubé dans les mêmes conditions que les échantillons de foie. Les tubes sont amenés à température ambiante puis centrifugés 15 minutes à environ 600g. Le surnageant (environ 800 μ L) est ensuite transféré dans un autre tube et 5 μ l de cette solution sont utilisés pour le dosage qui s'effectue en plaque 96 puits. La concentration en fer non hémique de l'échantillon est mesurée par une réaction colorimétrique à 535 nm en présence d'une solution de batophénanthroline et d'acide thioglycolique à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide thioglycolique réduit le fer Fe^{3+} en Fe^{2+} . Les ions Fe^{2+} forment ensuite un complexe coloré avec la batophénanthroline sulfonée [215]. Toutes les mesures sont réalisées en triple et les valeurs exprimées en μ g de fer / g de tissu frais.

3. RT-PCR quantitative en temps réel

a. Extraction des ARN totaux des tissus

Les ARN totaux des tissus de souris (foie, rate et duodénum principalement) sont extraits à l'aide du kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen). Les tissus congelés sont transportés dans l'azote puis un petit morceau est broyé dans 1 mL de Qiazol (Qiagen). Le broyat est ensuite vortexé puis transféré dans un tube 1,5 mL. 200 microlitres de chloroforme sont

ensuite ajoutés pour séparer la phase aqueuse. Après centrifugation 10 minutes à 4°C et à 24000g, la phase aqueuse contenant les ARNs est prélevée et déposée sur les colonnes du kit. Après élimination des acides nucléiques doubles brins et purification, les ARNs totaux sont élués dans un volume de 50µL d'eau RNase free.

b. Vérification de la qualité des ARNs

La qualité des ARNs est contrôlée sur puce Agilent à l'aide d'un Bioanalyser 2100 et du kit Agilent RNA 6000 Nano kit. Les ARNs ayant un RIN (RNA Integrity Number) proche de 9 sont utilisés pour la suite des manipulations, les autres sont ré-extraits.

c. Dosage des ARNs totaux

La quantité d'ARNs est estimée parallèlement à la vérification de leur qualité, par mesure de l'absorbance à 260 nm (A_{260nm}) à l'aide d'un spectrophotomètre. Le rapport d'absorbance A_{260nm}/A_{280nm} permet d'évaluer la contamination par des protéines alors que le rapport A_{260}/A_{230} révèle une contamination éventuelle par des solvants. Seuls sont utilisés les ARNs ayant une concentration supérieure à 500ng/µL et des rapports proches de 2. Les ARNs sont ensuite dosés à l'aide du kit Quant-iT RNA assay kit sur un fluoromètre Qubit (Invitrogen). Ce kit utilise un intercalant spécifique des ARNs simples brins et la fluorescence est mesurée à 630/680nm grâce à un fluorimètre Qubit (Invitrogen). Les ARNs sont ramenés à une concentration de 500 ng/µL en fonction de l'estimation de la concentration à 260 nm puis dilués au 1/20^{ème}. 1µL de ces ARNs est alors déposé dans 199µL de « working solution » contenant une solution tampon et le réactif dilué au 1/200^{ème}. La concentration de l'échantillon est mesurée de la façon suivante :

$[ng/\mu L] = (\text{résultat Qubit en } ng/\mu L) \times 20 \text{ (facteur dilution ARN)} \times 200 \text{ (dilution réactif)} / 1000.$

Dans notre cas, la concentration en ARNs totaux exprimées en ng/µL est égale à la valeur donné par le fluorimètre (en ng/µL) multipliée par 4.

d. Synthèse du brin d'ADN complémentaire

La synthèse des brins d'ADNc est réalisée à partir de 3µg d'ARN totaux grâce à la transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (M-MLV RT, Proméga). Le mélange de 3µg d'ARN et de 6 µL d'oligo-dT (100µM) dans un volume de 17,75 µL est incubé 5 minutes à 70°C puis placé immédiatement dans la glace pendant 1 minute. La transcription inverse est alors effectuée à 42°C pendant 60 minutes dans un milieu réactionnel contenant 50 mM Tris-HCl pH8,3 (25°C), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM de chaque dNTP et 200 U d'enzyme M-MLV dans un volume de 25 µL. Une incubation finale de 15 minutes à 70°C est nécessaire pour inactiver l'enzyme. L'ADNc ainsi obtenu est alors dilué au 1/8^{ème} avant d'être utilisé dans les expériences de PCR quantitatives.

e. PCR quantitative

Principe

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

- Phase de plateau (ou de saturation): certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

Principe mathématique de la PCR

On considère que le nombre de molécule d'ADN au cycle n (X_n) est égal au nombre de molécule au départ (X_0) multiplié par $(1 + \text{efficacité})^n$ soit $X_n = X_0 \times (1+E)^n$. Si l'efficacité de la PCR est de 100%, la quantité d'ADN doit doubler à chaque cycle c'est-à-dire $X_n = X_0 \times 2^n$. On effectue ensuite pour chaque échantillon une correction de l'expression du gène cible à partir du gène de référence. La normalisation de l'expression du gène cible par rapport au gène de référence est donc égale à $2^{-(C_{\text{pcible}} - C_{\text{p}}) / \text{hprt}}$ ou $2^{-\Delta C_p}$. Enfin, le rapport d'expression entre deux échantillons lorsque l'efficacité est de 100% correspond à $2^{-\Delta \Delta C_p}$ où $\Delta \Delta C_p$ est l'écart de cycle entre les deux échantillons après normalisation par *hprt*.

Calcul de l'efficacité

Lorsque l'on souhaite détecter de faibles différences d'expression, il est donc important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des ADNc pré-amplifiés avec chaque couple d'amorces utilisé (spécifiques du gène d'intérêt). Une courbe étalon est réalisée pour chaque gène à partir de standards qui sont des séries de dilutions au $\frac{1}{2}$ des ADNc pré-amplifiés jusqu'au $\frac{1}{64}$ ^{ème} de façon à ce que la quantité d'ADNc de départ dans nos échantillons soit comprise entre ces standards. Par exemple, une série de dilution au $\frac{1}{2}$ doit, en théorie, donner des courbes d'amplification décalées d'un cycle de PCR à chaque fois. Si tel est le cas, la réaction a alors une efficacité égale à 2 (100%). En pratique, le programme de la machine de PCR en temps réel calcule l'efficacité E de la réaction. Les C_p sont placés sur un graphe en échelle logarithmique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne la pente (le coefficient directeur). Une efficacité de 100% correspond à une pente égale à -3,32 c'est-à-dire que la pente = $-(1/\log(1+E))$. La pente est toujours inférieure à -3,32 sinon l'efficacité serait supérieure à 100%.

La courbe de fusion

La spécificité de chaque amplification est contrôlée par une courbe de fusion à la fin de chaque PCR : l'ADN double brin est dénaturé très lentement jusqu'à ce que sa température de fusion caractéristique soit atteinte. Le SybrGreen est alors libéré dans le milieu réactionnel, ce qui se caractérise par une brusque chute de fluorescence sur le

moniteur. La dérivée première de la fluorescence permet d'obtenir un pic unique, garant de la spécificité d'amplification et de l'absence de contamination.

Approche expérimentale

Les PCR quantitatives sont réalisées grâce à un appareil Lightcycler480 (Roche Diagnostics) de PCR en temps réel. Toutes les amorces utilisées sont choisies à l'aide du logiciel Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Les PCR sont effectuées dans un volume total de 10 μ L en utilisant 2 μ L d'ADNc dilué au 1/8^{ème}, 400 nM de chaque amorce ainsi que 5 μ L d'un tampon de réaction 2X LightCycler480 SYBR Green I Master contenant la Taq ADN polymérase Faststart, un mélange de dNTP, du SYBR Green I et du MgCl₂. La réaction de PCR débute par une étape de dénaturation 5 minutes à 95°C appelé étape de pré-incubation. Vient ensuite l'étape d'amplification qui sera répétée 40 fois et qui se compose d'une dénaturation 15 secondes à 95°C, d'une hybridation 10 secondes à 60°C et enfin d'une élongation 15 secondes à 72°C. L'acquisition de la fluorescence a lieu à la fin de chaque cycle, c'est-à-dire après chaque étape d'élongation. La réaction se termine par une courbe de fusion : 10 secondes à 95°C, 20 secondes à 70°C puis une acquisition de fluorescence continue jusqu'à la température de 97°C.

Le gène de référence est un gène dont l'expression ne varie pas entre les deux conditions pour lesquelles nous mesurons la variation d'expression du gène cible. Ceci permet d'éliminer certaines fluctuations comme par exemple des variations au niveau de la synthèse d'ADNc. Nous utilisons couramment comme gènes de référence les gènes *hprt* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase) ou *Gusb* (glucuronidase β). L'expression de ces gènes est connue pour être constante, notamment dans le foie et la rate.

Analyses statistiques

Toutes les expériences de PCR ont été réalisées 2 fois. Les rapports d'expression relatifs (et erreurs standards) sont calculés à partir du logiciel REST (Relative Expression Software Tools, <http://rest.gene-quantification.info>) [216]. Le modèle mathématique est basé sur l'efficacité de la PCR en temps réel et sur la déviation moyenne de Cp d'un gène cible entre les groupes d'échantillons et les contrôles, normalisée par la déviation moyenne du gène de référence *Hprt* [217].

4. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique qui permet la localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'épitopes de protéines au moyen d'anticorps. Les organes sont fixés en paraformaldehyde 4% puis inclus dans la paraffine. Les blocs sont découpés à l'aide d'un microtome en sections de 4 μ m qui sont déposées sur des lames de verre. Dans un premier temps, les lames sont chauffées 15 minutes à 60°C puis plongées dans des bains de xylène et d'alcool et rincées sous l'eau courante pour enlever la paraffine. Avant la détection par anticorps, les épitopes d'intérêt doivent être régénérés par deux incubations de 11 minutes au micro-onde à puissance maximum dans un bain de citrate à pH6. Les coupes sont ensuite laissées à refroidir dans le bain environ 45 minutes puis rincées abondamment à l'eau. Les prélèvements sont alors cerclés au dakopen (Milian) afin de délimiter la zone sur laquelle va être déposée la solution d'anticorps.

Après incubation avec l'anticorps primaire, les lames sont ensuite rincées 3 fois pendant 5 minutes dans une solution de PBS et incubées avec l'anticorps secondaire. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée, déshydratées dans des bains d'alcool et de xylène puis montées avec une lamelle pour l'observation au microscope.

a. BMP6

La régénération des épitopes des protéines est réalisée en incubant les coupes de tissus avec de la trypsine (1mg/mL) pendant 8 minutes à 37°C. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par incubation des échantillons avec une solution de blocage des peroxydases (Dako REAL Peroxidase Blocking Solution), un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, de l'azide de sodium NaN₃ à 15mmol/L et un détergent. Les sites potentiels non spécifiques pouvant être reconnus par les anticorps sont saturés par traitement des coupes 30 minutes avec du sérum de cheval (Vector Laboratories) puis les coupes de tissus sont mises à incuber 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine BMP6 (N19, Santa Cruz biotechnologies) dilué au 1/100^{ème} dans une solution de PBS contenant 1% de BSA (Serum Albumine Bovine) et 1% de sérum de veau fœtal (SVF). Une coloration brune est obtenue à l'aide d'un anticorps secondaire anti-IgG de chèvre conjugué à la peroxydase du raifort (HRP, kit ImmPRESS) après ajout de Diaminobenzidine (DAB). Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline (coloration des tissus) et à l'eau ammoniacquée (confère aux noyaux une couleur bleue) afin de rendre possible la localisation du marquage. Il est important de noter que des coupes de tissu de souris Bmp6^{-/-} sont utilisées pour tester la spécificité de l'anticorps.

b. DMT1-Ferroportine

Pour ces 2 immunodétections, les coupes de tissus sont déparaffinées comme précédemment et les épitopes des protéines sont régénérés par deux incubations successives de 11 minutes dans du tampon citrate pH6 au micro-onde à puissance maximale.

Les peroxydases endogènes ont été bloquées avec une solution de blocage Peroxidase Block (DakoCytomation EnVision+ System-HRP, Dako). Les coupes sont saturées avec une solution de PBS contenant 1% de BSA et 10% de SVF et incubées 1h à température ambiante avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine DMT1 ou 1h30 à 37°C avec un anticorps primaire dirigé contre la ferroportine (fournis par François Canonne-Hergaux) dilués dans une solution de PBS contenant 1% de BSA. La coloration est basée sur le même principe HRP-DAB que décrit précédemment à l'aide du kit DakoCytomation En Vision+ System-HRP. Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline et à l'eau ammoniacquée.

c. Coloration de Perls

Cette technique est utilisée pour mettre en évidence le fer non-hémique présent dans les tissus. En milieu acide, les ions ferriques (Fe^{3+}) réagissent avec le ferrocyanure de potassium en formant un précipité bleu.

Les échantillons de tissu sont fixés dans une solution de formaldéhyde (4%) et inclus en paraffine. Une fois déparaffinées et réhydratées, les lames sont mises en contact avec un mélange de ferrocyanure de potassium et d'acide chlorhydrique concentré (bleu de Prusse) durant 20 minutes. Le fer non-hémique est ainsi coloré en bleu. Une coloration des noyaux est ensuite réalisée grâce à une incubation de 5 minutes avec une solution de rouge nucléaire. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée, déshydratées dans des bains d'alcool et de xylène puis montées avec une lamelle pour l'observation au microscope.

5. Immunofluorescence

Cette technique permet de mettre en évidence la présence et la localisation d'une ou plusieurs protéines par l'utilisation de fluorochromes liés directement aux anticorps. Une fois les coupes de tissu déparaffinées comme décrit ci-dessus, les épitopes sont régénérés, les lames rincées et les prélèvements cerclés au dakopen. La fluorescence non spécifique due à

des avidines ou biotines endogènes est bloquée par incubation 15 minutes avec une solution « Avidin Biotin Blocking solution » (LabVision). Après perméabilisation des cellules et des noyaux, et saturation des sites non spécifiques de fixation de l'anticorps dans une solution de PBS (0,5% BSA, 0,3% triton X-100) pendant 1 heure, les coupes de foie sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-phosphoSmad1/5/8 (Cell Signalling) dilué au 1/100 dans un tampon de dilution contenant du PBS et du triton X-100. Les lames sont ensuite rincées 3 fois pendant 5 minutes dans une solution de PBS puis incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome alexa 488 dilué au 1/200^{ème} dans une solution de PBS-Triton 0,3% à l'abri de la lumière. Après plusieurs lavages (2 fois 5 minutes en PBS, 1 fois 5 minutes en PBS-NaCl 0,4M et enfin 1 fois 5 minutes en PBS), les lames sont montées à l'aide de Vectashield Mounting medium (Clinisciences) contenant de l'iodure de propidium pour contre-colorer l'ADN. Les cellules sont visualisées en fluorescence sur un microscope confocal LSM 510.

6. Western Blot

Les échantillons de foie sont broyés dans des tubes à bille de céramique à l'aide d'un appareil Fastprep-24 (MP Biomedicals) à une vitesse de 4 m/s pendant 10 secondes dans 1 mL de tampon PEB (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH8, 1% NP-40) incluant des inhibiteurs de protéases (1mM PMSF, leupeptine 10 µg/mL, pepstatine A 10 mg/mL et 1 antipain 1 mg/mL) et de phosphatases (10 µL/mL d'un cocktail d'inhibiteur de phosphatases, Sigma-Aldrich). Après incubation 1 nuit à 4°C sous agitation, les protéines sont quantifiées à l'aide d'un kit basé sur la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay kit). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance, c'est à dire le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines.

Brièvement, on mélange 1µL d'extrait protéique avec 200 µL de réactif de Bradford dilué au 1/5^{ème} dans de l'eau. Les échantillons sont ensuite vortexés et incubés 5 minutes à température ambiante à l'obscurité. La lecture se fait à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la quantité de protéines est estimée grâce à une gamme de BSA.

Les extraits protéiques (30 µg pour Smad1/5/8 et Smad1, 60 µg pour Smad5, 40 µg pour Id1 et 20 µg pour Smad7) sont dilués dans un tampon Laemmli (Sigma-Aldrich) puis dénaturés 5 minutes à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées à 150 V par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantse (SDS-PAGE) dans du

tampon de migration TGS (Tris 25 mM, glycine 192 mM pH 8,3 et SDS 0,1%). La suite du protocole diffère selon que l'on utilise une détection par chimioluminescence ou par fluorescence.

a. Détection par chimioluminescence

Après fractionnement électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidene (PVDF, Schleicher et Schuell), préalablement plongée 5 secondes dans du méthanol, et maintenue en place à l'aide de deux plaques de plexiglass ajourées, de deux éponges et de papier Whatmann 3MM. Le transfert des protéines est effectué à 80V pendant deux heures à 4°C dans un tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 200 mM, méthanol 2,5%). Une coloration au rouge ponceau est réalisée une fois le transfert terminé afin de vérifier si la migration et le transfert ont bien fonctionné.

Les sites potentiels de fixation non spécifique pour les anticorps présents sur la membrane et les protéines sont saturées avec une solution de lait-TBS-Tween (10 mM tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 0,15% Tween 20 et 5% de lait en poudre) pour les Smad1/5/8 et Id1 ou une solution plus stringente (10% lait en poudre, 1% BSA, 1% NP40, 0,5% Tween 20 dans du PBS) pour Smad1 et Smad7 pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation, un anticorps polyclonal de lapin pour les formes phosphorylées des Smad1/5/8 (1/1000, Cell Signalling), Id1 (1/200, Santa Cruz), Smad7 (1/500, Santa cruz) et un anticorps polyclonal de souris pour Smad1 (1/250, Santa Cruz) sous agitation à 4°C pendant une nuit. L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages de 5 minutes dans un tampon TBS-Tween puis la membrane est incubée pendant encore 1 heure à température ambiante et sous agitation dans le tampon de saturation additionné de l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin ou de souris (1/5000, Cell Signalling) conjugué à la peroxydase de raifort HRP pour HorseRadish Peroxydase. L'activité de l'enzyme est visualisée par un système de détection basé sur la chimioluminescence amplifiée (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Cette incubation est ensuite suivie de 3 lavages de 15 minutes à température ambiante dans le tampon TBS Tween. La membrane est placée en contact du réactif ECL pendant 5 minutes à l'obscurité. L'enzyme sera alors activée et va permettre la détection des complexes immuns antigènes-anticorps qui seront révélés sur un film photographique. La quantité de protéines est obtenue grâce au logiciel Quantity One après normalisation sur la β -actine.

b. Détection par fluorescence

Les protéines sont transférées après migration sur des membranes de nitrocellulose Hybond C Extra (Amersham Biosciences), préalablement équilibrée 10 minutes dans le tampon de transfert, dans les mêmes conditions que précédemment. Les sites potentiels de fixation non spécifique pour les anticorps présents sur la membrane et les protéines sont saturés par une incubation de la membrane dans un tampon de blocage Odyssey (LI-COR Biosciences), pendant une heure à température ambiante puis incubées une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin anti-phosphoSmad1/5/8 de lapin (1/500, Cell signalling) ou un anticorps de chèvre anti-Smad5 (1/200, Santa Cruz), et un anticorps monoclonal de souris anti- β -actine. Après 3 lavages de 10 minutes dans un tampon PBS-Tween20 (0,1%), les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante et sous agitation avec les anticorps secondaires liés à un fluorochrome infrarouges IRDye 800 anti-IgG de lapin ou de chèvre et IRDye 680 anti-IgG de souris (1/15000, LI-COR Biosciences). Cette incubation est ensuite suivie de 3 lavages de 10 minutes à température ambiante dans le tampon PBS-Tween20 (0,1%). Pour cette technique, les membranes sont alors directement scannées grâce à un lecteur Odyssey Infrared Imaging System. Ce lecteur est composé de deux lasers qui permettent une détection sur deux longueurs d'ondes (700 et 800nm). Ainsi, le fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire va être excité et émettre un signal détectable par un photosenseur. La taille des bandes est estimée à l'aide du logiciel Odyssey 3.0 (LI-COR Biosciences) et la quantification des formes phosphorylées des Smad1/5/8 ou de Smad5 est évaluée par normalisation de la bande spécifique sur la β -actine.

RESULTATS

Article 1

Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver

Léon Kautz, Delphine Meynard, Annabelle Monnier, Valérie Darnaud, Régis Bouvet, Rui-Hong Wang, Chiuxia Deng, Sophie Vaultont, Jean Mosser, Hélène Coppin and Marie-Paule Roth. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1503-9.

I. Introduction

Lorsque j'ai débuté ma thèse, notre équipe étudiait la régulation de l'expression de l'hepcidine en fonction du statut martial *in vivo*. Les différentes étapes impliquées dans cette régulation étaient encore imprécises. En 2006, Babitt *et al.* avaient démontré que l'expression de l'hepcidine était induite par la voie de signalisation des « Bone Morphogenetic Proteins » [66]. Le rôle de l'hémojuvéline (HJV), un corécepteur des BMPs, dans l'activation de cette voie était également mis en évidence. Des données indépendantes publiées précédemment confirmaient ces résultats. En effet, des souris invalidées pour le gène *Smad4* spécifiquement dans le foie présentaient une forte diminution des transcrits de l'hepcidine ainsi qu'une très forte surcharge en fer systémique [115]. Néanmoins, plusieurs questions demeuraient sans réponse. En effet, même s'il avait été montré que l'hémojuvéline pouvait interagir avec plusieurs molécules de la famille des BMPs (en particulier BMP2, 4, 7 et 9) [71, 114] et réguler l'expression de l'hepcidine *in vitro*, l'expression de ces molécules n'était pas modifiée lorsque le statut martial des souris variait *in vivo* (résultats personnels). Les mécanismes physiologiques qui permettaient une augmentation concomitante du fer et de l'hepcidine n'étaient pas connus. On ignorait en particulier si le fer pouvait directement réguler la voie des BMPs et à quel niveau.

II. Résultats

Afin de répondre à ces questions, nous avons sélectionné des souris issues de deux fonds génétiques différents : C57BL/6 (B6) et DBA/2 (D2). Ces souris ont été nourries pendant 3 semaines avec différentes alimentations : carencées en fer (3 mg/kg), équilibrées en fer (200 mg/kg) ou surchargées en fer (8.3 g/kg), puis sacrifiées à l'âge de 7 semaines. Cinq souris par souche et par régime alimentaire ont été étudiées. Les conséquences physiologiques de ces alimentations ont été évaluées tout d'abord en mesurant différents

paramètres biologiques : fer sérique, capacité totale de liaison de fer par la transferrine (TIBC), saturation de la transferrine et fer intra-hépatique. Les paramètres sériques obtenus étaient ceux escomptés. Ils augmentaient avec l'alimentation surchargée en fer et diminuaient avec l'alimentation carencée. Le fer intra-hépatique augmentait ou diminuait également en fonction des différentes alimentations (table 1).

Si les résultats étaient globalement comparables dans les deux souches, on observait toutefois une différence notable de ces paramètres biologiques en fonction du fond génétique C57BL/6 (B6) ou DBA/2 (D2) des souris. Physiologiquement, les souris D2 ont des paramètres sériques légèrement supérieurs aux souris B6 [162]. Toutefois et de façon reproductible, les souris B6 soumises à un régime surchargé en fer accumulent significativement plus de fer dans le foie que les souris D2.

Nous avons vérifié que ces paramètres étaient corrélés à des variations de l'expression de l'hepcidine en mesurant par PCR quantitative (RT-PCRq) l'expression des gènes *Hamp* et *Hamp2* (figure 1). Nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression des transcrits codant l'hepcidine en situation de surcharge ainsi qu'une diminution notable de ces mêmes transcrits en situation de carence, ce qui était conforme aux données de la littérature [218]. Ces résultats nous ont permis de valider notre modèle.

1. Comparaison des transcriptomes hépatiques

Afin d'élucider les mécanismes de régulation mis en jeu *in vivo* en cas de surcharge ou de carence martiale, nous avons étudié le transcriptome dans le foie des différents groupes de souris à l'aide de puces Agilent 4x44k. Après analyse des résultats, nous avons constaté que 1419 transcrits étaient régulés en fonction de l'alimentation. L'interprétation des données était difficile car aucune voie métabolique de régulation n'était mise en évidence. Afin de simplifier les choses nous avons donc décidé d'identifier les transcrits qui variaient de façon analogue à l'hepcidine, augmentant lors de la surcharge intrahépatique et diminuant lors de la carence. De façon tout à fait surprenante, seuls 4 transcrits correspondaient à ces critères : *Bmp6*, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8*. Or, trois de ces gènes (*Bmp6*, *Smad7* et *Id1*) sont impliqués dans la voie de signalisation des BMPs, le système d'activation de l'expression de l'hepcidine.

Ces résultats ont été confirmés par RT-PCRq. En effet, nous avons constaté que les niveaux d'expression de ces gènes sont corrélés avec le contenu en fer dans le foie

(figure2). L'expression des gènes *Bmp6*, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* est augmentée chez les souris nourries avec un régime enrichi en fer. Cette augmentation est significativement supérieure chez les souris B6 qui accumulent plus de fer dans le foie que les souris D2. A l'inverse, l'expression de ces gènes est diminuée chez les souris carencées en fer.

Le résultat intéressant de cette étude est bien sûr l'augmentation très nette des transcrits de *Bmp6* chez les souris B6 et D2 avec une surcharge en fer intra-hépatique ainsi que l'absence de variation significative des transcrits *Bmp4* et une légère augmentation des transcrits *Bmp2* dans le foie des souris B6 surchargées (figure supplémentaire1). Ces derniers résultats étaient inattendus par rapport aux études *in vitro* publiées précédemment qui désignaient BMP2 et BMP4 comme les facteurs clé de la régulation de l'hepcidine [116].

Une partie de ces résultats ont été confirmés au niveau protéique par western blot avec un anticorps dirigé contre ID1. Malheureusement, il n'existait aucun anticorps dirigé contre BMP6 ou ATOH8 utilisable en western. La quantité de protéine ID1 est augmentée ou diminuée parallèlement aux variations du fer intrahépatique (figure supplémentaire 2). Le fer module donc à la fois l'expression génique et protéique d'Id1 et de Smad7.

Cette approche nous a donc permis d'identifier trois gènes (*Bmp6*, *Smad7* et *Id1*) reliés à la voie des BMP et dont l'expression est modulée par le fer.

2. La voie Smad 1/5/8

Le signal d'activation de la voie des BMPs est transmis à travers la phosphorylation des molécules Smads [219]. Pour confirmer nos résultats, nous avons donc évalué par western blot le niveau de phosphorylation du complexe Smad1/5/8 dans le foie de ces souris à l'aide d'un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées des Smad1/5/8. On observe respectivement une augmentation ou une diminution de la phosphorylation des Smad1/5/8 chez les souris nourries avec une alimentation surchargée ou carencée en fer (figure 4). Notons tout de même que la différence de phosphorylation entre les alimentations carencées et équilibrées est moins évidente que lorsque l'on compare les alimentations équilibrées et surchargées. Pourtant, l'expression des transcrits de l'hepcidine est effondrée chez les souris carencées en fer. Pour expliquer ces résultats on peut émettre l'hypothèse qu'une légère diminution de la phosphorylation des Smad1/5/8 est suffisante pour réprimer efficacement la transcription du gène *Hamp*. Il est toutefois aussi possible que la technique de western blot ne soit pas assez sensible pour détecter des variations lorsque les quantités de protéines phosphorylées sont faibles.

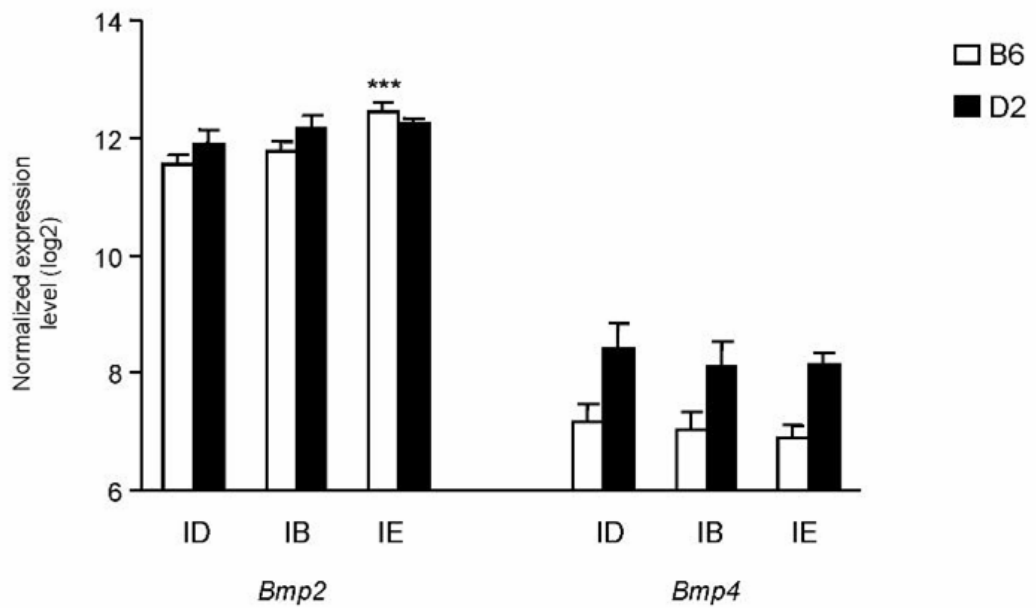


Figure supplémentaire 1 : l'expression des transcrits Bmp2 et Bmp4 a été mesurée pour les souris des 2 souches (B6 et D2), nourries avec une alimentation carencée (ID), équilibrée (IB) ou surchargée (IE) en fer. Les niveaux d'expression ont été normalisés par HPRT, transformés en logarithme de base 2 (log2) et exprimés comme la moyenne des 5 échantillons \pm l'écart type.

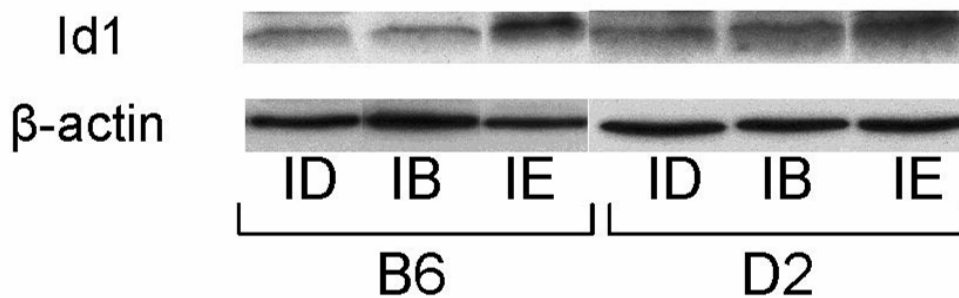


Figure supplémentaire 2 : Western Blot ID1 :

Les lysats de foie de souris sauvages nourries avec une alimentation carencée en fer (ID), équilibrée en fer (IB) et enrichie en fer (IE) ont été analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine ID1 et contre l'actine β pour la normalisation.

Différents contrôles ont été utilisés pour vérifier ces résultats. Nous avons normalisé la quantité des Smad1/5/8 phosphorylés par rapport à la β -actine et par rapport à un anticorps anti-Smad1 non phosphorylé. Ces différents contrôles ont permis de confirmer les variations observées (figure supplémentaire 3).

L'induction de la phosphorylation est supérieure chez la souris B6 par rapport à la souris D2, ce qui coïncide avec le contenu en fer et l'expression de *Bmp6* dans le foie de ces souris. *Bmp6* pourrait donc jouer un rôle majeur dans l'activation de la voie des BMP.

3. Les souris invalidées pour les gènes *Smad4* et *Hamp*

Une fois phosphorylé, le complexe Smad1/5/8 interagit avec Smad4. Cette interaction permet alors la translocation du complexe dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles. Il était donc intéressant d'étudier l'expression de nos 4 gènes dans le foie de souris invalidées pour le gène *Smad4* [115]. Nous avons donc mesuré l'expression des gènes *Bmp6*, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* dans le foie de six souris *Smad4*^{-/-} et de souris contrôles de quatre mois de même fond génétique. Nous avons observé une augmentation des transcrits *Bmp6*, une diminution des transcrits *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* et nous avons vérifié que les transcrits de *Hamp* chutaient de façon drastique. Comme attendu, *Bmp6* agit donc en amont de Smad4. En revanche Smad4 apparaît indispensable à l'activation de la transcription de *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* lors de surcharge en fer intra hépatique. Ces résultats confirmaient que *Bmp6* pouvait jouer un rôle non négligeable *in vivo* dans la cascade de signalisation des BMPs.

Une dernière série d'expériences a été réalisée sur des ARNs de foie de souris invalidées pour le gène *Hamp*. Ces souris présentent une surcharge en fer massive non seulement dans le foie mais aussi le pancréas, le cœur et le rein [17]. L'expression de *Bmp6*, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* a été mesurée dans le foie de cinq souris *Hamp*^{-/-} et de souris contrôles de dix semaines de même fond génétique et on observe une augmentation de ces transcrits comparable à celle observée chez les souris nourries avec une alimentation enrichie en fer. L'ensemble de ces 4 gènes se place donc en amont de l'hepcidine dans la voie de signalisation des BMPs.

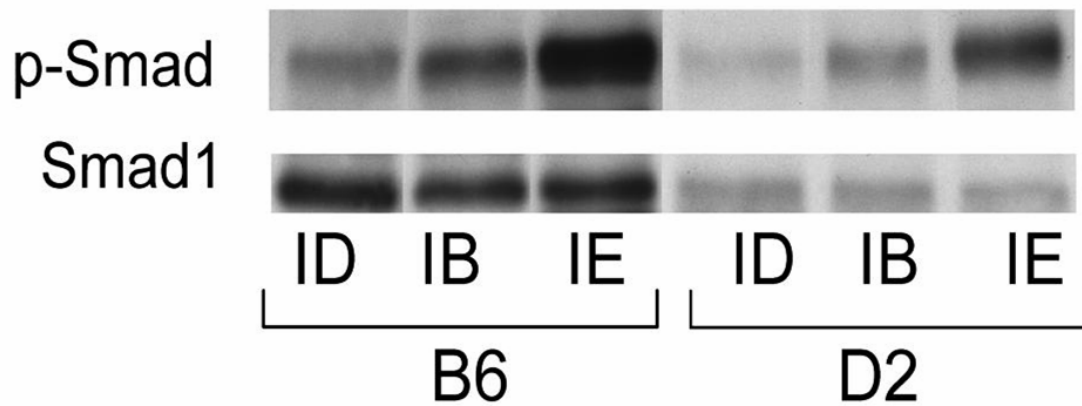


Figure supplémentaire 3 : Western blot des formes phosphorylées des Smad1/5/8

Les lysats de foie de souris sauvages nourries avec une alimentation carencée en fer (ID), équilibrée en fer (IB) et enrichie en fer (IE) ont été analysés par western blot avec un anticorps dirigé les formes phosphorylées des Smad1/5/8 et contre Smad1 non phosphorylé pour la normalisation.

III. Discussion

L'analyse du transcriptome de foie de souris nourries avec des alimentations surchargées et carencées en fer nous a permis d'identifier quatre gènes régulés par le fer comme l'hepcidine c'est-à-dire dont l'expression augmente en situation de surcharge et diminue en situation de carence. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR quantitative et mettent en évidence des molécules participant à la voie de signalisation des BMPs pour réguler l'expression de l'hepcidine *in vivo*. Il s'agit de la première démonstration que le fer contenu dans l'alimentation régule la synthèse de l'hepcidine *in vivo* via la phosphorylation des Smad1/5/8. Néanmoins, plusieurs questions restent posées.

Quels ligands BMP activent la voie en réponse au fer *in vivo* ?

Nos données suggèrent que BMP6 a un rôle prépondérant dans cette activation. En effet, nous montrons ici que l'expression hépatique de *Bmp6* est régulée transcriptionnellement par le fer et que cette induction est proportionnelle au contenu en fer dans le foie de la souris. L'expression de *Bmp2* est légèrement augmentée chez les souris B6 qui ont une surcharge ferrique intra-hépatique notable. On peut supposer qu'en plus de BMP6, BMP2 pourrait également participer à l'activation de la voie Bmp/Smad. Nous n'avons pas observé d'autre ligand de la famille des BMPs dont l'expression est modulée par le fer *in vivo*. De plus, dans les cellules Hep3B l'hémojuvéline soluble interagit de façon optimale avec BMP6 car elle bloque l'activation du promoteur hepcidine par BMP6 de manière plus efficace qu'avec les autres ligands BMPs [71]. Cette observation conforte notre hypothèse que BMP6 est le ligand de la superfamille du TGF- β /BMP qui joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du fer systémique. BMP2 pourrait également fonctionner comme un régulateur endogène de l'expression de l'hepcidine *in vivo* lorsque les stocks en fer dans l'organisme sont abondants et requièrent une activation forte de la voie de signalisation des BMP/Smad.

Quels sont les mécanismes qui permettent l'augmentation de la transcription de *Bmp6* et *Bmp2* par le fer contenu dans l'alimentation ?

Certaines études suggèrent que la saturation de la transferrine pourrait être le signal activateur [210]. Cependant, nous avons observé que l'augmentation de l'expression de *Bmp6* n'apparaît que lorsque la surcharge intra hépatique atteint un certain seuil et non dès que la saturation de la transferrine est élevée. Le taux de fer intra hépatique pourrait donc être le signal provoquant l'augmentation de *Bmp6* dans le foie. Cette hypothèse est

cohérente avec l'observation que l'expression du gène *Atoh8* dans le foie varie en même temps et dans le même sens que *Bmp6* et la phosphorylation des Smad1/5/8, ce qui suggère un signal commun pour ces différents gènes.

Où se situent Smad7, Id1 et Atoh8 dans la cascade de signalisation ?

La voie des BMP est rompue chez les souris *Smad4*^{-/-}. En conséquence, ces souris développent une surcharge en fer sévère. Or, de façon tout à fait intéressante, l'expression de *Bmp6* est augmentée dans le foie de ces souris alors que l'expression des gènes *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* est réduite ce qui suggère que ces derniers gènes seraient des cibles directes de la voie des BMPs qui seraient régulés en aval de *Smad4*.

Enfin la voie des BMP/Smad reste fonctionnelle en l'absence de *Hamp*. En effet, l'expression de nos quatre gènes est augmentée de façon significative chez les souris *Hamp*^{-/-}. BMP6 agit donc en amont de Smad4 alors que Smad7, Id1 et Atoh8 sont impliqués dans la voie entre Smad4 et l'hepcidine. Il est donc important de comprendre exactement comment ces molécules sont impliquées dans le processus de régulation de la synthèse d'hepcidine par le fer.

Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* in the mouse liver

*Léon Kautz,^{1,2} *Delphine Meynard,^{1,2} Annabelle Monnier,^{3,4} Valérie Darnaud,^{1,2} Régis Bouvet,⁵ Rui-Hong Wang,⁶ Chixia Deng,⁶ Sophie Vaultont,^{7,8} Jean Mosser,^{3,5,9} †Hélène Coppin,^{1,2} and †Marie-Paule Roth^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Institut Fédératif de Recherche 30 (IFR 30), Toulouse, France; ³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche 6061 (UMR6061), Institut de Génétique et Développement, and ⁴CNRS (UMR6553), Ecobio, Université de Rennes 1, Rennes, France; ⁵Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rennes, Rennes, France; ⁶Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD; ⁷Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France; ⁸Inserm, U567, Paris, France; and ⁹Plate-forme transcriptome OUEST-genopole, Rennes, France

Although hepcidin expression was shown to be induced by the BMP/Smad signaling pathway, it is not yet known how iron regulates this pathway and what its exact molecular targets are. We therefore assessed genome-wide liver transcription profiles of mice of 2 genetic backgrounds fed iron-deficient, -balanced, or -enriched diets. Among 1419 transcripts significantly modulated by the dietary iron content, 4 were regulated similarly to the hepcidin genes *Hamp1* and *Hamp2*. They

are coding for *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* all related to the Bmp/Smad pathway. As shown by Western blot analysis, variations in *Bmp6* expression induced by the diet iron content have for functional consequence similar changes in Smad1/5/8 phosphorylation that leads to formation of heteromeric complexes with Smad4 and their translocation to the nucleus. Gene expression variations induced by secondary iron deficiency or iron overload were compared with those

consecutive to *Smad4* and *Hamp1* deficiency. Iron overload developed by *Smad4*- and *Hamp1*-deficient mice also increased *Bmp6* transcription. However, as shown by analysis of mice with liver-specific disruption of *Smad4*, activation of *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* transcription by iron requires Smad4. This study points out molecules that appear to play a critical role in the control of systemic iron balance. (Blood. 2008;112:1503-1509)

Introduction

Iron, by virtue of its ability to accept or donate electrons, is essential for many of the biologic reactions carried out by living systems. This same characteristic, however, allows free iron in solution to form highly reactive oxygen species that can oxidize lipids, DNA, and proteins, and lead to cell damage. As there is no physiological means for excreting iron in mammals, systemic iron homeostasis must be maintained by tight regulation of intestinal iron absorption, as well as macrophage and hepatocyte iron release.

Hepcidin has a key role in coordinating the use and storage of iron with iron acquisition.¹ It acts by binding to ferroportin, an iron exporter present on the surface of enterocytes, macrophages, and hepatocytes, and induces its internalization and lysosomal degradation.² The loss of ferroportin from the cell surface prevents iron efflux from intestinal enterocytes, recycling of iron from senescent erythrocytes by macrophages, and iron mobilization from hepatic stores. Hepcidin production is inhibited by iron deficiency anemia and tissue hypoxia,³ which increases iron availability for use in erythropoiesis. By contrast, hepcidin expression is enhanced by dietary or parenteral iron loading,⁴ thus providing a feedback mechanism to limit intestinal iron absorption. Individuals with mutations in any of the hepcidin (*HAMP*),⁵ hemojuvelin (*HJV*),⁶ transferrin receptor 2 (*TFR2*),⁷ or *HFE*⁸ genes have low hepcidin

levels despite excessive iron stores. As a consequence, they are unable to effectively repress iron absorption.

Recently, Babitt et al^{9,10} demonstrated that hepcidin expression was induced by the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway. This pathway involves members of the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily of ligands that act by binding 2 type I and 2 type II BMP receptors (BMPR-I and BMPR-II). This induces the phosphorylation of BMPR-I by BMPR-II and the activated complex, in turn, phosphorylates a subset of Smad proteins (Smad1, Smad5, and Smad8). The receptor-activated Smads then form heteromeric complexes with the common mediator Smad4, and these translocate to the nucleus where they regulate the transcription of specific targets.¹¹ Hemojuvelin (HJV) was shown to act as a BMP coreceptor in vitro and to facilitate the activation of the BMPR-I/II complex.⁹ Interestingly, stimulation of BMP signaling by HJV is paralleled by an increase in *HAMP* expression. Support of the involvement of the BMP signaling pathway in the regulation of hepcidin also comes from the observation that liver-specific disruption of the *Smad4* gene in mice leads to reduced hepcidin expression and systemic iron loading.¹² These mice are unable to synthesize hepcidin in response to inflammatory stimuli or to iron load. The BMP/Smad4 pathway therefore is critical to hepcidin expression.

Submitted March 6, 2008; accepted May 19, 2008. Prepublished online as Blood First Edition paper, June 6, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-03-143354.

*L.K. and D.M. contributed equally to this work

†H.C. and M.-P.R. contributed equally to this work

The online version of this article contains a data supplement.

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

There are, however, many open questions. First, there are several BMP molecules that can bind HJV in vitro and regulate hepcidin expression,^{10,13} but further work is needed to determine which of these BMP molecules is the endogenous regulator in vivo. Second, it is not yet known how iron regulates hepcidin. In particular, whether iron is sensed by molecules forming the hepcidin-regulating BMP/HJV/BMPR complex remains to be elucidated. Third, it is still not known whether hepcidin is a direct or indirect target for BMP and the activated Smad/Smad4 complex. To decipher these important issues, we assessed the liver transcription profiles of 2 strains of wild-type mice fed an iron-deficient or an iron-enriched diet and identified 4 genes that were regulated similarly to hepcidin in that context. Analysis of their expression in *Smad4*- or *Hamp1*-deficient mice showed that they were all participating in the Bmp/Smad signaling pathway.

Methods

Wild-type mice fed diets with different iron contents

Male mice of the C57BL/6 (B6) and DBA/2 (D2) backgrounds were purchased from the Center d'Élevage Robert Janvier (Le Genest St-Isle, France) and maintained at the IFR 30 animal facility. Dietary iron deficiency was induced by feeding 5 4-week-old-mice of each strain a diet with virtually no iron content (< 3 mg iron/kg; SAFE, Augy, France) and demineralized water for a period of 3 weeks. Five control animals of each strain received the iron-balanced diet of the same composition (200 mg iron/kg). Dietary iron loading was obtained by feeding five 4-week-old animals of each strain the iron-balanced diet supplemented with carbonyl iron (8.3 g/kg) for 3 weeks. All mice were analyzed at 7 weeks and fasted for 14 hours before they were killed. Experimental protocols were approved by the Midi-Pyrénées Animal Ethics Committee. A total of 30 livers were dissected for RNA isolation, rapidly frozen, stored in liquid nitrogen, and used for genome-wide expression profiling. Serum iron parameters and nonheme iron were quantified as previously described.¹⁴

Smad4- and *Hamp1*-deficient mice

Liver samples from six 4-month-old males with liver-specific disruption of *Smad4* and 5 10-week-old *Hamp1*-deficient males that were subjected to detailed analysis in previous publications^{12,15} were used here to compare gene expression variations consecutive to lack of functional *Smad4* or *Hamp1* with those induced by secondary iron deficiency or iron overload. Liver samples from males of the same genetic backgrounds and the same ages as *Smad4*- and *Hamp1*-deficient mice, respectively, were used as controls.

RNA isolation, preparation of labeled cRNA, microarray hybridization, and analysis of expression data

Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA quality was checked on RNA 6000 Nano chips using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). RNA samples used for chip experiments all had RNA integrity numbers (RINs)¹⁶ greater than 9. Agilent's Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS (One-color) was used to generate fluorescent cRNA. The amplified cyanine 3-labeled cRNA samples were then purified using Qiagen's RNeasy mini spin columns and hybridized to Agilent Whole Mouse Genome Microarrays, 4 × 44 K. Microarray slides were washed and scanned with an Agilent scanner, according to the standard protocol of the manufacturer. Information from probe features was extracted from microarray scan images using the Agilent Feature Extraction software v.9.5.1. Expression data were submitted to the National Center for Biotechnology Information's (NCBI's) Gene Expression Omnibus (GEO) repository and are available under the accession number (GenBank: GSE10421).¹⁷ All the analyses were

performed using Bioconductor, an open source software for the analysis of genomic data rooted in the statistical computing environment R (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA).¹⁸ Normalization between arrays was performed using the quantile method. Genes for which the background-corrected signal intensities were not greater than 2.6 standard deviations above the average background in at least 3 B6 and 3 D2 mice were assumed not to be expressed in the liver and were excluded from further analysis. The R/MAANOVA package implemented in Bioconductor¹⁹ was used to perform a 2-way analysis of variance in which the log₂-transformed expression level was considered to be a function of diet, strain, and the effects of the interaction between these 2 factors. F tests, based on the James-Stein shrinkage estimates of the error variance, were computed on a gene-by-gene basis and *P* values obtained by permutation analysis. The proportion of false positives among all the genes initially identified as being differentially expressed (FDR) was assessed using the procedure described by Storey et al.²⁰ When influence of diet on expression levels was significant, *t* tests were performed to investigate specific effects of iron deficiency and iron enrichment.

Real-time quantitative PCR

All primers (Table S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City). Real-time quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) reactions were prepared with Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) as previously described¹⁴ and run in duplicate on a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics). For each mouse and transcript, an expression measure was calculated as $2^{Ct_{ToI} - Ct_{HPRT}}$, where ToI is the transcript of interest; HPRT, a transcript with stable level between strains, diets, and genotypes, quantified to control for variation in cDNA amounts; and Ct, the cycle number where fluorescence reaches a given threshold. Expression values were log₂ transformed, and the contribution of diet (iron deficient, standard, or iron enriched) or genotype (wild type, knockout) in each strain was assessed by analysis of variance followed by Scheffe posthoc tests or by Student *t* tests, respectively, using SAS version 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC). The transcript fold changes following the different dietary conditions or *Smad4/Hamp1* disruption were calculated on values obtained by raising 2 to the power *n*, where *n* is the mean of the log₂-transformed expression measures within each group. Correlations between liver iron and expression values were assessed by nonparametric Spearman rank-order correlation tests.

Western blot analysis

Livers were homogenized in a FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France) for 40 seconds at 4 m/s. The lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8, 1% NP-40) included inhibitors of proteases (1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 10 mg/mL pepstatin A, and 1 mg/mL antipain) and of phosphatases (10 µL/mL phosphatase inhibitor cocktail 2; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Proteins were quantified using the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) based on the method of Bradford. Protein extracts (20 µg for Smad7, 30 µg for phosphorylated Smad1/5/8 and Smad1, and 40 µg for Id1) were diluted in Laemmli buffer (Sigma-Aldrich), incubated for 5 minutes at 95°C, and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were then transferred to Westran Clear Signal PVDF membranes (Schleicher and Schuell, Maidstone, United Kingdom). Membranes were blocked with either 5% of dry milk in TBS-T buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.15% Tween 20) for phosphorylated Smad1/5/8 and Id1, or a more stringent buffer (10% dry milk, 1% BSA, 1% NP40, 0.5% Tween 20 in PBS) for Smad1 and Smad7. They were incubated with rabbit polyclonal antibodies to phosphorylated Smad1/5/8 (1/1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Id1 (1/200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and Smad7 (1/500; Santa

Table 1. Iron parameters in B6 and D2 mice fed diets with different iron contents

Diet	Serum iron, μM	TIBC, μM	Transferrin saturation	Liver iron concentration, $\mu\text{g iron/g dry weight}$
B6 strain				
Iron deficient	7.12 \pm 1.90	61.12 \pm 4.63	11 \pm 3%	211 \pm 24
Iron adequate	11.28 \pm 1.63	39.36 \pm 1.98	29 \pm 4%	441 \pm 85
Iron supplemented	30.46 \pm 1.69	30.74 \pm 0.94	99 \pm 7%	3569 \pm 502
D2 strain				
Iron deficient	7.32 \pm 1.31	66.78 \pm 8.35	11 \pm 3%	224 \pm 44
Iron adequate	22.18 \pm 3.37	52.20 \pm 3.66	42 \pm 4%	502 \pm 69
Iron supplemented	31.38 \pm 2.80	43.62 \pm 3.97	72 \pm 3%	2353 \pm 163

Results are expressed as mean \pm SD (n=5 mice per group). Analyses of variance show that, within each strain, the dietary iron content significantly affects serum iron, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation, as well as hepatic iron concentration (all *P* values are $<$.001).

Cruz Biotechnology), or with a mouse polyclonal antibody to Smad1 (1/250; Santa Cruz Biotechnology) at 4°C overnight, and washed with TBS-T buffer. Following incubation with a goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (1/5000; Cell Signaling Technology) conjugated to horseradish peroxidase, enzyme activity was visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL)-based detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Blots were then stripped and reprobed with mouse monoclonal antibody to β -actin (1/20 000; Sigma-Aldrich). Quantification of proteins was calculated by normalizing the specific probe band to β -actin using the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

Results

Genome-wide mRNA expression profiling identified only 4 genes regulated similarly to hepcidin by the dietary iron content

As shown in Table 1, serum iron parameters and liver iron concentration were all significantly affected by the dietary iron content. Whereas, as previously observed, D2 mice fed an iron-balanced diet have slightly higher serum iron parameters than have B6 mice,²¹ the latter accumulated significantly more iron when fed the iron-enriched diet than did D2 mice. This is particularly noteworthy in the liver (Table 1) and seems to be characteristic of the strain.²² *Hamp1* and *Hamp2* gene expression was assessed by real-time quantitative PCR. As previously reported, B6 mice fed an iron-balanced diet have lower *Hamp2* gene expression than D2 mice fed the same diet.²³ As expected, *Hamp1* gene expression was virtually abolished by iron deficiency, but was increased approximately 7-fold by iron overload in both B6 and D2 mice. Similarly, *Hamp2* gene expression was abolished by iron deficiency and increased by iron overload approximately 5-fold in D2 mice and 13-fold in B6 mice (Figure 1). A total of 30 Agilent microarray hybridizations were performed using mRNA extracted from the livers of 15 B6 and 15 D2 mice (5 mice per diet/strain combination). Two-factor (diet and strain) ANOVA identified 1419 transcripts significantly modulated by the diet iron content (FDR 1%/₀₀). These transcripts were classified according to their variations similar or opposite to hepcidin mRNAs in iron deficiency and/or iron overload (Table S2). The DAVID annotation tool^{24,25} was used to search for overrepresentation of functional categories within the different gene groups (Tables S2,S3). Interestingly, there was a significant excess of genes involved in the TGF- β /BMP signaling pathway among those down-regulated by iron deficiency and up-regulated by iron overload as were *Hamp1* and *Hamp2*. Three genes in this functional category had fold changes induced by both diets of 1.5 or more. Two are coding

for the bone morphogenetic protein Bmp6 and for an inhibitory Smad (Smad7). Of note, Smad7 is important for the tight regulation of Bmp/Smad signal transduction.²⁶ The third gene, *Id1*, whose promoter is strongly activated by Bmp in a Smad-dependent manner,²⁷ encodes a negative inhibitor of basic helix-loop-helix (bHLH) proteins. Besides these genes involved in the TGF- β /BMP signaling pathway, the gene encoding Atoh8, a bHLH protein known to promote neuronal versus glial fate determination in the nervous system,²⁸ was also down-regulated by iron deficiency and up-regulated by iron overload with a fold-change of 1.5 or more.

Real-time quantitative PCR confirms microarray data and shows that *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* mRNA levels are highly correlated with the liver iron burden

As shown in Figure 2, real-time quantitative PCR confirms that expression of *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* is up-regulated in mice fed an iron-enriched diet. This up-regulation is significantly larger in B6 mice that have accumulated more iron in their liver than D2 mice. Conversely, the expression of these genes is down-regulated in response to iron deficiency. Pearson correlation coefficients of *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* expression with liver iron content are highly significant (0.90, 0.86, 0.91, and 0.86, respectively; all *P* $<$.001). Recently, Lin et al showed that iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4.²⁹ Although expression of *Bmp2* was found modulated by iron overload but not by iron deficiency (Table S3), we did not observe any in vivo modulation of the *Bmp4* mRNA by

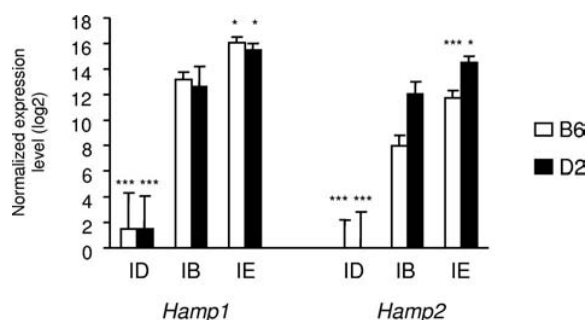


Figure 1. Expression of hepcidin1 (*Hamp1*) and hepcidin2 (*Hamp2*) in the liver of mice fed diets with different iron contents. The expression of hepcidin1 and hepcidin2 transcripts was assessed in mice of 2 strains (B6 and D2) fed an iron-deficient (ID), iron-balanced (IB), or iron-enriched (IE) diet. Expression levels were normalized to HPRT and log₂ transformed, and are expressed as means of 5 samples plus or minus standard deviation. The contribution of diet was assessed by ANOVA, and statistical significant differences relative to the iron-balanced diet were determined by Scheffe posthoc tests. **P* $<$.05; ****P* $<$.001.

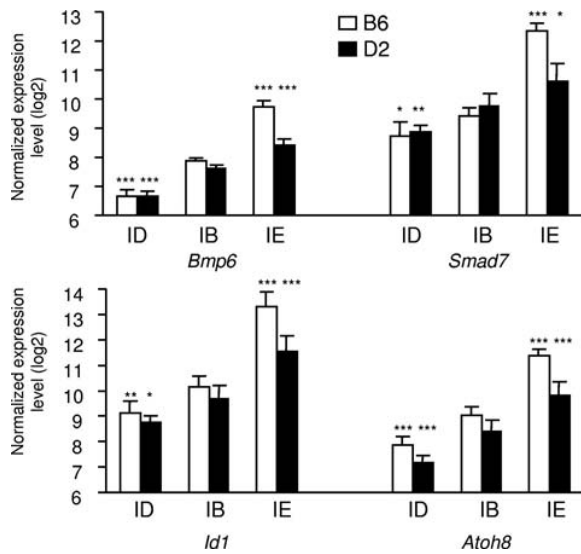


Figure 2. Expression of *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* in the liver of mice fed diets with different iron contents. The expression of the 4 transcripts was assessed in mice of 2 strains (B6 and D2) fed an iron-deficient (ID), iron-balanced (IB), or iron-enriched (IE) diet. Expression levels were normalized to HPRT and log2 transformed, and are expressed as means of 5 samples plus or minus standard deviation. The contribution of diet was assessed by ANOVA, and statistical significant differences relative to the iron-balanced diet were determined by Scheffe posthoc tests. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$.

the dietary iron content in our microarray data. Nevertheless, we assessed their expression by real-time quantitative PCR. Interestingly, although expression of *Bmp4* was not significantly affected when mice of either the B6 or the D2 genetic background were made iron overloaded or iron deficient ($P = .33$ and $P = .38$, respectively), a small but significant increase in the expression of *Bmp2* was observed in mice of the B6 strain fed the iron-enriched diet ($P = .001$). No such increase was observed in the D2 mice that have accumulated less iron in their liver than B6 mice (Figure S1). In addition, no decrease in the expression of *Bmp2* was observed in mice of either strain fed the iron-deficient diet. We quantified the Id1 and Smad7 proteins to which antibodies were available in the liver of the 2 mouse strains and observed that Id1 (Figure S2) and Smad7 were modulated by iron not only at the transcript level but also at the protein level.

Smad1/5/8 phosphorylation is increased by iron overload and decreased by iron deficiency

Since *Bmp6* belongs to the TGF- β superfamily and transmits signal through phosphorylation of Smads,³⁰ we tested whether phosphorylation of Smad1/5/8 was significantly modulated in liver extracts of mice fed an iron-deficient or an iron-enriched diet. Total protein lysates from 18 mice were prepared (3 mice per strain/diet combination) and the amount of the phosphorylated forms of Smad1/5/8 in each condition was determined by Western blot analysis. As shown in Figure 3 and Figure S3, the iron-enriched diet induced Smad1/5/8 phosphorylation. This induction was stronger in B6 mice than in D2 mice, which correlates with the higher liver iron burden and *Bmp6* expression observed in these mice. Of note, a significant decrease of Smad1/5/8 phosphorylation was also observed in mice fed an iron-deficient diet. The amount of Smad1/5/8 phosphorylation in the liver of these mice is therefore correlated with body iron stores and the quantity of *Bmp6* transcripts.

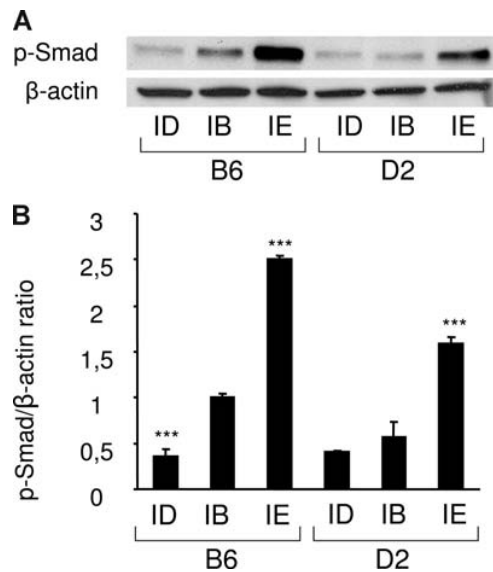


Figure 3. Smad1/5/8 phosphorylation is increased by iron overload and decreased by iron deficiency. (A) Liver lysates from mice fed an iron-deficient (ID), iron-balanced (IB), or iron-enriched (IE) diet ($n = 3$ in each group) were analyzed by Western blot with an antibody to phosphorylated Smad1/5/8. Blots were stripped and reprobed with an antibody to β -actin as loading control. A representative experiment is shown. (B) Chemiluminescence was quantified using Quantity One software to calculate the ratio of phosphorylated Smad1/5/8 (p-Smad) relative to β -actin. Mean ratios of 3 samples (\pm SD) are represented on this figure, relative to the mean ratio of the B6 group of mice fed an iron-balanced diet. Statistical significant differences relative to the iron-balanced diet were determined by Student t tests. *** $P < .001$.

Smad4 knockout mice have increased *Bmp6* but decreased *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* gene expression

The receptor-activated Smad1, Smad5, and Smad8 form heteromeric complexes with Smad4 and these translocate to the nucleus where they regulate the transcription of specific targets. To investigate whether the variations in the mRNA expression of some of these genes could be induced by the observed variations in Smad1/5/8 phosphorylation, we assessed *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*,

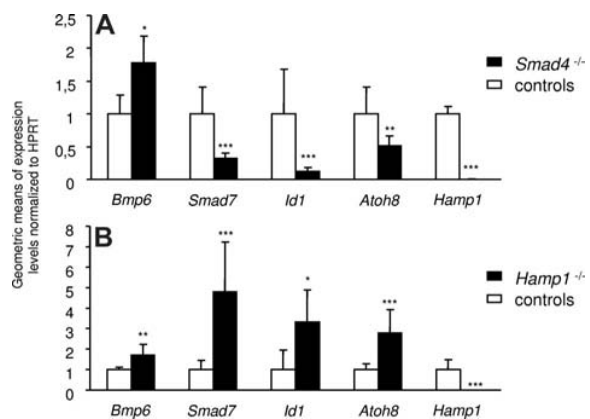


Figure 4. Expression of *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, *Atoh8*, and *Hamp1* in the livers of mice with genetic iron overload. Mice with liver-specific knockout of *Smad4* (A) or *Hamp1* disruption (B) were compared with their respective controls. Expression levels were normalized to HPRT and log2 transformed for the statistical analyses. Statistically significant differences relative to the controls were determined by Student t tests. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$. Geometric means (2^n , where n is the mean of the log2-transformed expression measures within each group) (\pm SD) are represented on this figure, relative to the geometric mean of the appropriate control group.

Atoh8, and *Hamp1* gene expression in the liver of 6 mutant mice with Cre-loxP-mediated liver-specific disruption of *Smad4* and controls of the same genetic background at 4 months of age. Liver-specific disruption of *Smad4* was shown to result in accumulation of iron in many organs, in particular the liver.¹² As shown in Figure 4A, although liver-specific knockout of *Smad4* resulted in markedly decreased expression of *Hamp1*, it led to increased *Bmp6* expression as did the iron-enriched diet. Interestingly, despite the accumulation of iron observed in these mice, *Smad4* deficiency resulted in decreased *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* mRNA expression, as did the iron-deficient diet. These results show that the binding partner for the receptor-activated Smad1, Smad5, and Smad8 is necessary for activation of *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* transcription by iron in response to Bmp signaling.

Hamp1 knockout mice have increased Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 gene expression

Targeted disruption of the hepcidin1 gene also results in early and severe multivisceral iron overload.¹⁵ To check whether the Bmp signaling pathway is still functional in these mice, we assessed the expression of the same genes in the liver of 5 *Hamp1* knockout mice and controls of comparable genetic background at 10 weeks of age. As shown in Figure 4B, the *Hamp1*^{-/-} mice behave like mice fed an iron-enriched diet. Iron overload induced by *Hamp1* deficiency is indeed able to increase the expression not only of *Bmp6* but also of *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8*.

Discussion

Analysis of liver transcription profiles in C57BL/6 and DBA/2 mice fed an iron-deficient or an iron-enriched diet allowed us to identify 4 genes that were regulated by iron similarly to hepcidin in both strains. These results were confirmed by quantitative real-time PCR and point out important molecules participating in the BMP/Smad signaling pathway that regulates hepcidin expression in vivo.

We therefore tested whether the dietary iron content effectively activated/repressed the Smad signaling pathway in these mice through phosphorylation of the receptor-regulated Smads. Activation of Smad1, Smad5, and Smad8 indeed is considered to be the major signaling pathway for BMPs.³¹ Interestingly, we observed that Smad1/5/8 phosphorylation was induced by iron overload, and that this induction was proportional to the liver iron burden of the mice. Conversely, it was reduced by iron deficiency. This is the first demonstration that dietary iron regulates hepcidin synthesis in vivo through Smad1/5/8 phosphorylation. Of note, injection of iron dextran was also shown to lead to an increase in Smad1/5/8 phosphorylation in liver extracts from both zebrafish and mouse.³²

Which of the BMP ligands is (are) responsible for the observed activation of the Smad pathway by iron in vivo is still unknown. Recent studies have shown that many ligands of the TGF- β /BMP superfamily could positively regulate hepcidin expression in vitro^{9,12,13} and in vivo.¹⁰ However, in these studies, hepatic cells or mice were exposed to high levels of exogenous ligands and the observed signals may not reflect the physiological response to iron exposure. Our data suggest that *Bmp6*, which is highly expressed in the liver,³³ has a preponderant role in the activation of the Smad signaling pathway in vivo. We indeed showed in the present study that liver expression of *Bmp6* was transcriptionally regulated by iron (ie, induced by iron overload and repressed by iron deficiency) and that its induction paralleled the liver iron burden of the mice.

Of note, expression of *Bmp2* was also slightly increased in mice with the most severe iron burden (ie, the B6 mice fed the iron-enriched diet) which indicates that, in addition to *Bmp6*, *Bmp2* can also participate in the activation of the Smad signaling pathway. No other ligand of the TGF- β /BMP superfamily, including *Bmp4*, had its gene expression significantly modulated by iron in vivo. What exactly triggers *Bmp6* and *Bmp2* modulation by the dietary iron content remains to be determined, but may well be serum transferrin saturation.^{34,35}

The composition of BMP ligands after exogenous challenges has been observed to be modulated both at the mRNA and at the protein levels.³⁶ It is therefore likely that *Bmp6* and *Bmp2* protein levels in iron-overloaded and in iron-deficient mice reflect *Bmp6* and *Bmp2* transcript levels. Whereas hemojuvelin (HJV) acts as a BMP coreceptor to enhance cellular responses to BMP ligands and increase hepcidin expression,⁹ soluble HJV seems to bind and sequester BMP ligands and thus to inhibit BMP signaling and hepcidin expression both in vitro and in vivo.¹⁰ Interestingly, the ability of soluble HJV to inhibit BMP induction of hepcidin promoter activation in Hep3B cells is selective and much more effective for BMP6 than for other ligands.¹⁰ siRNA inhibition of endogenous BMP6 in HepG2 cells significantly reduces basal hepcidin expression,¹⁰ confirming that regulation of hepcidin by BMP6 is bidirectional, that is, not only induced when BMP6 is added to cells, but also repressed when endogenous BMP6 expression is decreased. Altogether, these results converge to suggest that BMP6 is the ligand of the TGF- β /BMP superfamily that has a key role in the maintenance of systemic iron homeostasis, although *BMP2* can also function as an endogenous regulator of hepcidin expression in vivo, especially when body iron stores are abundant and require strong activation of the Smad signaling pathway.

Our data also show that *Id1*, *Smad7*, and *Atoh8* gene expression in the liver of mice fed an iron-enriched or an iron-deficient diet follows *Bmp6* gene expression and the level of Smad1/5/8 phosphorylation. *Id1* is known to be a direct target gene for BMPs that strongly activate its promoter in a Smad-dependent manner. Indeed, Smad-binding elements (SBEs) and a GC-rich region, which bind both Smad1 and Smad5, confer BMP responsiveness to the *Id1* promoter.²⁷ Receptor-activated Smads have also been shown to regulate *Smad7* transcription through direct binding to SBEs on its promoter.³⁷ However, no information on the regulation of *Atoh8* transcription is yet available. To check that the regulation of these genes by body iron stores relies on the formation of heteromeric complexes between phosphorylated Smad1/5/8 and Smad4 and the translocation of these complexes into the nucleus, we measured their expression in mice with liver-specific knockout of *Smad4*. These mice have compromised Bmp signaling and develop severe iron overload.¹² Interestingly, *Bmp6* gene expression is increased in these mice, which shows that its up-regulation by iron is not restricted to dietary iron overload. However, the expression of *Id1*, *Smad7*, and *Atoh8* is decreased, suggesting that *Atoh8*, like *Id1* and *Smad7*, is a direct target gene for BMP ligands. Further analyses are conducted to check whether receptor-activated Smads also bind to the *Atoh8* promoter. Of note, in mice with genetic iron overload due to targeted disruption of *Hamp1*,¹⁵ Bmp signaling is functional, and the expression of *Bmp6*, *Smad7*, *Id1*, and *Atoh8* is increased as it is in mice with dietary iron overload.

It is not clear yet how *Id1*, *Smad7*, and *Atoh8*, whose expression is regulated by body iron providing that *Smad4* is

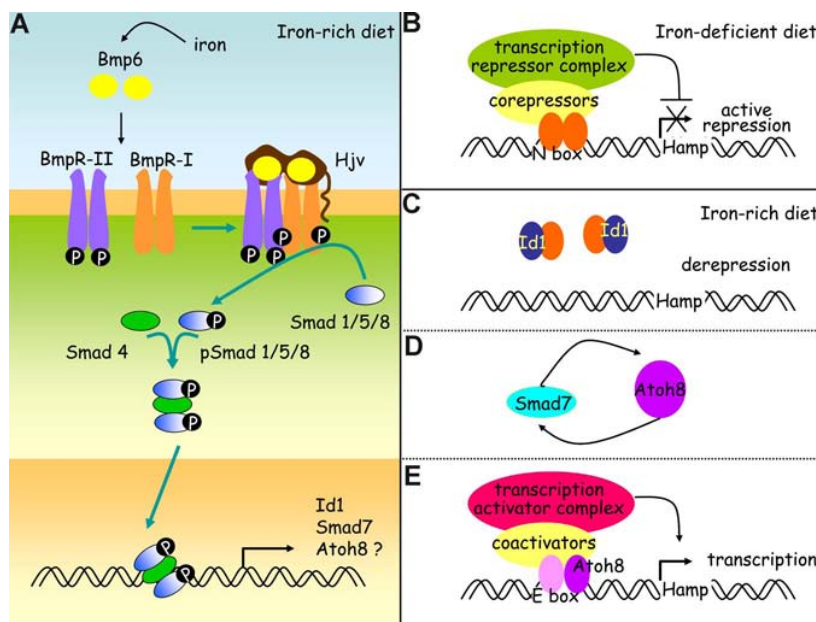


Figure 5. A working model for hepcidin regulation by iron in the mouse. (A) Bmp6, whose expression is induced by iron, binds to type I and II receptors and to the coreceptor, hemojuvelin (Hjv). The constitutively active kinase domains of type II receptors phosphorylate type I receptors, and this in turn activates the Smad signaling pathway through phosphorylation of receptor Smads (Smad1, Smad5, and Smad8). These associate with co-Smads (Smad4) to form a heteromeric complex that translocates to the nucleus and stimulates the expression of a wide range of target genes, including the genes coding for Id1, Smad7, and possibly also Atoh8. Hypothetical roles for Id1, Smad7, and Atoh8 are presented on panels B through E. (B) When dietary iron availability is low, hepcidin transcription is repressed by specific basic-loop-helix (bHLH) repressors. (C) When the diet iron content increases, inhibitor of differentiation proteins Id1 are synthesized. These are known to associate with bHLH proteins and prevent them from binding DNA. By sequestering the bHLH repressors, Id1 proteins may stop them from achieving their inhibiting functions on the hepcidin promoter. (D) Iron overload also increases Smad 7, which could enhance Atoh8 activity as it does for another bHLH transcription activator, MyoD. (E) The hepcidin promoter contains several E-boxes known to interact with bHLH transcription factors and further investigation will determine whether Atoh8 binds to and activates the hepcidin promoter.

functional, can act on hepcidin regulation. Inhibitor of differentiation proteins Id1 associate with tissue-specific basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that can either activate³⁸ or repress transcription.³⁹ In this study, we observed that activation of the BMP/Smad signaling pathway by iron leads to synthesis of Id1 that seems proportional to the needs for hepcidin. It should therefore be explored whether Id1 could overcome the inhibitory effect of a transcription factor and allow hepcidin transcription to proceed. The expression of *Smad7* mRNA is known to be quickly induced by members of the TGF- β family.⁴⁰ Smad7 interferes with binding to type I receptors and thus activation of receptor-regulated Smads or recruits the E3 ubiquitin ligase Smurf to receptors and thus targets them for degradation.^{26,41} Although Smad7 could participate in a negative feedback loop to control the intensity and duration of responses to ligands such as Bmp6,^{26,41} it could also enhance transcriptional activity of Atoh8, a bHLH protein²⁸ whose role in the maintenance of iron balance was unsuspected so far, as was shown recently for another bHLH protein, MyoD.⁴² The hepcidin promoter contains several E-boxes⁴³ known to interact with bHLH transcription factors and it would be interesting to test whether Atoh8 could activate the hepcidin promoter. This would establish a link among iron, the different proteins identified in this study, and hepcidin, as depicted in our working model (Figure 5).

In summary, our data underscore a critical role of Bmp6 in the maintenance of systemic iron homeostasis in 2 different strains of mice and suggest that Smad7, Id1, and Atoh8 may participate in this maintenance. They also underline that Smad1/5/8 phosphorylation in the liver is controlled by body iron. It is now important to

understand how exactly these molecules are involved in the complex process of regulation of hepcidin synthesis by iron.

Acknowledgments

The authors thank the "Service de Zootechnie" (Institut Fédératif de Recherche 30) and the platform "Génomique" (Génopole Toulouse) for assistance and skilled advice.

This work was supported in part by grants from the Agence Nationale pour la Recherche, Paris, France (ANR, program IRONGENES), the European Commission, Brussels, Belgium (LSHM-CT-2006-037296: EUROIRON1), and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Villejuif, France.

Authorship

Contribution: L.K. and D.M. performed research, analyzed data, and reviewed the paper; A.M. and J.M. performed research and reviewed the paper; V.D. and R.B. performed research; R.-H.W. and C.D. contributed *Smad*-deficient mice and reviewed the paper; S.V. contributed *Hamp1*-deficient mice, discussed the experiments, and reviewed the paper; H.C. and M.-P.R. designed research, analyzed and interpreted data, performed statistical analysis, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Marie-Paule Roth, Inserm U563, CHU Purpan, BP 3028, F-31024 Toulouse Cedex 3, France; e-mail: marie-paule.roth@inserm.fr.

References

- Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:690-699.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090-2093.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002;110:1037-1044.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276:7811-7819.
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;33:21-22.
- Papanikolaou G, Samuells ME, Ludwig EH, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004;36:77-82.

7. Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Hcpicidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*. 2005;105:1803-1806.
8. Piperno A, Girelli D, Nemeth E, et al. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood*. 2007;110:4096-4100.
9. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006;38:531-539.
10. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*. 2007;117:1933-1939.
11. Anderson GJ, Frazer DM. Iron metabolism meets signal transduction. *Nat Genet*. 2006;38:503-504.
12. Wang RH, Li C, Xu X, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005;2:399-409.
13. Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10289-10293.
14. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, et al. Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology*. 2002;122:745-751.
15. Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood*. 2006;108:1402-1405.
16. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* (<http://www.biomedcentral.com/bmcmolbiol/>). 2006;7:3.
17. National Center for Biotechnology Information. Gene Expression Omnibus. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Accessed June 30, 2008.
18. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. (<http://genomebiology.com>). 2004;5:R80.
19. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol*. (<http://genomebiology.com>). 2003;4:210.
20. Storey JD, Xiao W, Leek JT, Tompkins RG, Davis RW. Significance analysis of time course microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12837-12842.
21. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, et al. Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut*. 2002;51:648-653.
22. Rodriguez A, Hilvo M, Kytomaki L, et al. Effects of iron loading on muscle: genome-wide mRNA expression profiling in the mouse. *BMC Genomics* (<http://www.biomedcentral.com/bmcgenomics>). 2007;8:379.
23. Courselaud B, Troade C, Fruchon S, et al. Strain and gender modulate hepatic hepcidin 1 and 2 mRNA expression in mice. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:283-289.
24. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>. Accessed June 30, 2008.
25. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*. (<http://genomebiology.com>). 2003;4:P3.
26. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19:176-184.
27. Korchynskiy O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem*. 2002;277:4883-4891.
28. Inoue C, Bae SK, Takatsuka K, Inoue T, Bessho Y, Kageyama R. Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes Cells*. 2001;6:977-986.
29. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood*. 2007;110:2182-2189.
30. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells: induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* (<http://www.biomedcentral.com/bcimmunol/>). 2005;6:9.
31. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*. 2002;7:1191-1204.
32. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4:33-41.
33. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood*. 2008;111:5195-5204.
34. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113:1271-1276.
35. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2008;7:205-214.
36. Rosendahl A, Pardoll E, Speletas M, Ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:160-169.
37. Nagarajan RP, Zhang J, Li W, Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem*. 1999;274:33412-33418.
38. Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol*. 2003;13:410-418.
39. Jogi A, Persson P, Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H. Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem*. 2002;277:9118-9126.
40. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997;389:631-635.
41. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P. Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol* (<http://www.biomedcentral.com/bmccellbiol/>). 2006;7:16.
42. Kollias HD, Perry RL, Miyake T, Aziz A, McDermott JC. Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. 2006;26:6248-6260.
43. Bayele HK, McArdle H, Srai SK. Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor. *Blood*. 2006;108:4237-4245.

Article 2

Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload

Delphine Meynard, Léon Kautz, Valérie Darnaud, François Canonne-Hergaux, Hélène Coppin & Marie-Paule Roth. Nat Genet. 2009 Apr;41(4):478-81. Epub 2009 Mar 1.

I. Introduction

Dans l'article précédent nous avons montré que BMP6 répondait aux variations du fer intrahépatique *in vivo* mais son importance physiologique dans le contrôle de l'homéostasie martiale restait à démontrer. En effet, nos résultats allaient à l'encontre de ce qui était alors retrouvé dans la littérature où BMP2, 4, 7 ou encore 9 étaient décrits comme les activateurs de la voie, mais ceci *in vitro* [71, 114].

Pour vérifier l'importance physiologique de BMP6, nous avons donc obtenu la souris invalidée pour le gène *Bmp6* produite en 1998 par Elizabeth Robertson [220]. Cette souris devait nous permettre de vérifier *in vivo* si BMP6 était un activateur clé de l'induction de l'hepcidine par la voie des BMPs en réponse au fer. Ces souris avaient été utilisées pour rechercher si la molécule BMP6 était impliquée dans le développement du squelette mais jamais les paramètres du fer n'avaient été mesurés. Contrairement aux souris déficientes pour les autres molécules BMPs, ces souris sont viables et fertiles. Aucun phénotype particulier n'avait été observé à l'âge adulte et seules de légères anomalies du squelette avaient été décrites à l'état embryonnaire. Si notre hypothèse était correcte, nous devions observer chez ces souris des anomalies dans l'homéostasie du fer, en particulier dans le foie.

Lorsque j'ai sacrifié la première souris *Bmp6*^{-/-} âgée de 7 semaines, l'importance de BMP6 dans le métabolisme du fer devint une évidence. En effet, le foie que j'ai prélevé était de couleur noire et le pancréas de couleur brune, comme ce qui avait déjà été décrit auparavant chez les souris *Hamp*^{-/-} et *HJV*^{-/-}. Les caractéristiques phénotypiques ainsi que la voie de signalisation des BMP/Smad ont donc été étudiées chez ces souris.

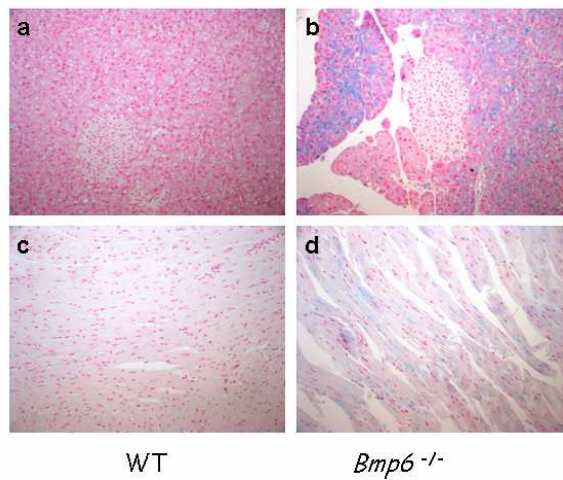


Figure supplémentaire 1 : examen histologique de la charge en fer dans le pancréas et le cœur (X 200).

Le fer présent dans les tissus est détecté par coloration de Perls (en bleu).

a : pancréas de souris sauvage, **b** : pancréas de souris *Bmp6*^{-/-}, **c** : Cœur de souris sauvage, **d** : Cœur de souris *Bmp6*^{-/-}

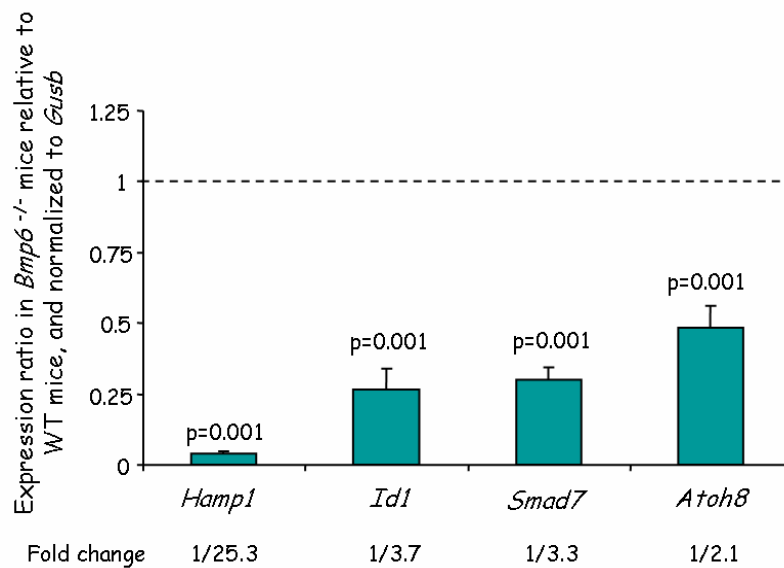


Figure supplémentaire 2 : L'expression des gènes *Hamp1*, *Id1*, *Smad7*, et *Atoh8* est diminuée dans le foie de souris *Bmp6*^{-/-} par rapport aux souris sauvages

Les rapports d'expression entre les souris *Bmp6*^{-/-} et les souris sauvages (6 souris par groupes) normalisés sur l'expression du gène de référence de la *glucuronidase β* ont été calculés à l'aide du logiciel REST.

II. Résultats

1. Les souris *Bmp6*^{-/-} développent une surcharge en fer intrahépatique massive

Dans un premier temps, nous avons mesuré le fer dans le foie et la rate ainsi que la saturation de la transferrine. A l'âge de 7 semaines, les souris *Bmp6*^{-/-} ont 11 fois plus de fer dans le foie, 2 fois moins de fer dans la rate que les souris sauvages et leur saturation de la transferrine est proche de 100% (figure 1a). Nous avons confirmé ces résultats en histologie sur des coupes de foie où le fer est marqué en bleu par coloration de Perl's. Ces souris accumulent une quantité considérable de fer dans les hépatocytes mais seule une coloration minime est visible dans les macrophages de la rate (figure 2). Les dépôts de fer dans le foie sont majoritairement localisés autour de la veine centrolobulaire. Une accumulation de fer dans les cellules acinaires du pancréas exocrine, le cœur et les tubules du rein est également observée (figure supplémentaire 1).

La délétion du gène *Bmp6* a donc pour conséquence une surcharge en fer multi-viscérale rapide et massive, proche de ce qui avait déjà été décrit chez les souris *HJV*^{-/-}, *Smad4*^{-/-} et *Hamp*^{-/-}. A titre de comparaison, les souris *Bmp6*^{-/-} âgées de 7 semaines ont déjà accumulé significativement plus de fer que des souris de différents fonds génétiques invalidées pour le gène *Hfe* et âgées de 12 semaines (données personnelles non publiées). Le rôle de *Bmp6* est donc primordial dans le contrôle de l'homéostasie du fer.

2. La voie des BMPs n'est pas activée malgré la surcharge

Nous avons ensuite mesuré par PCR quantitative l'expression hépatique des messagers codant l'hepcidine, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8*. Les transcrits *Hamp* sont sévèrement diminués (x 22) dans le foie de souris *Bmp6*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (figure 1b). L'expression des gènes *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* est également fortement réduite dans le foie de ces souris (figure supplémentaire 2). *Smad7* et *Id1* sont impliqués dans la voie de signalisation des BMPs. Si la voie est fonctionnelle, leur expression devrait augmenter au regard de la surcharge en fer ce qui n'est pas le cas. Ceci suggère qu'en l'absence de *Bmp6* la voie des BMPs n'est pas activée par le fer.

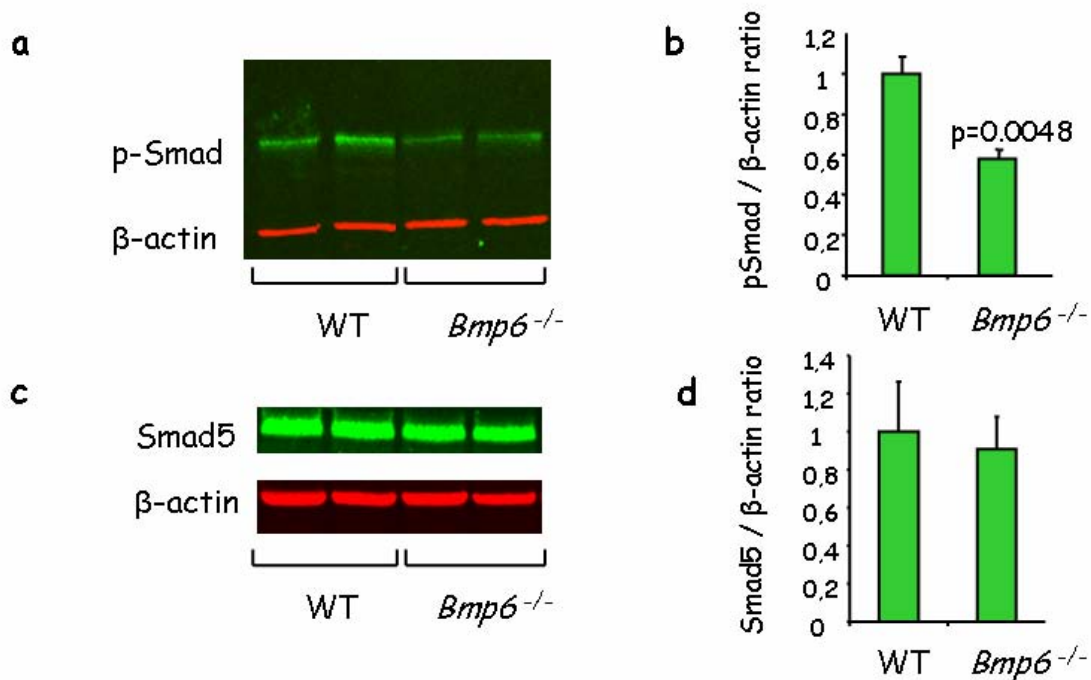


Figure supplémentaire 3 : Analyse par western blot de la phosphorylation des Smad1/5/8

(a) Les lysats de foie de souris *Bmp6*^{-/-} et de souris sauvages ont été analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées des Smad1/5/8 et de l'actine β pour la normalisation. Les membranes ont été scannées à l'aide d'un appareil Odyssey Infrared Imaging System. Deux expériences indépendantes sont représentées.

(b) Le rapport d'intensité des bandes correspondant aux formes phosphorylées des Smad1/5/8 et à l'actine β a été évalué à l'aide du logiciel Odyssey 3.0 software (LI-COR Biosciences) (4 souris par groupe)

(c) Les lysats de foie des mêmes souris ont été analysés par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre Smad5 et l'actine β pour la normalisation

(d) La quantification à l'aide du logiciel Odyssey 3.0 software ne montre pas de différence de niveau de Smad5 entre les souris *Bmp6*^{-/-} et les souris sauvages.

La transduction du signal d'activation de la voie passe par la phosphorylation du complexe Smad1/5/8. Si la voie n'est pas activée, il ne devrait donc pas y avoir d'induction de la phosphorylation de ces molécules chez les souris *Bmp6*^{-/-}.

Nous avons donc mesuré par western blot la quantité de Smads phosphorylés dans les extraits protéiques de foie de souris *Bmp6*^{-/-} et de souris sauvages. Comme attendu, la phosphorylation des Smad1/5/8 est fortement diminuée chez la souris *Bmp6*^{-/-} (figure supplémentaire 3a et 3b). Pour vérifier que la différence observée correspond bien à une différence de phosphorylation et non pas à une diminution des protéines Smad, nous avons également quantifié la forme non phosphorylée de Smad5 qui est équivalente entre les souris *Bmp6*^{-/-} et les souris sauvages (figure supplémentaire 3c et 3d).

Nous avons ensuite utilisé la technique de microscopie confocale afin d'évaluer l'impact de la diminution de la phosphorylation des molécule Smad1/5/8 sur la translocation du complexe dans le noyau. Nous avons marqué des coupes histologiques de foie avec un anticorps dirigés contre les Smad1, 5 et 8 phosphorylés sur les sérines du domaine C-terminal. Nous avons utilisé des souris *Bmp6*^{-/-}, et leurs témoins sauvages qui ont été nourries avec une alimentation équilibrée ou surchargée en fer. Alors que la surcharge en fer secondaire chez les souris sauvages induit une forte augmentation de la translocation nucléaire du complexe par rapport à l'alimentation standard, on n'observe pas de translocation du complexe chez la souris *Bmp6*^{-/-} malgré la surcharge en fer massive, ce qui confirme que la voie de signalisation n'est pas activée en absence de *Bmp6* (Figure 3).

3. Mais qu'en est-il de l'absorption duodénale de fer ?

Pour répondre à cette question, nous avons mesuré par PCR quantitative l'expression de différents transcrits de molécules impliquées dans le transport du fer dans le duodénum de souris *Bmp6*^{-/-} et de souris sauvages:

- *Dcytb* (ou *Cybrd1*), la ferriréductase à la surface des entérocytes
- *Dmt1*, le transporteur transmembranaire de fer au niveau apical de l'entérocytes
- *Fpn* (ferroportine), le transporteur à la membrane basolatérale.

L'expression des transcrits *Dcytb* et *Dmt1* est augmentée d'environ 14 fois et celle de la ferroportine de 2 fois chez les souris *Bmp6*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Figure supplémentaire 4) suggérant une absorption élevée du fer au niveau duodénal. L'augmentation des protéines *Dmt1* et ferroportine a été confirmée par immunohistochimie sur des coupes de duodénum (Figure 4). Alors que l'on n'observe qu'une faible coloration de

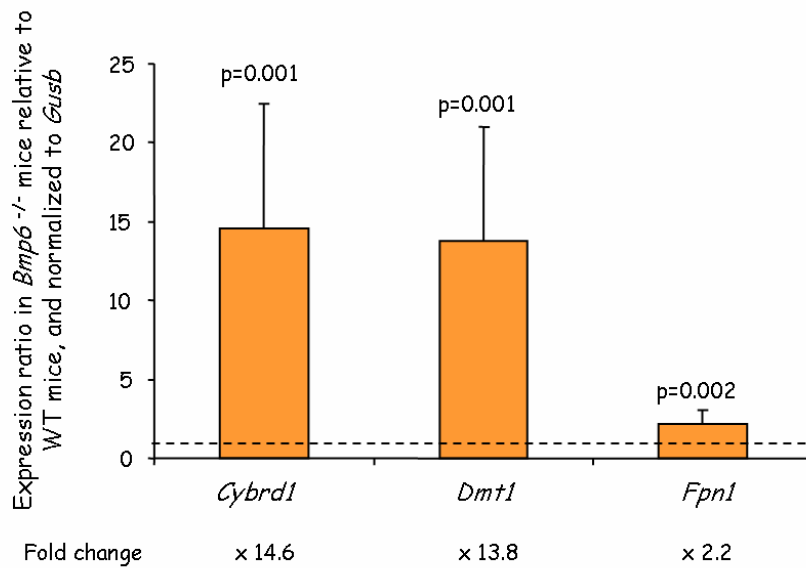


Figure supplémentaire 4 : L'expression des gènes *Cybrd1* (ou *Dcytb*), *Dmt1*, and *Fpn1* est augmentée dans le duodénum de souris *Bmp6*^{-/-} par rapport aux souris sauvages

Les rapports d'expression de ces transcrits dans le duodénum, entre les souris *Bmp6*^{-/-} et les souris sauvages normalisés par la β -glucuronidase, ont été calculés à l'aide du logiciel REST.

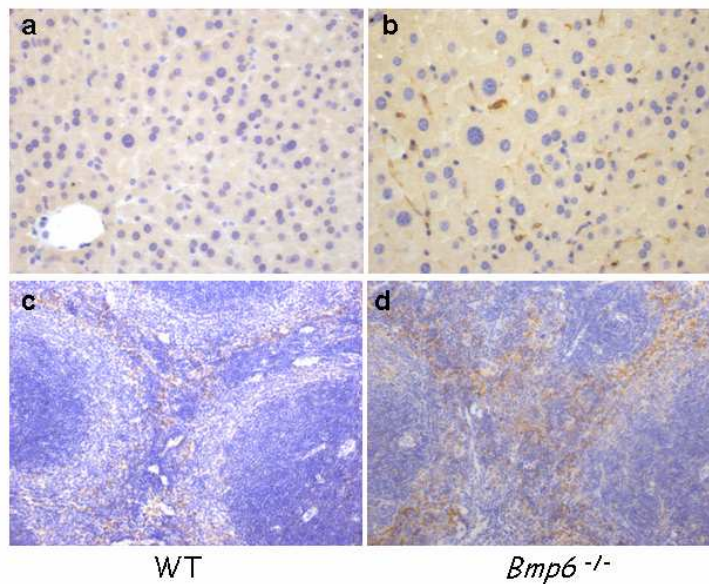


Figure supplémentaire 5 : Détection par immunohistochimie de l'expression de la ferroportine dans les macrophages de:

a : foie de souris sauvage (x400), **b** : foie de souris *Bmp6*^{-/-} (x400), **c** : rate de souris sauvage (x200), **d** : rate de souris *Bmp6*^{-/-} (x200)

la protéine Dmt1 chez la souris sauvage, la souris *Bmp6*^{-/-} présente une coloration intense au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. De même, l'expression protéique de la ferroportine est fortement augmentée à la membrane basolatérale des entérocytes ainsi que dans les macrophages du foie et de la rate chez les souris *Bmp6*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Figure supplémentaire 5), ce qui est cohérent avec le faible taux de transcrits de l'hepcidine observé chez les souris *Bmp6*^{-/-}.

4. BMP6 joue-t-il un rôle dans l'induction de l'hepcidine par l'inflammation ?

Les souris *HJV*^{-/-} induisent la synthèse d'hepcidine en réponse à l'inflammation [39] alors que les souris *Smad4*^{-/-} en sont incapables [115]. Nous avons donc vérifié si les souris *Bmp6*^{-/-} répondaient au LPS. Nous avons injecté le LPS (1 µg/g de souris) ou un volume équivalent de solution saline (NaCl 0.9%) dans le péritoine de souris *Bmp6*^{-/-} et de souris sauvages. Le foie et la rate ont été prélevés 6h après injection. Le traitement au LPS induit comme attendu une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire aigüe : *Il-6* et *Tnf* dans la rate ainsi que *Crp* dans le foie (Figure 13). La quantité de messagers *Hamp* est augmentée de 24 fois chez les souris *Bmp6*^{-/-} contre 2,6 fois chez les souris sauvages par rapport aux témoins sans LPS (Figure 1c). Le niveau de messenger *Hamp* observé chez les souris *Bmp6*^{-/-} traitées au LPS est toutefois inférieur à celui observé chez les souris sauvages. Bien que les souris *Bmp6*^{-/-} n'activent pas la voie des BMPs en réponse au fer, elles induisent de manière significative l'expression de l'hepcidine en réponse au LPS. Ces résultats suggèrent donc l'existence de deux voies indépendantes qui réguleraient l'expression de l'hepcidine avec Smad4 pour point commun.

III. Résultats complémentaires

Deux des paramètres qui régulent l'expression de l'hepcidine sont le fer et l'inflammation. D'un côté le fer stimule l'expression de l'hepcidine par la voie de signalisation des BMP/Smad. De l'autre, sous l'influence d'un stimulus inflammatoire, la cytokine IL-6 est libérée et va se lier à un complexe composé du récepteur α de l'IL-6 et de la glycoprotéine gp130. Cette interaction provoque l'activation de protéines kinases Janus (JAK) qui vont phosphoryler les protéines de transduction du signal et d'activation de la transcription (STAT), en particulier STAT3. Une fois phosphorylés, les homodimères STAT3 transloquent dans le noyau et régulent la transcription de gènes cibles comme l'hepcidine [41, 148]. Bien

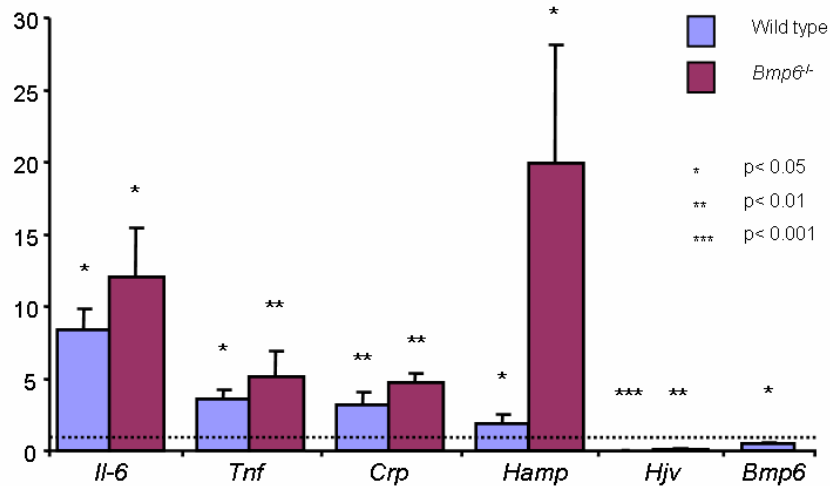


Figure 13 : Rapports d'expression des gènes *Il-6* dans la rate, *Tnf*, *Crp*, *Hamp*, *Hvj* et *Bmp6* dans le foie entre les souris *Bmp6*^{-/-} et sauvages injectées avec du LPS par rapport aux souris contrôles correspondantes.

Les rapports d'expression de ces transcrits, normalisés par *Hprt*, ont été calculés à l'aide du logiciel REST (5 souris par groupe).

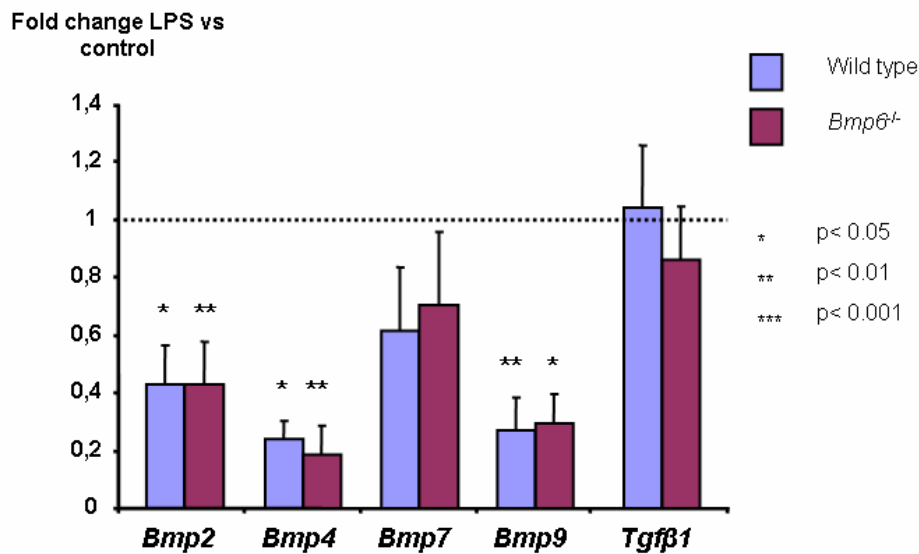


Figure 14 : Rapports d'expression des transcrits *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Bmp9* et *Tgf-β1* dans le foie de souris *Bmp6*^{-/-} et sauvages injectées au LPS par rapport aux souris contrôles correspondantes.

Les rapports d'expression de ces transcrits, normalisés par *Hprt*, ont été calculés à l'aide du logiciel REST (5 souris par groupe).

qu'il soit connu que la voie de l'inflammation est médiée par STAT3, des études récentes suggèrent que la voie de signalisation des BMP/Smad pourrait aussi être impliquée.

Trois arguments indirects soutiennent cette hypothèse :

- *In vitro*, l'induction de l'hepcidine médiée par l'IL-6 est inhibée sous l'action de la dorsomorphine, un inhibiteur spécifique des récepteurs de type I des BMPs [150].
- L'expression de l'hepcidine n'augmente pas chez des souris *Smad4*^{-/-} traitées par de l'IL-6. Ces données indiquent que Smad4 est indispensable à l'expression de l'hepcidine médiée par IL-6 et que la voie des BMPs est impliquée dans cette activation [115].
- La délétion du BMP-RE proximal, un des éléments de réponse aux BMPs dans le promoteur de l'hepcidine, abolit la réponse à IL-6 [118].

Ces observations vont dans le sens d'une implication de la voie de signalisation des BMP/Smad dans la stimulation de l'hepcidine en réponse à l'inflammation.

1. Quel est le ligand activateur de la voie des BMPs en réponse à l'inflammation ?

Les souris sauvages et les souris *Bmp6*^{-/-} présentent, parallèlement à l'augmentation de l'expression de l'hepcidine en réponse au LPS, un effondrement du messager *HJV* avec en plus chez les souris sauvages, une diminution du messager *Bmp6* (figure 13). Il semblerait donc que la voie signalisation classique des BMP/Smad induite par le fer soit inhibée lors d'une réaction inflammatoire.

Le signal provoqué par l'inflammation est transmis indépendamment de BMP6 et de HJV, il est donc possible qu'un autre membre de la famille des BMPs puisse se fixer sur BMPR I et II. Nous avons donc contrôlé par PCR quantitative l'expression dans le foie des BMPs les plus couramment retrouvés dans la littérature : *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* et *Bmp9* chez des souris traitées et non traitées au LPS. Aucune augmentation d'expression de ces messagers n'a été observée après traitement, ni chez la souris *Bmp6*^{-/-}, ni chez la souris sauvage (figure 14). Curieusement, la réaction inflammatoire semble même diminuer leur niveau de messager de la même façon que *Bmp6* chez les souris sauvages. Il est donc peu probable qu'ils jouent un rôle dans l'induction de l'expression de l'hepcidine par l'inflammation.

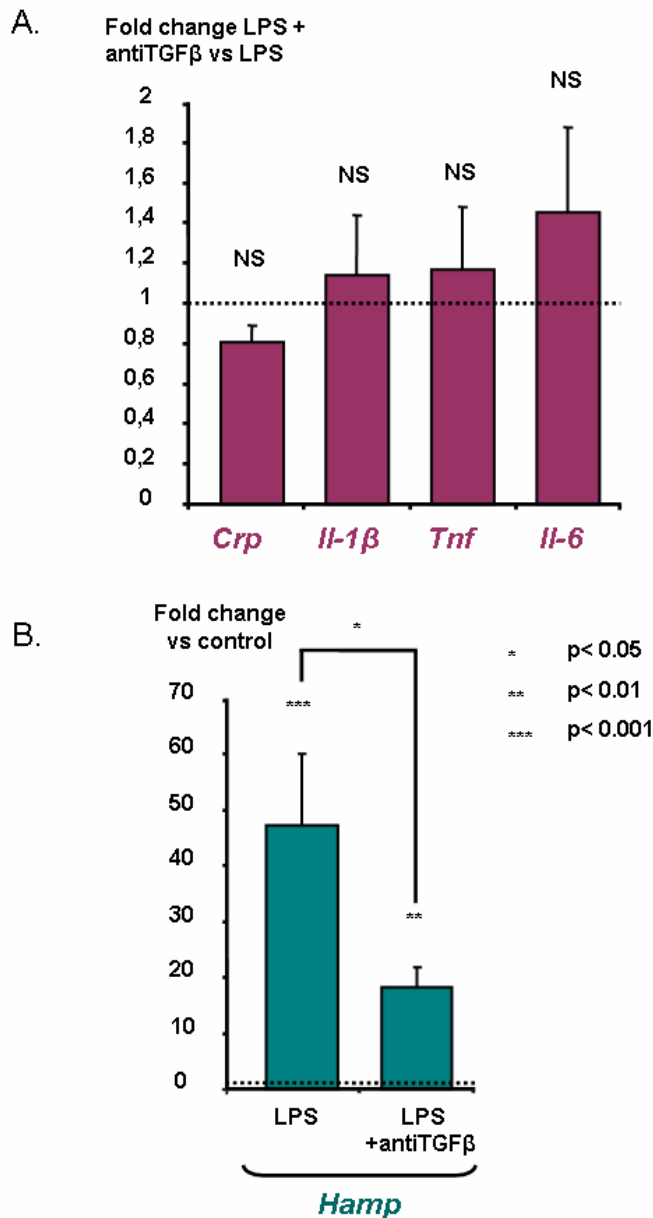


Figure 15 : Effet d'un traitement par des solutions LPS + anti-TGF- β ou LPS uniquement

A. rapport d'expression des transcrits *Crp* et *Tnf* dans le foie et *Il-1 β* et *Il-6* dans la rate entre les souris *Bmp6*^{-/-} auxquelles on a administré la solution combinée de LPS et d'anticorps neutralisant anti-TGF- β et les souris auxquelles on a administré du LPS uniquement.

B. rapport d'expression du transcrit *Hamp* dans le foie de souris *Bmp6*^{-/-} traitées par la solution de LPS + anticorps neutralisant et LPS seul par rapport aux souris contrôles auxquelles on a administré une solution de PBS.

Les rapports d'expression de ces transcrits normalisé par la *Hprt* a été calculé à l'aide du logiciel REST (5 souris par groupe).

A la vue de ces résultats il était donc possible qu'un autre ligand soit impliqué dans l'induction de l'expression de l'hepcidine par le LPS. De façon intéressante il a été montré que le TGF- β , qui active normalement la phosphorylation des Smad2 et 3, peut dans certains cas transmettre un signal par l'intermédiaire des Smad1/5/8 [221, 222]. Nous avons vérifié que le TGF- β pouvait être impliqué dans l'activation de l'hepcidine par l'inflammation. Bien que l'expression des transcrits *TGF- β* ne varie pas après traitement par le LPS il était possible que la régulation soit traductionnelle ou post-traductionnelle. En effet, le TGF- β est activé par clivage de sa forme latente [223, 224]. Les tissus contiennent des quantités significatives de TGF- β latent et l'activation de seulement une petite fraction de ce TGF- β génère une réponse cellulaire maximale. Cette activation ne requiert aucune induction du messenger *TGF- β 1* [223] et il a été montré qu'un traitement au LPS induit une sécrétion de TGF- β actif [225].

2. Le TGF- β est-il impliqué dans la régulation de l'hepcidine ?

Pour tester si le TGF- β est impliqué dans la cascade de signalisation qui induit l'hepcidine en réponse à l'inflammation, nous avons utilisé un anticorps neutralisant anti-TGF- β [226]. Les souris *Bmp6*^{-/-} ont reçu une première injection avec 1 mg d'anticorps neutralisant ou un volume équivalent de PBS. 48h après cette première injection, les souris ont reçu une injection d'une des deux solutions suivantes :

- une solution combinée d'anticorps neutralisant et de LPS à raison de 1 μ g par gramme de souris pour les souris pré-traitées avec l'anticorps neutralisant
- 1 μ g de LPS par gramme de souris ou un volume équivalent de PBS pour les souris qui n'avaient pas reçu l'anticorps neutralisant.

Les souris ont été sacrifiées 6h après cette deuxième injection. Nous avons mesuré l'expression des messagers *Crp* et *Tnf* dans le foie et *Il-1 β* et *Il-6* dans la rate et comparé d'une part les souris ayant reçu la solution combinée par rapport aux contrôles et d'autre part les souris n'ayant reçu que du LPS par rapport aux contrôles. Aucune différence significative n'a pu être observée entre ces deux groupes de souris (figure 15A). Le stimulus inflammatoire est donc équivalent dans les deux groupes de souris.

Nous avons ensuite mesuré le niveau d'expression du messenger *Hamp*. Si notre hypothèse est exacte, l'inhibition du TGF- β devrait empêcher la synthèse d'hepcidine après traitement au LPS.

Comme on peut le constater sur la figure 15B, l'expression de l'hepcidine est atténuée chez les souris ayant reçu la solution combinée d'anticorps neutralisant et de LPS mais reste néanmoins fortement induite. Si le TGF- β était l'activateur de la voie, on

s'attendrait à ce que l'hepcidine ne soit plus exprimée. Notre hypothèse est donc peu probable mais, avant de la rejeter, nous allons reproduire ces expériences sur un plus grand nombre de souris tout en augmentant la dose d'anticorps neutralisant. Il se peut en effet que l'inhibition du TGF- β n'ait pas été totale.

IV. Discussion

Les résultats obtenus avec la souris *Bmp6*^{-/-} mettent fin à toute controverse puisque nous identifions clairement ici *Bmp6* comme le régulateur endogène principal de l'expression de l'hepcidine en réponse au fer. L'absence de *Bmp6* chez la souris conduit à une surcharge en fer massive dans le foie ainsi que dans le pancréas, le cœur et le rein. L'expression des messagers codant pour l'hepcidine ainsi que le niveau de phosphorylation des Smads1/5 et 8 sont faibles et il n'y a pas de translocation du complexe dans le noyau. Il est intéressant de noter également que la souris *Bmp6*^{-/-} ne présente pas d'anomalies de développement comme celles qui caractérisent les souris déficientes pour d'autres membres de la famille des BMPs. Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, aucun membre de la famille des BMPs n'est capable de remplacer *Bmp6* *in vivo*. Nous n'avons pas observé *in vivo* de variations de l'expression de *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* et *Bmp9* par rapport aux souris sauvages (données personnelles). Ceci renforce l'idée que le rôle des BMPs n'est pas redondant pour la régulation de l'homéostasie martiale.

Nos résultats ont été confirmés par l'équipe de J. Babitt et H. Lin [227]. En effet, Andriopoulos *et al.* ont montré *in vitro* et *in vivo* que la forme soluble de l'hémojuvéline, l'antagoniste des BMPs, était plus active contre BMP6 qu'envers les autres molécules de la famille des BMPs. De plus, des souris traitées avec un anticorps neutralisant anti-BMP6 présentent une chute de la production d'hepcidine alors que l'injection de BMP6 exogène chez la souris accroît significativement la transcription de *Hamp* et diminue le fer sérique. Enfin, il existe une interaction directe entre l'hémojuvéline soluble et BMP6 [227]. Nos résultats sont donc confortés par la mise en évidence des interactions entre l'hémojuvéline et BMP6 pour réguler l'expression de l'hepcidine. Néanmoins, il reste à déterminer comment le fer induit l'expression de *Bmp6*. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

Le promoteur de *Bmp6* comporte de nombreux sites de fixation de facteurs de transcription et certains de ceux-ci pourraient être régulés par le fer. Il serait intéressant d'identifier quels sont ceux qui stimulent l'expression de l'hepcidine. On peut également imaginer l'existence d'un antagoniste spécifique de BMP6 qui pourrait être inactivé lorsque les paramètres ferriques sont élevés, comme c'est envisageable pour la matriptase-2 et

l'hémojuvénine [85, 87], ou encore le taux de fer pourrait réguler la maturation de BMP6, avec un mécanisme similaire à l'activation de l'hepcidine par la furine [24, 68]. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour étudier ces hypothèses.

La surcharge en fer observée chez les souris *Bmp6*^{-/-} est significativement plus sévère que chez les souris *Hfe*^{-/-} et ressemble beaucoup à celle des souris *Hjv*^{-/-}, *Smad4*^{-/-} et *Hamp*^{-/-}. Ceci suggère que le gène humain *BMP6* pourrait être un gène candidat pour les individus atteints d'une hémochromatose juvénile qui n'est pas à due des mutations dans l'hémojuvénine ou l'hepcidine.

Notre étude montre également que les souris *Bmp6*^{-/-} augmentent leur synthèse d'hepcidine en réponse à l'inflammation comme les souris *Hjv*^{-/-} alors que les souris *Smad4*^{-/-} en sont incapables. Ceci suggère que la voie du fer et la voie de l'inflammation, bien que distinctes au départ, convergent vers une voie dépendante de Smad4 pour induire l'expression de l'hepcidine. Alors que de nombreux travaux suggèrent que la réponse à l'inflammation utilise la voie des BMP/Smad [115, 118, 150], nos résultats montrent que ni BMP6, ni HJV ni aucun autre ligand de la famille des BMPs ne sont impliqués dans cette régulation. Il est possible que le TGF- β joue un rôle majeur dans l'activation de la voie car l'inhibition du TGF- β semble diminuer l'induction de l'hepcidine. D'autres travaux sont donc nécessaires pour vérifier ces résultats.

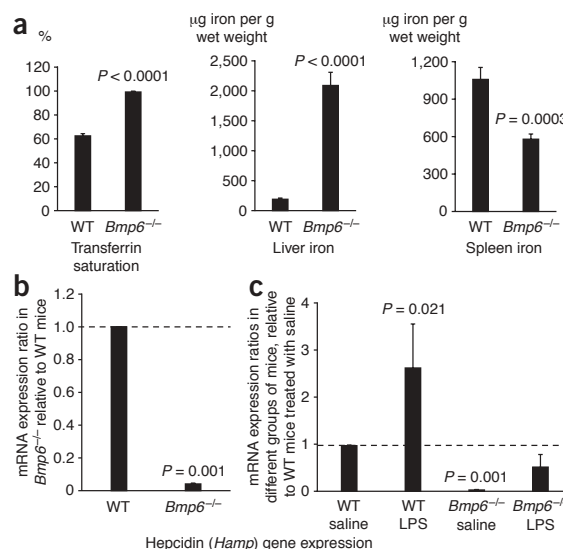
Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload

Delphine Meynard^{1,2,4}, Léon Kautz^{1,2,4}, Valérie Darnaud^{1,2}, François Canonne-Hergaux³,
Hélène Coppin^{1,2} & Marie-Paule Roth^{1,2}

Expression of hepcidin, a key regulator of intestinal iron absorption, can be induced *in vitro* by several bone morphogenetic proteins (BMPs), including BMP2, BMP4 and BMP9 (refs. 1,2). However, in contrast to BMP6, expression of other BMPs is not regulated at the mRNA level by iron *in vivo*³, and their relevance to iron homeostasis is unclear. We show here that targeted disruption of *Bmp6* in mice causes a rapid and massive accumulation of iron in the liver, the acinar cells of the exocrine pancreas, the heart and the renal convoluted tubules. Despite their severe iron overload, the livers of *Bmp6*-deficient mice have low levels of phosphorylated Smad1, Smad5 and Smad8, and these Smads are not significantly translocated to the nucleus. In addition, hepcidin synthesis is markedly reduced. This indicates that *Bmp6* is critical for iron homeostasis and that it is functionally nonredundant with other members of the *Bmp* subfamily. Notably, *Bmp6*-deficient mice retain their capacity to induce hepcidin in response to inflammation. The iron burden in *Bmp6* mutant mice is significantly greater than that in mice deficient in the gene associated with classical hemochromatosis (*Hfe*), suggesting that mutations in *BMP6* might cause iron overload in humans with severe juvenile hemochromatosis for which the genetic basis has not yet been characterized.

Figure 1 Effect of *Bmp6* deficiency on serum transferrin saturation, hepatic and splenic iron concentrations, hepcidin gene expression and hepcidin response to LPS treatment in mice. (a) Transferrin saturation (%) and non-heme tissue iron content ($\mu\text{g per g wet weight}$) were compared in wild-type (WT) and *Bmp6*-deficient mice (*Bmp6*^{-/-}) at 7 weeks of age. Means of six samples \pm s.e.m. are shown. Student's *t*-tests were performed on log-transformed values of tissue iron concentrations. (b) Expression ratio (and s.e.m. values) of *Hamp* transcripts in *Bmp6*^{-/-} mice relative to wild-type controls (six mice per group) and normalized to the reference-gene (*Gusb*, encoding β -glucuronidase) mRNA was calculated using REST. Statistical significance was determined using randomization tests. (c) Expression ratios (and s.e.m. values) of *Hamp* transcripts in WT mice treated with LPS, *Bmp6*^{-/-} mice treated with 0.9% NaCl and *Bmp6*^{-/-} mice treated with LPS, relative to WT mice treated with saline and normalized to *Gusb* mRNA, were calculated as in b.

Hepcidin, a key regulator of iron absorption, binds to the cellular iron exporter ferroportin and induces its endocytosis and proteolysis, preventing release of iron from macrophages or intestinal cells into the plasma⁴. In genetic hemochromatosis, sustained deficiency of hepcidin⁵⁻⁸ causes excessive iron absorption from the diet and leads to the deposition of iron in the liver and other tissues, with consequent organ damage and functional failure. Hepcidin expression is controlled by the BMP signaling pathway^{1,9}. The signal is initiated when BMP ligands bind and activate receptor serine-threonine kinases at the hepatocyte cell surface. The resulting receptor complex propagates the signal through phosphorylation of cytoplasmic effectors, the receptor-regulated Smad1, Smad5 and Smad8. Once phosphorylated, the Smad proteins 1, 5 and 8 form heteromeric complexes with the common mediator Smad4 and translocate to the nucleus, where they modulate transcription of target genes¹⁰. Although many BMP ligands, including BMP2, BMP4 and BMP9, can positively regulate hepcidin expression *in vitro*^{2,9,11}, it is not yet known how BMP signaling is modulated in



¹Inserm, U563, Toulouse, F-31300, France. ²Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan and Institut Biomédical de Toulouse, Toulouse, F-31300, France. ³Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, F-91198, Gif-sur-Yvette, France. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.-P.R. (marie-paule.roth@inserm.fr).

Received 25 September 2008; accepted 6 January 2009; published online 1 March 2009; doi:10.1038/ng.320

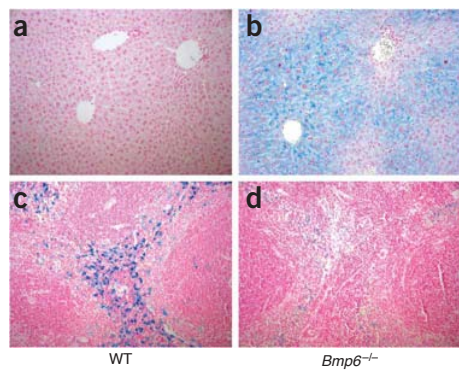


Figure 2 Histological examination of iron loading. Tissue iron was detected by staining with Perls Prussian blue (blue stain). (a) Wild-type liver. (b) *Bmp6*^{-/-} liver. (c) Wild-type spleen. (d) *Bmp6*^{-/-} spleen. Original magnification, $\times 200$.

response to body iron status or which BMPs are the endogenous regulators of hepcidin expression and iron homeostasis *in vivo*.

A functional genomic study in mice fed either an iron-enriched or an iron-deficient diet allowed us to determine that, in contrast to that of other *Bmp* genes, *Bmp6* mRNA expression was regulated by iron similarly to *Hamp* (hepcidin) mRNA expression, and suggested that *Bmp6* has a preponderant role in the activation of the Smad signaling pathway leading to hepcidin synthesis *in vivo*³. Notably, *Bmp6* is expressed in hepatocytes, and its abundance, as detected by immunohistochemistry, strongly increases in wild-type mice fed an iron-enriched diet (data not shown). We therefore suspected that iron homeostasis would be disturbed in a strain of *Bmp6*-deficient mice derived ten years ago¹². In contrast to mice deficient for other *Bmp* molecules, these mice are viable and fertile. Although *Bmp6* mutant embryos show a delay in ossification, strictly confined to the developing sternum, newborn and adult *Bmp6* mutants have skeletal elements indistinguishable from those of wild-type mice, implying that *Bmp6* is not required for normal skeletal development.

In agreement with our expectations, we found that targeted disruption of *Bmp6* results in massive iron overload. At 7 weeks of age, serum transferrin saturations in *Bmp6*^{-/-} mice were close to 100%. The mice also had 11-fold more non-heme liver iron than had wild-type mice, whereas their splenic non-heme iron content was lower than that in wild-type controls (Fig. 1). We further examined the sites of iron accumulation by staining histological sections for iron. In *Bmp6*^{-/-} mice at 7 weeks of age, there was considerable iron accumulation in liver parenchymal cells (hepatocytes) but minimal iron staining in splenic macrophages. Hepatocellular iron deposition was extending from periportal to centrilobular hepatocytes, following blood flow in the liver (Fig. 2). Iron accumulation was also observed in acinar cells of the exocrine pancreas, in the heart (see **Supplementary Fig. 1** online) and in the renal convoluted tubules.

By 7 weeks of age, *Bmp6*^{-/-} mice have accumulated significantly more iron than 12-week-old mice of different genetic backgrounds deficient for the classical hemochromatosis gene *Hfe* (M.P. Roth, unpublished data). Targeted disruption of the mouse *Bmp6* gene thus results in a severe iron-loading phenotype similar to that of mice deficient for *Hfe2* (also known as *Hjv*), which encodes hemojuvelin^{13,14}, for *Smad4* (ref. 11), or for *Hamp*¹⁵, and to that of humans with juvenile hemochromatosis¹⁶. We conclude that *Bmp6* is critical in the control of iron homeostasis. We next examined liver mRNA expression of hepcidin and other genes previously shown to be

regulated by iron similarly to hepcidin. We found that *Bmp6*^{-/-} mice had approximately 22-fold less hepatic *Hamp* mRNA than wild-type controls (Fig. 1). Notably, expression of other genes known (*Id1*, *Smad7*) or suspected (*Atoh8*) to be targets of the BMP-Smad signaling pathway³ was markedly reduced in the liver of *Bmp6*^{-/-} mice (see **Supplementary Fig. 2** online).

Because *Bmp6* transmits signal through phosphorylation of Smad1, Smad5 and Smad8, we compared the relative abundance of phosphorylated forms of these three Smads in liver extracts of *Bmp6*^{-/-} and wild-type mice by protein blot analysis. As expected, phosphorylation of all three was significantly reduced in *Bmp6*^{-/-} mice (see **Supplementary Fig. 3** online). We then examined nuclear translocation of these three Smads by labeling liver tissue sections with an antibody that detects Smad1, Smad5 and Smad8 when phosphorylated at serines in the C-terminal domain. In *Bmp6*^{-/-} mice, immunostaining of phospho-Smad1/5/8 was weak and distributed evenly in cytoplasm and nucleus, confirming that levels of phosphorylation of these Smads were insignificant and explaining why *Hamp* mRNA levels are markedly reduced in these mice. In contrast, phospho-Smad1/5/8 staining was observed in the hepatocyte nuclei of wild-type mice fed a diet with normal iron content and was strongly induced in those of wild-type animals fed an iron-enriched diet for 1 week to induce iron overload (Fig. 3).

The marked iron accumulation in *Bmp6*-deficient mice led us to evaluate the expression of genes involved in duodenal iron absorption by real-time quantitative PCR. Transcript levels of the genes encoding the brush-border surface ferric reductase *Dcytb* (*Cybrd1*) and the apical transmembrane iron transporter *Dmt1* (*Slc11a2*) were elevated about 14.6- and 13.8-fold, respectively, whereas that of the gene encoding the basolateral membrane transporter ferroportin (*Slc40a1*) was increased about 2.2-fold (see **Supplementary Fig. 4** online). This increase may be induced by the smaller amount of stainable iron present in proximal duodenal enterocytes in *Bmp6*^{-/-} mice compared with wild-type controls (data not shown). The induction of *Dmt1* in

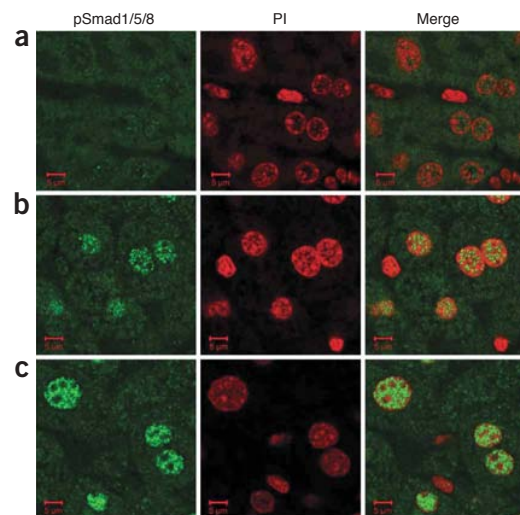


Figure 3 Lack of significant phospho-Smad1/5/8 staining in the hepatocyte nuclei of *Bmp6*-deficient mice. Shown are liver sections stained with anti-phospho-Smad1/5/8 antibody (pSmad1/5/8) and a green-fluorescent Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. Nuclei were stained with propidium iodide (PI). (a) *Bmp6*^{-/-} mice fed a diet with normal iron content. (b) Wild-type mice fed a diet with normal iron content. (c) Wild-type mice fed an iron-enriched diet.

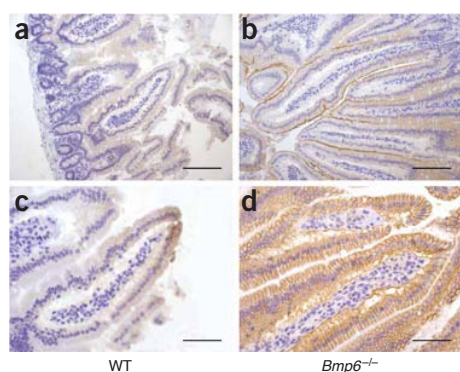


Figure 4 Increased Dmt1 and ferroportin expression in the proximal duodenum of *Bmp6*-deficient mice. (a,b) DMT1 expression was detected by immunohistochemistry in wild-type (a) and *Bmp6*^{-/-} mice (b). *Bmp6*^{-/-} mice have intense staining along the brush border. (c,d) Ferroportin expression was detected by immunohistochemistry in wild-type (c) and *Bmp6*^{-/-} mice (d). In mutant animals, staining is expressed intensely along the basolateral membrane of the enterocytes of the distal two-thirds of the villus. Scale bars: 20 μm in a,b; 10 μm in c,d.

the duodenum was confirmed by immunohistochemistry: weak staining of Dmt1 protein was detectable in wild-type controls, but *Bmp6*^{-/-} mice had intense staining along the brush border (Fig. 4). We also examined ferroportin expression by immunohistochemistry, focusing on tissues in which ferroportin is known to be important. Whereas ferroportin is normally expressed at low levels in the absorptive enterocytes lining the intestinal villi, in *Bmp6*^{-/-} mice we observed a massive increase in ferroportin protein expressed at the basolateral membrane (Fig. 4). Similarly, ferroportin expression was markedly enhanced in tissue macrophages of the livers and spleens of *Bmp6*^{-/-} mice compared with those of wild-type controls (see **Supplementary Fig. 5** online). This is consistent with a lack of hepcidin expression in these mice, leading to stabilization of ferroportin at the membrane of enterocytes and tissue macrophages.

We next investigated the possible role of *Bmp6* in the induction of hepcidin by inflammation. Hepcidin is part of the type II acute-phase response and is thought to have a crucial role in anemia of chronic disease. Whereas hepcidin is induced by activation of the inflammatory pathway in *Hfe2*-deficient mice¹⁴, this induction is not observed in mice with liver-specific *Smad4* deficiency¹¹. We therefore set out to determine whether lipopolysaccharide (LPS)-dependent induction of hepcidin requires *Bmp6* by treating *Bmp6* mutant mice and wild-type controls with LPS or saline solution. As expected, the acute-phase genes *Il6*, *Tnf* and *Crp* were strongly induced in LPS-treated mice as compared with saline-treated animals (see **Supplementary Figs. 6** and **7** online). *Hamp* gene expression was induced about 24-fold in response to the LPS treatment in *Bmp6*^{-/-} mice and 2.6-fold in wild-type controls (Fig. 1). Notably, *Hamp* mRNA levels in LPS-injected *Bmp6*^{-/-} animals did not reach those of wild-type controls. These findings suggest that the total level of *Hamp* mRNA observed upon inflammation is additive to the baseline level and argue for the existence of two independent pathways that lead to the regulation of hepcidin expression. Of these two pathways, only the iron-sensing pathway requires functional *Bmp6* and hemojuvelin¹⁴. It is not clear yet how LPS activates hepcidin production in *Bmp6*-deficient mice, although there is evidence supporting a role for BMP-transforming growth factor β (TGF-β) signaling. Indeed, transcriptional activation of hepcidin by interleukin-6 (IL-6) is abrogated in mice with

liver-specific conditional knockout of *Smad4* (ref. 11), and chemical inhibition of BMP signal transduction in a human hepatoma cell line blocks the induction of hepcidin expression not only by BMPs but also by IL-6 (ref. 17). Furthermore, a BMP-responsive element in the *Hamp* promoter is required to control hepatic expression in response to IL-6 (ref. 18). Further work is needed to identify which TGF-β-BMP superfamily ligands, other than BMP6, function as endogenous activators of hepcidin expression during inflammation.

BMP molecules were initially identified by their capacity to induce endochondral bone formation. However, mild and/or extremely localized skeletal defects are observed in mice deficient for *Bmp1*, *Bmp2*, *Bmp4* and *Bmp7*, which contrasts strongly with the profound and specific effects seen on gut, heart, neural tube or kidney morphogenesis. The physiological actions of BMPs in soft tissues thus appear more important than their actions in the skeleton^{19,20}. *Bmp6*^{-/-} mice are notable for their lack of skeletal defects but, curiously, no effect of *Bmp6* deficiency on other tissues or organs has been reported so far. Our data show a previously unsuspected but essential role of *Bmp6* in the maintenance of iron homeostasis. Although other *Bmp* molecules are functional in the severely iron-overloaded *Bmp6*-deficient mice, they do not compensate for the absence of *Bmp6*, demonstrating that this iron-regulatory function is unique to *Bmp6* among the BMP family. Future studies designed to establish how iron regulates *Bmp6* expression will be useful to fully understand regulation of hepcidin synthesis by iron. The iron burden in *Bmp6* mutant mice is significantly more severe than that in *Hfe*-deficient mice and closely resembles that seen in *Hfe2*-, *Hamp*- or *Smad4*-deficient mice. This suggests that the human *BMP6* gene could be a candidate locus in people with severe juvenile hemochromatosis not attributable to hemojuvelin or hepcidin. Individuals with mutations in *HFE*, in the gene encoding transferrin receptor 2 (*TFR2*) and in *HFE2* have low hepcidin^{5,6,21} and are consequently unable to effectively repress iron absorption. Although the mechanisms by which transferrin receptor 2 and HFE regulate hepcidin remain enigmatic, hemojuvelin has been shown to be a cell surface BMP co-receptor and to augment signal transduction through this pathway⁹. Notably, although soluble hemojuvelin inhibits induction of hepcidin by several BMP ligands *in vitro*, careful examination of the data shows that this inhibition is far more efficient for BMP6 (ref. 1). These results suggest that hemojuvelin is a co-receptor for BMP6 *in vivo* and that BMP6 and hemojuvelin act coordinately to induce hepcidin expression.

METHODS

Mice. *Bmp6*-null mice (*Bmp6*^{m1Rob}) were derived as previously described¹² and maintained on a background derived from the same stock (outbred CD1) as wild-type controls. The targeted allele was confirmed to encode a loss-of-function mutation. We checked that insertion of the neomycin-resistance selection marker in exon 2 of *Bmp6* had not caused deficiency of *Txndc5*, a gene adjacent to *Bmp6*, in the liver of these mice (data not shown). All experiments were performed on males. Unless otherwise specified, mice received a diet with normal iron content (200 mg iron per kg body weight; SAFE) and were analyzed at 7 weeks and fasted for 14 h before they were killed. Experimental iron overload was obtained by feeding wild-type controls an iron-enriched diet (8.5 g per kg). Experimental protocols were approved by the Midi-Pyrénées Animal Ethics Committee.

LPS injection. LPS (1 μg per g body weight; serotype 055:B5; Sigma) or an equivalent volume of saline solution (0.9% NaCl) was injected intraperitoneally, and organs (liver and spleen) were isolated 6 h after injection.

Tissue iron staining and quantitative tissue iron measurement. Intestine, liver, spleen, heart, pancreas and kidney samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Deparaffinized tissue sections were stained with the Perls Prussian blue stain for non-heme iron and counterstained with nuclear fast red. Quantitative measurement of non-heme iron in the liver and

the spleen was performed as described previously²². Results are reported as μg of iron per g wet weight of tissue.

Immunohistochemistry. Four-micrometer sections of paraffin-embedded tissues were mounted on glass slides. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating specimens with Peroxidase Block (DakoCytomation EnVision+ System-HRP, Dako). Sections were blocked in PBS containing 1% BSA and 10% FCS (Invitrogen) and incubated for 1 h at 20 °C with primary antibody to DMT1 (anti-DMT1; ref. 23) or for 1 h 30 min at 37 °C with primary anti-ferroportin²⁴ diluted in PBS/1% BSA. Immunohistochemical staining was performed using the DakoCytomation EnVision+ System-HRP according to the manufacturer's instructions. Sections were counterstained with hematoxylin.

Immunofluorescence. Nonspecific fluorescence due to endogenous avidin and biotin was blocked by the Avidin Biotin Blocking Solution (Lab Vision). After permeabilization with 0.3% Triton X-100 in PBS/5% BSA, liver tissue sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody to phosphorylated Smad1, Smad5 and Smad8 (polyclonal anti-phospho-Smad1/5/8; 1/100; Cell Signaling Technology). Staining was obtained using the secondary Alexa Fluor 488–goat anti-rabbit (1/200; Invitrogen), and slides were mounted in Vectashield mounting medium containing propidium iodide (Clinisciences) to counterstain DNA. Cells were visualized using a Zeiss LSM 510 confocal fluorescent microscope with an $\times 63$ oil-immersion objective.

RNA preparation and real-time quantitative PCR. Liver, spleen and duodenum samples were dissected for RNA isolation, rapidly frozen and stored in liquid nitrogen. Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen). All primers were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems) and are detailed in **Supplementary Table 1** online. Real-time quantitative PCR (Q-PCR) reactions were prepared with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche Diagnostics) as previously described²² and run in duplicate on a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics).

Protein blot analysis. Livers were homogenized in a FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals Europe) for 20 s at 4 m s⁻¹. The lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8, 1% NP-40) included inhibitors of proteases (1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ leupeptin, 10 mg ml⁻¹ pepstatin A and 1 mg ml⁻¹ antipain) and of phosphatases (10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ phosphatase inhibitor cocktail 2, Sigma-Aldrich). Proteins were quantified using the Bio-Rad Protein Assay kit based on the Bradford method. Protein extracts (30 μg for phospho-Smad1/5/8 and 60 μg for Smad5) were diluted in Laemmli buffer (Sigma-Aldrich), incubated for 5 min at 95 °C and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences), incubated with rabbit polyclonal anti-phospho-Smad1/5/8 (1/500, Cell Signaling Technology) or a goat polyclonal anti-Smad5 (1/200, Santa Cruz Biotechnology) and a mouse monoclonal anti- β -actin (1/20,000, Sigma-Aldrich) at 4 °C overnight and washed with PBS/0.1% Tween-20 buffer. After incubation with infrared IRDye 800 anti-rabbit or anti-goat and secondary IRDye 680 goat anti-mouse (1/15,000, LI-COR Biosciences), membranes were scanned on the Odyssey Infrared Imaging System. Band sizing was performed using the Odyssey 3.0 software (LI-COR Biosciences), and quantification of phospho-Smad1/5/8 activity and of Smad5 was calculated by normalizing the specific probe band to β -actin.

Statistical analyses. Log-transformed values of liver and spleen iron contents were compared by Student's *t*-tests. The relative expression ratios (and s.e.m. values) for liver, spleen and/or duodenum transcripts between *Bmp6*^{-/-} mice and wild-type controls or LPS- and saline-treated animals were calculated using the relative expression software tool (REST, <http://rest.gene-quantification.info>)²⁵. The mathematical model is based on the mean crossing point (Cp) deviation between sample and control groups of target genes, normalized by the mean Cp deviation of the reference gene *Gusb* (encoding β -glucuronidase)²⁶. An efficiency correction was performed and randomization tests, which have the advantage of making no distributional assumptions about the data, were used to determine statistical significance.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank E. Robertson (Dunn School of Pathology, University of Oxford) for kindly providing the *Bmp6*-deficient mice, C. Rouanet for excellent technical assistance, J. Seumois and M. Calise (Service de Zootechnie, IFR30, Toulouse) for their help with the mouse breeding, and S. Allart (Cellular Imaging platform, IFR30), F. Capilla and T. Al Saati (Experimental Histopathology platform, IFR30) for skilled advice. This work was supported in part by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, programme IRONGENES), the European Commission (LSHM-CT-2006-037296: EUROIRON1) and the Fondation pour la Recherche Médicale (to L.K.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.M., L.K. and V.D. performed phenotype assessment, analyzed data and reviewed the paper; F.C.-H. provided antibodies and technical advice; H.C. and M.-P.R. conceived the project and wrote the manuscript. The last two senior authors contributed equally to the work.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Babitt, J.L. *et al.* Modulation of bone morphogenetic protein signaling *in vivo* regulates systemic iron balance. *J. Clin. Invest.* **117**, 1933–1939 (2007).
- Truksa, J., Peng, H., Lee, P. & Beutler, E. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10289–10293 (2006).
- Kautz, L. *et al.* Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood* **112**, 1503–1509 (2008).
- Nemeth, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093 (2004).
- Nemeth, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T. & Camaschella, C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* **105**, 1803–1806 (2005).
- Papanikolaou, G. *et al.* Mutations in *HFE2* cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* **36**, 77–82 (2004).
- Piperno, A. *et al.* Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood* **110**, 4096–4100 (2007).
- Roetto, A. *et al.* Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* **33**, 21–22 (2003).
- Babitt, J.L. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* **38**, 531–539 (2006).
- Shi, Y. & Massague, J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
- Wang, R.H. *et al.* A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **2**, 399–409 (2005).
- Solloway, M.J. *et al.* Mice lacking *Bmp6* function. *Dev. Genet.* **22**, 321–339 (1998).
- Huang, F.W., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Fleming, M.D. & Andrews, N.C. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J. Clin. Invest.* **115**, 2187–2191 (2005).
- Niederkofler, V., Salie, R. & Arber, S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J. Clin. Invest.* **115**, 2180–2186 (2005).
- Lesbordes-Brion, J.C. *et al.* Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood* **108**, 1402–1405 (2006).
- Cox, T.M. & Halsall, D.J. Hemochromatosis—neonatal and young subjects. *Blood Cells Mol. Dis.* **29**, 411–417 (2002).
- Yu, P.B. *et al.* Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 33–41 (2008).
- Verga Falzacappa, M.V., Casanovas, G., Hentze, M.W. & Muckenthaler, M.U. A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells. *J. Mol. Med.* **86**, 531–540 (2008).
- Ducy, P. & Karsenty, G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* **57**, 2207–2214 (2000).
- Gazzerro, E. & Canalis, E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **7**, 51–65 (2006).
- Bridle, K.R. *et al.* Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* **361**, 669–673 (2003).
- Dupic, F. *et al.* Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology* **122**, 745–751 (2002).
- Canonne-Hergaux, F. *et al.* Expression of the DMT1 (NRAMP2/DCT1) iron transporter in mice with genetic iron overload disorders. *Blood* **97**, 1138–1140 (2001).
- Delaby, C., Pilard, N., Goncalves, A.S., Beaumont, C. & Canonne-Hergaux, F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood* **106**, 3979–3984 (2005).
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e36 (2002).
- Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).

Article 3

BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression

Léon Kautz, Delphine Meynard, Céline Besson-Fournier, Valérie Darnaud, Talal Al Saati, Hélène Coppin and Marie-Paule Roth. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2515-20. Epub 2009 Jul 21.

I. Introduction

La fonction d'HFE, la molécule impliquée dans la forme la plus courante d'hémochromatose [152] n'est pas résolue et parallèlement à la caractérisation de la souris *Bmp6*^{-/-}, nous nous sommes demandé si HFE intervenait dans la cascade de signalisation Bmp6/Smad et à quel niveau. Plusieurs hypothèses étaient envisageables : HFE pouvait intervenir soit en amont de la voie en modulant la transcription de *Bmp6*, soit en modulant la phosphorylation (et donc la transmission du signal par les récepteurs BMP) ainsi que la quantité des complexes coSmad/Smad 4 transloqués.

Diverses études basées sur des délétions tissu-spécifique d'*Hfe* donnent des indices sur les sites de régulation possible. L'inactivation de *Hfe* ciblée dans l'intestin [171] ou le macrophage [172] semble sans conséquences. A l'inverse, les souris invalidées pour le gène *Hfe* spécifiquement dans les hépatocytes présentent une hyperabsorption du fer alimentaire et une augmentation du fer sérique, de la saturation de la transferrine et de la quantité de fer dans le foie [172]. Les données de la littérature montrent que, *in vitro*, HFE forme des complexes protéiques avec le Récepteur I de la transferrine (TFR1) ainsi qu'avec son homologue dans le foie, le Récepteur II de la transferrine (TFR2) [209, 210, 213]. Des études récentes montrent que TFR1 séquestre la molécule HFE et la maintient inactive [210]. Lorsque la concentration en fer sérique devient élevée, la transferrine se lie à TFR1 et provoque la libération d'HFE qui va alors interagir avec TFR2 pour réguler l'expression de l'hepcidine [213]. Néanmoins, il reste à déterminer comment le complexe HFE/TFR2 médie cette régulation et si celle-ci passe par l'intermédiaire de la voie des BMPs. Pour répondre à cette question, nous avons étudié si l'absence de HFE influait sur l'expression des différents acteurs de la voie des BMPs que sont BMP6 et les Smad1/5/8.

II. Résultats

1. L'invalidation de *Hfe* agit-elle sur l'expression de BMP6 ?

Pour mémoire, dans le premier article, nous avons comparé des souris sauvages nourries avec une alimentation soit équilibrée soit surchargée en fer afin d'étudier la réponse à la surcharge martiale *in vivo*. La quantité de fer était augmentée dans le foie de ces souris surchargées parallèlement à l'expression de *Bmp6*, de la phosphorylation des Smad1/5 et 8 et de l'expression du messager de l'hépcidine. Dans le but d'éclaircir le rôle de HFE nous avons comparé des souris *Hfe*^{-/-} avec des souris sauvages âgées de 7 semaines sous fonds génétiques C57BL/6 (B6) et DBA/2 (D2). Les souris *Hfe*^{-/-} développent naturellement une surcharge en fer intra-hépatique mais cette surcharge est plus sévère chez les souris D2 que chez les souris B6 [162].

Comme nous l'avons observé chez des souris avec une surcharge en fer intrahépatique induite par l'alimentation, l'expression hépatique de *Bmp6* est significativement augmentée chez les souris *Hfe*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Ce sont les souris ayant la surcharge intra-hépatique en fer la plus importante (B6 surchargée et D2 *Hfe*^{-/-}) qui présentent la plus forte augmentation de *Bmp6*. L'expression de *Bmp6* est modulée en réponse au fer chez les souris *Hfe*^{-/-} et donc indépendante d'*Hfe*.

Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine BMP6 sur des coupes de foie. L'intensité du marquage de BMP6 est plus forte chez les souris *Hfe*^{-/-} et les souris sauvages avec une surcharge en fer secondaire. De façon intéressante, la localisation de BMP6 est inverse de celle du fer : le fer se dépose dans la zone périportale alors que le marquage BMP6 est centrolobulaire. On retrouve également BMP6 à la membrane basolatérale des hépatocytes dans le foie des souris surchargées, comme cela a déjà été montré pour l'hémojuvénine et RTF2 [228]. Il s'agit de la première évidence *in vivo* que BMP6 et HJV sont localisés à la membrane de l'hépatocytes. Or HFE est également associé avec RTF2 à la membrane de l'hépatocytes [209, 213] ce qui suggère que HFE et RTF2 pourrait être impliqués dans le complexe BMP6-HJV-BMPR.

2. L'invalidation de *Hfe* agit-elle sur la phosphorylation des molécules Smad1/5/8?

Le signal de Bmp6 est transmis *via* la phosphorylation des Smads et pour quantifier ce signal nous avons évalué par western blot la quantité de formes phosphorylées des Smad1/5 et 8 dans le foie de trois groupes de souris B6 et D2:

- Des souris sauvages nourries avec une alimentation équilibrée en fer comme contrôles.
- Des souris *Hfe*^{-/-} nourries avec une alimentation équilibrée en fer.
- Des souris sauvages avec une surcharge en fer secondaire induite par l'alimentation.

Contrairement aux souris sauvages avec une surcharge en fer secondaire, la phosphorylation des Smad1/5/8 n'est pas augmentée chez les souris *Hfe*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Les souris *Hfe*^{-/-} sont donc incapables de répondre à l'augmentation de BMP6 induite par la surcharge en fer intrahépatique. Pour vérifier que le déficit de phosphorylation corrélait bien avec un déficit d'activation de la voie BMP/Smad, nous avons quantifié le niveau de messenger *Id1* dans le foie de ces souris. En effet, *Id1* est une cible directe de la voie des BMPs [229] si bien que l'induction de son expression témoigne de l'activation de la cascade de signalisation. Malgré l'augmentation de Bmp6 et contrairement aux souris sauvages nourries avec une alimentation surchargée, la transcription d'*Id1* n'est pas activée dans le foie des souris *Hfe*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent qu'en l'absence d'*Hfe*, le signal d'activation de la voie des BMP/Smad est biaisé quelque part entre BMP6 et la phosphorylation des Smads.

3. Pourquoi y a-t-il une surcharge intrahépatique chez les souris *Hfe*^{-/-} âgées de 7 semaines alors que la quantité d'hepcidine est proche de la normale ?

Cette observation est paradoxale. Comment expliquer l'installation d'une surcharge en fer intrahépatique chez des souris *Hfe*^{-/-} de 7 semaines qui sont pratiquement identiques aux souris sauvages en ce qui concerne le niveau de phosphorylation des molécules Smads1/5/8 et le niveau d'expression de l'hepcidine.

Nous avons émis l'hypothèse que la surcharge observée à 7 semaines chez les souris *Hfe*^{-/-} est la résultante d'un déficit en hepcidine antérieur dans la vie de la souris. Pour le vérifier, nous avons mesuré le contenu en fer intrahépatique et l'expression des gènes

Bmp6 et *Hamp* dans le foie de souris *Hfe*^{-/-} et de souris sauvages à l'âge de 3 semaines. Malheureusement, le passage du lait maternel à une alimentation relativement riche en fer après le sevrage est associé à une augmentation très rapide de la saturation de la transferrine et de l'expression de *Hamp*. Par conséquent, il est très difficile de comparer des souris de portées différentes et d'obtenir des résultats reproductibles sans connaître précisément le jour de naissance et le jour de sevrage. Pour éviter ce problème, nous avons utilisé des croisements F1 (sauvages x *Hfe*^{-/-}) pour sélectionner des souris F2 *Hfe*^{-/-} et sauvages issues d'une même portée.

A l'âge de 3 semaines, les souris *Hfe*^{-/-} n'ont pas encore développé de surcharge en fer et l'expression de *Bmp6* est similaire aux souris sauvages. Par contre, on observe que l'expression de *Hamp* est réduite d'un facteur 8 et celle d'*Id1* d'un facteur 2 par rapport aux témoins. La voie de signalisation des BMPs n'est pas activée suffisamment et par conséquent l'hepcidine est plus faiblement exprimée que la normale. Ceci provoque une absorption du fer dans le duodénum supérieure aux besoins réels de l'organisme. Le fer s'accumule progressivement dans le foie des souris *Hfe*^{-/-}. Lorsque la surcharge atteint un certain seuil, variable selon le fond génétique de la souris, la transcription de *Bmp6* est activée et permet d'augmenter la synthèse d'hepcidine. L'absence d'*Hfe* explique probablement pourquoi la réponse est biaisée par rapport aux souris sauvages avec une surcharge en fer secondaire puisque les souris *Hfe*^{-/-} avec une surcharge intrahépatique, atteignent seulement le niveau d'hepcidine observé chez les souris sauvages nourries avec une alimentation équilibrée en fer.

En revanche, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence par western blot de différence de niveau de phosphorylation des Smad1/5/8 entre les souris sauvages et *Hfe*^{-/-} à l'âge de 3 semaines. Nous avons déjà rencontré des difficultés pour mettre en évidence des différences de phosphorylation entre les souris sauvages carencées en fer et les souris sauvages avec une alimentation normale [230] (voir article 1). Nous avons observé que les diminutions de phosphorylation des Smad1/5/8 sont toujours moins faciles à détecter que les variations d'expression d'*Id1* et parfois même de *Hamp*. Compte-tenu du fait que l'on n'observe à l'âge de 3 semaines qu'une diminution de deux fois de l'expression d'*Id1* chez les souris *Hfe*^{-/-} par rapport aux souris sauvages, il se peut que les variations de phosphorylation des Smad1/5/8 soient trop faibles chez ces souris pour être visualisées par western blot.

III. Discussion

Ces résultats mettent en évidence l'implication d'HFE dans la voie de signalisation BMP6/Smad. Bien que HFE ne soit pas indispensable pour l'induction de BMP6 en réponse au fer, HFE est nécessaire à une transduction efficace du signal initié par BMP6. Nous montrons par immunohistochimie que BMP6 se localise à la membrane basolatérale de l'hépatocyte, comme cela a déjà été décrit pour l'hémojuvéline et le récepteur 2 de la transferrine [228]. Si l'on se base sur ces résultats ainsi que ce qui est retrouvé dans la littérature, nous proposons l'hypothèse suivante.

Dans des conditions physiologiques normales, lorsque la concentration en fer sérique augmente, HFE forme un complexe avec TFR2 [210, 213]. HFE, TFR2, HJV, BMP6 et ses récepteurs pourraient donc former à la membrane de l'hépatocytes un complexe de signalisation du fer. Ce complexe assurerait une transduction efficace du signal qui induirait la phosphorylation des Smads1/5/8 et l'expression de l'hepcidine. Ce processus ne requiert pas d'augmentation du niveau de messagers *Bmp6*.

Lorsque l'on induit une surcharge en fer secondaire chez des souris nourries avec une alimentation riche en fer, le mécanisme est différent. Le fer s'accumule progressivement dans les hépatocytes et stimule la transcription de *Bmp6* ce qui, en présence de molécules HFE fonctionnelles, conduit à une forte augmentation de la phosphorylation des Smads et de l'expression du messenger de l'hepcidine.

Enfin, quand HFE n'est pas fonctionnel, les souris *Hfe*^{-/-} développent une surcharge en fer hépatique mais sont capables d'augmenter *Bmp6*. Cependant, elles augmentent seulement partiellement le niveau de Smads phosphorylés. On peut donc imaginer que l'absence d'*Hfe* contrarie la formation complète du complexe membranaire empêchant ces souris de répondre aussi efficacement à la stimulation par BMP6 que les souris sauvages.

Une fois n'est pas coutume, notre équipe américaine favorite publiait au même moment des travaux similaires où ils montraient que l'expression de *Bmp6* était augmentée chez les souris *Hfe*^{-/-} par rapport aux souris sauvages sous fond génétique sv129 [231]. Bien que l'expression de l'hepcidine soit réduite de deux fois chez ces souris, ils n'observaient pas non plus de variations de la phosphorylation des Smad1/5/8 mais seulement une légère diminution de l'expression d'*Id1*. Ces souris ont ensuite été soumises à des régimes avec des apports variables en fer et les auteurs ont montré que l'expression de *Bmp6* était corrélée au contenu en fer dans le foie indépendamment de HFE.

En résumé, nos résultats montrent que le rôle d'HFE n'est pas limité à un rôle de senseur du fer par compétition avec la transferrine pour la liaison à son récepteur. HFE est nécessaire pour une transduction efficace du signal initié par BMP6. Une fois dissocié de TFR1, HFE pourrait participer au complexe moléculaire formé par les récepteurs des BMPs. D'autres travaux sont encore nécessaires pour éclaircir les interactions impliquées dans ce mécanisme.

BMP/Smad signaling is not enhanced in *Hfe*-deficient mice despite increased *Bmp6* expression

Léon Kautz,^{1,2} Delphine Meynard,^{1,2} Céline Besson-Fournier,^{1,2} Valérie Darnaud,^{1,2} Talal Al Saati,^{1,2} *Hélène Coppin,^{1,2} and *Marie-Paule Roth^{1,2}

¹Inserm, U563, Toulouse; and ²Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan and Institut Biomédical de Toulouse, Toulouse, France

Impaired regulation of hepcidin expression in response to iron loading appears to be the pathogenic mechanism for hereditary hemochromatosis. Iron normally induces expression of the BMP6 ligand, which, in turn, activates the BMP/Smad signaling cascade directing hepcidin expression. The molecular function of the HFE protein, involved in the most common form of hereditary hemochromatosis, is still unknown. We have used *Hfe*-deficient mice of different genetic

backgrounds to test whether HFE has a role in the signaling cascade induced by BMP6. At 7 weeks of age, these mice have accumulated iron in their liver and have increased *Bmp6* mRNA and protein. However, in contrast to mice with secondary iron overload, levels of phosphorylated Smads 1/5/8 and of *Id1* mRNA, both indicators of BMP signaling, are not significantly higher in the liver of these mice than in wild-type livers. As a consequence, hepcidin mRNA levels in *Hfe*-

deficient mice are similar or marginally reduced, compared with 7-week-old wild-type mice. The inappropriately low levels of *Id1* and hepcidin mRNA observed at weaning further suggest that *Hfe* deficiency triggers iron overload by impairing hepatic Bmp/Smad signaling. HFE therefore appears to facilitate signal transduction induced by the BMP6 ligand. (Blood. 2009;114:2515-2520)

Introduction

Hereditary hemochromatosis (HH) is a genetic disorder characterized by increased absorption of iron from the gastrointestinal tract. Progressive accumulation of catalytically active iron in parenchymal tissues may lead to severe organ damage such as hepatic fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. HH is efficiently treated by phlebotomy. In Northern Europe, most patients with HH are homozygous for a single mutation (C282Y) in the HFE gene encoding a nonclassical major histocompatibility complex class I molecule.¹ This mutation disrupts a disulfide bond required for proper folding of the HFE molecule. Shortly after its discovery in 1996, the HFE protein was shown to physically interact with transferrin receptor 1 (TFR1) and impair the uptake of transferrin-bound iron in cells.²⁻⁴ However, these observations did not shed much light on how HFE controls systemic iron homeostasis.

In untreated patients with HH resulting from mutations in the HFE gene, ferritin is high but hepcidin is inappropriately low relative to body iron burden.⁵ Hepcidin, a small peptide secreted by the liver, has a key role in coordinating the use and storage of iron with iron acquisition.⁶ It acts by binding to ferroportin, an iron exporter present on the surface of enterocytes and macrophages, and induces its internalization and lysosomal degradation.⁷ The loss of ferroportin from the cell surface prevents iron efflux from intestinal enterocytes and recycling of iron from senescent erythrocytes by macrophages. Hepcidin expression is normally enhanced by dietary or parenteral iron loading,⁸ thus providing a feedback mechanism to limit intestinal iron absorption. Because this expected up-regulation of hepcidin in response to iron loading is

impaired in patients with HH, HFE is thought to be involved in the regulation of hepcidin expression.

The role of the BMP-SMAD signaling pathway in directing hepcidin expression is now well established.^{9,10} BMP6, whose mRNA expression is regulated by iron *in vivo*,¹¹ is critical to activate this signaling cascade.¹² Like other members of the transforming growth factor beta superfamily of ligands, BMP6 binds 2 type I and 2 type II BMP receptors (BMPRI and -II, respectively). This induces the phosphorylation of BMPRI by BMPRII and the activated complex, in turn, phosphorylates a subset of Smad proteins (Smads 1, 5, and 8). The receptor-activated Smads then form heteromeric complexes with the common mediator Smad4 and these translocate to the nucleus where they regulate the transcription of specific targets such as hepcidin.¹³ Hemojuvelin, a molecule involved in severe and early onset juvenile hemochromatosis, was shown to act as a BMP coreceptor⁹ and is as critical as BMP6 to hepcidin expression.^{14,15}

In contrast to hemojuvelin, the exact molecular function of HFE remains uncertain. Definite clues as to the site of HFE regulatory function in the context of systemic iron homeostasis were recently provided by experiments with genetically engineered mice bearing a targeted, tissue-specific disruption of *Hfe*. Whereas ablation of *Hfe* in the intestine¹⁶ or in macrophages¹⁷ did not affect body iron metabolism, mice lacking *Hfe* expression in hepatocytes exhibited hyperabsorption of dietary iron, increased serum iron, transferrin saturation, and iron deposition in the liver.¹⁷ Hepatocyte HFE is therefore necessary to prevent iron overload. HFE forms protein

Submitted February 22, 2009; accepted July 8, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 21, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-02-206771.

*H.C. and M.-P.R. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

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

© 2009 by The American Society of Hematology

complexes with transferrin receptor 1 (TFR1) and its liver-specific homolog, transferrin receptor 2 (TFR2).¹⁸ Results obtained with different TFR1 mutant mice suggest that TFR1 may normally sequester HFE and keep it inactive. When serum iron concentration is high, diferric transferrin and HFE compete for TFR1 binding. HFE then dissociates from TFR1,¹⁹ and Schmidt et al speculate that HFE released from TFR1 interacts with TFR2 to signal for production of hepcidin. Recently, the necessity of an interaction between HFE and TFR2 for signal transduction was clearly demonstrated.²⁰ This interaction depends upon the alpha3 domain of HFE. However, whether HFE when free of TFR1 has a role in the signaling cascade induced by the BMP6 ligand is still unknown.

Our group has derived *Hfe*-deficient mice on different genetic backgrounds.²¹ These mice provide a unique opportunity to explore how *Hfe* deficiency affects the Bmp6/Smad signaling pathway in vivo. We show that these mice have elevated liver iron content and increased Bmp6 mRNA and protein, but inappropriately low levels of phosphorylated Smads 1, 5, and 8 and of hepcidin mRNA. *Hfe* deficiency thus triggers iron overload by impairing hepatic Smad1/5/8 phosphorylation, suggesting that the efficacy of the BMP6 signaling pathway is reduced when HFE is missing.

Methods

Mice

Hfe-deficient mice on the C57BL/6 (B6) and DBA/2 (D2) backgrounds were derived as previously described.²² They were maintained at the IFR30 animal facility, as well as wild-type controls of the same genetic backgrounds. All experiments were performed on males. Unless otherwise specified, mice received a standard rodent diet (200 mg iron/kg body weight; SAFE) and were killed at 7 weeks. Experimental iron overload was obtained by feeding 4-week-old B6 and D2 wild-type mice the same diet supplemented with 8.3 g/kg carbonyl iron (Sigma-Aldrich) for 3 weeks. Three-week-old *Hfe*-deficient mice and litter-matched wild-type controls were obtained from B6D2F1 heterozygous (*Hfe*^{+/-}) parents. Experimental protocols were approved by the Midi-Pyrénées Animal Ethics Committee.

Tissue iron measurement

Quantitative measurement of hepatic nonheme iron was performed as described previously.²¹ Results are reported as micrograms of iron per gram dry weight of tissue.

RNA preparation and real-time quantitative PCR

Liver samples were dissected for RNA isolation, rapidly frozen, and stored in liquid nitrogen. Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Lipid Tissue kit (QIAGEN). All primers^{11,12} were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Real-time quantitative polymerase chain reactions (Q-PCRs) were prepared with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega) and LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche Diagnostics) and run in duplicate on a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics).

Immunohistochemistry

Four-micrometer sections of paraffin-embedded tissues were mounted on glass slides. Antigen retrieval was performed by incubating tissue sections with trypsin (1 mg/mL) for 8 minutes at 37°C. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating specimens with Dako REAL Peroxidase Blocking Solution (Dako). Tissue sections were then blocked with normal horse blocking serum (Vector Laboratories) and incubated for 1 hour at room temperature with the primary anti-BMP6 (N-19) antibody (1/100; Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS-1% BSA and 1% FCS. Immunohistochemical staining was performed using the ImmPRESS

Reagent (ImmPRESS Anti-Goat Ig peroxidase Kit; Vector Laboratories) according to the instructions of the manufacturer. Sections were counterstained with hematoxylin. Tissue sections from *Bmp6*-deficient mice were used to test antibody specificity.

Western blot analysis

Livers were homogenized in a FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals Europe) for 20 seconds at 4 m/s. The lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8, 1% NP-40) included inhibitors of proteases (1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 10 mg/mL pepstatin A, and 1 mg/mL antipain) and of phosphatases (10 µL/mL phosphatase inhibitor cocktail 2; Sigma-Aldrich). Proteins were quantified using the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories) based on the method of Bradford. Protein extracts (30 µg for phospho-Smad and 60 µg for Smad5) were diluted in Laemmli buffer (Sigma-Aldrich), incubated for 5 minutes at 95°C, and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences), incubated with a rabbit polyclonal antibody to phosphorylated Smad1/5/8 (1/500, lot 8; Cell Signaling Technology) or a goat polyclonal antibody to Smad5 (1/200; Santa Cruz Biotechnology) and a mouse monoclonal antibody to β-actin (1/20 000; Sigma-Aldrich) at 4°C overnight, and washed with PBS-0.1% Tween-20 buffer. After incubation with infrared IRDye 800 anti-rabbit or anti-goat and IRDye 680 anti-mouse secondary antibodies (1/15 000; LI-COR Biosciences), membranes were scanned on the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Band sizing was performed using the Odyssey 3.0 software (LI-COR Biosciences) and quantification of phosphorylated Smads and of Smad5 was calculated by normalizing the specific probe band to β-actin.

Statistical analyses

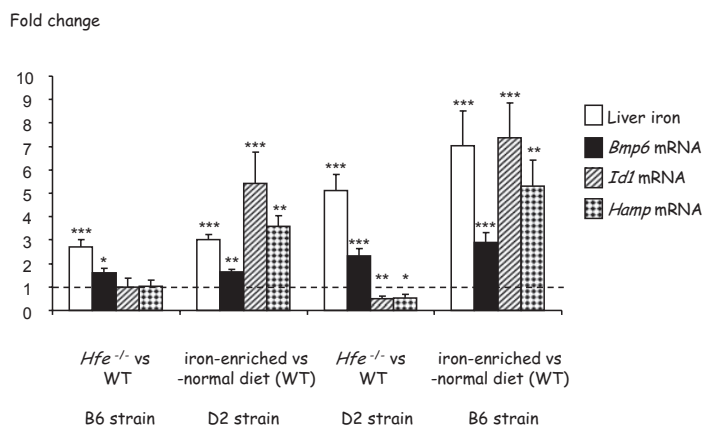
Log-transformed values of liver iron contents were compared by Student *t* tests. The relative expression ratios (and standard errors) of liver transcripts between *Hfe*^{-/-} mice and wild-type controls were calculated using the relative expression software tool (REST, <http://rest.gene-quantification.info>).²³ The mathematic model is based on the mean crossing point deviation between sample and control groups of target genes, normalized by the mean crossing point deviation of the reference gene *Hprt*.²⁴ An efficiency correction was performed and randomization tests, which have the advantage of making no distributional assumptions about the data, were used to determine statistical significance.

Results

Hfe deficiency promotes liver expression of Bmp6

As previously observed,^{11,21} whereas 7-week-old *Hfe*-deficient mice of the DBA/2 (D2) background have a higher liver iron burden than *Hfe*-deficient mice of the C57BL/6 (B6) strain, wild-type mice of the B6 background fed an iron-enriched diet for 3 weeks are reproducibly more heavily iron-loaded than wild-type D2 mice fed the same iron-rich diet (Figure 1). This may reflect differences in the genetic susceptibility to iron loading in the presence or absence of functional Hfe. Real-time quantitative PCR shows that expression of *Bmp6* is significantly up-regulated not only in the liver of wild-type mice with secondary iron overload but also in the liver of *Hfe*-deficient mice compared with that of wild-type controls (Figure 1). Noticeably, mice with the highest hepatic iron burden (B6 mice with secondary iron overload and *Hfe*-deficient D2 mice) have the highest induction of *Bmp6* relative to control animals. We thus examined liver expression and cellular localization of Bmp6 by immunohistochemistry, using an antibody raised against a peptide mapping within the internal region of

Figure 1. Effect of *Hfe* deficiency or secondary iron overload on hepatic iron concentrations and *Bmp6*, *Id1*, and *Hamp* gene expression in 7-week-old B6 and D2 mice. Fold change in nonheme tissue iron content and expression ratio (and SE) of *Bmp6*, *Id1*, and *Hamp* transcripts normalized to the reference gene mRNA (*Hprt*) in *Hfe*-deficient mice relative to wild-type controls and in wild-type mice fed an iron-rich diet for 3 weeks relative to wild-type mice fed a standard rodent diet (5-10 mice per group). Statistical significance was determined using randomization tests. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$. Data are provided for 2 genetic backgrounds, C57BL/6 (B6) and DBA/2 (D2). At 7 weeks of age, wild-type mice of the 2 backgrounds have similar levels of *Bmp6*, *Id1*, and *Hamp* transcripts (supplemental Figure 1, available on the Blood website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). However, *Hfe*-deficient mice of the D2 background have significantly more *Bmp6* mRNA than *Hfe*-deficient mice of the B6 background ($P = .001$). Wild-type B6 mice fed the iron-rich diet for 3 weeks also have significantly more *Bmp6* mRNA than wild-type D2 mice fed the same diet ($P = .001$). Absolute values (instead of fold changes) corresponding to the same data are provided in supplemental Figure 2.



BMP6. Enhanced *Bmp6* staining was observed in *Hfe*-deficient mice and in wild-type mice with secondary iron overload. Interestingly, the distribution of *Bmp6* in the liver is zonal and, unlike iron deposits that are periportal (Figure 2A), *Bmp6* staining is centrilobular (Figure 2B). This centrilobular layout of *Bmp6* is observed in both *Hfe*-deficient mice and wild-type mice with secondary iron overload. BMP6 expression was previously shown to be confined to nonparenchymal liver cells, namely hepatic stellate cells and Kupffer cells.²⁵ However, in iron-loaded livers, *Bmp6* is also found in the hepatocytes, noticeably at the basolateral membrane domain as previously reported for hemojuvelin and TFR2²⁶ (Figure 2C-D). This staining was not observed in *Bmp6*-deficient mice or with control goat IgG.

Smad1/5/8 phosphorylation is not increased in *Hfe*-deficient mice

Because *Bmp6* transmits signal through phosphorylation of Smads,²⁷ we tested whether phosphorylation of Smad1/5/8 was increased in liver extracts of *Hfe*^{-/-} mice. Total protein lysates from 3 groups of animals were obtained for the 2 strains B6 and D2: (1) wild-type

controls fed a standard rodent diet; (2) *Hfe*^{-/-} mice fed the same standard rodent diet; and (3) wild-type controls fed an iron-enriched diet to induce secondary iron overload. The amount of the phosphorylated forms of Smad1/5/8 in each group was determined by Western blot analysis. As shown in Figure 3, although the iron-enriched diet induced Smad1/5/8 phosphorylation in both strains, no significant increase in Smad1/5/8 phosphorylation was observed in 7-week-old B6 or D2 *Hfe*^{-/-} mice compared with wild-type controls. Therefore, *Hfe*^{-/-} mice do not appropriately respond to the increase in *Bmp6*. We also measured the levels of *Id1* mRNA in the liver of the different mice. *Id1* is a direct target gene for BMPs, and phosphorylated Smads 1 and 5 have been shown to regulate its transcription through direct binding to specific elements on its promoter.¹¹ Its up-regulation therefore is an indicator of activation of the Bmp signaling cascade. As seen in Figure 1, whereas *Id1* mRNA expression is very significantly up-regulated in the livers of mice with secondary iron overload, no such up-regulation is seen in the livers of *Hfe*-deficient mice, despite the increase in *Bmp6* liver expression.

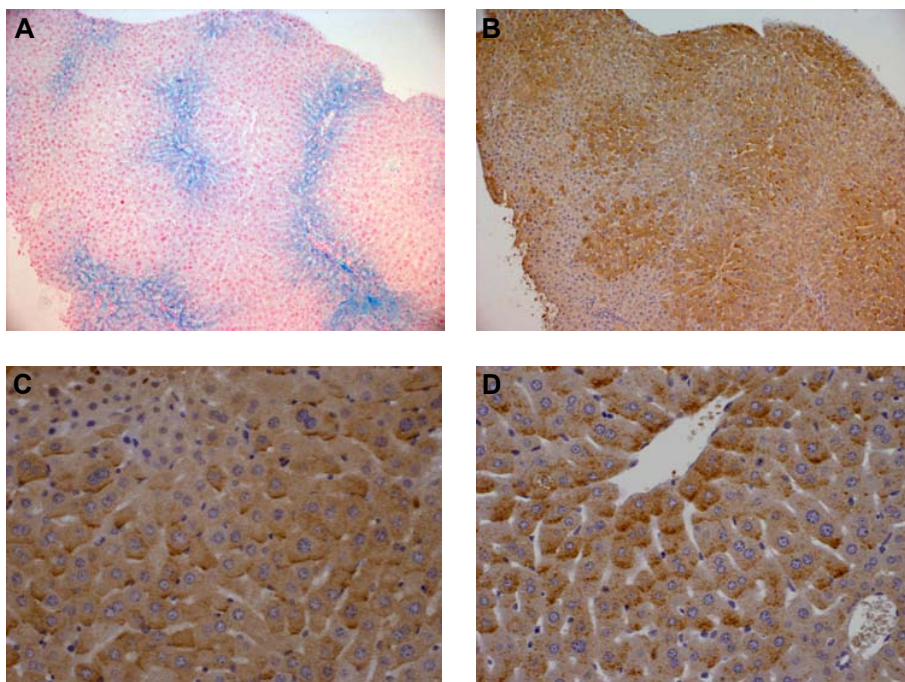


Figure 2. Cellular localization of BMP6 in hepatic iron overload. BMP6 expression was detected by immunohistochemistry in (B-C) wild-type B6 mice with secondary iron overload and (D) *Hfe*-deficient D2 mice. These mice have similar degrees of iron loading. As seen in serial liver sections, whereas iron deposits visualized by Perls staining (A) are predominantly periportal, BMP6 staining is mostly centrilobular (B). Mutant animals and mice with secondary iron overload have intense staining at the basolateral membrane domain of hepatocytes (C-D). Original magnification, $\times 100$ (A-B) or $\times 400$ (C-D). Images were captured using a Leica DMR microscope equipped with an HC PL Fluotar 10 \times /1 (A-B) or 40 \times /1 (C-D) numeric aperture objective lens and a Leica DFC 300 Fx camera. They were processed using Leica IM50 image acquisition software.

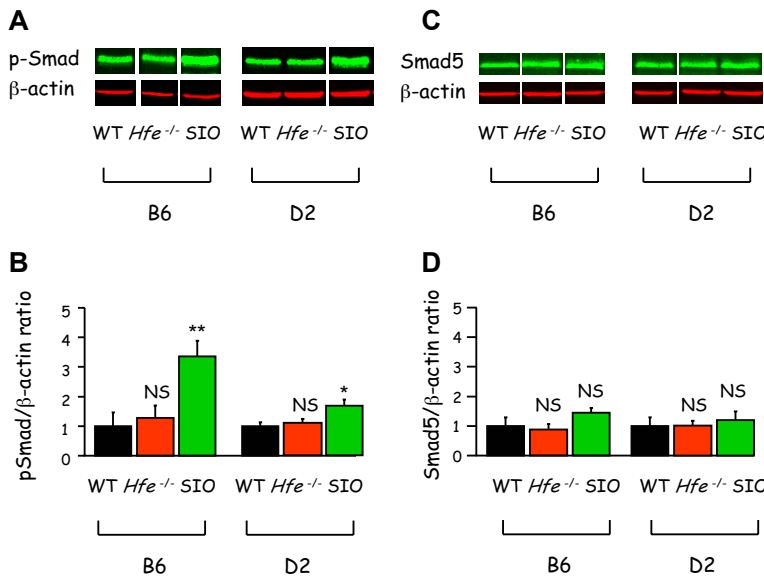


Figure 3. Smad1/5/8 phosphorylation is increased by secondary iron overload but unchanged by Hfe deficiency. (A) Liver lysates from wild-type controls fed a standard rodent diet (WT), *Hfe*-deficient mice (*Hfe*^{-/-}), and mice with secondary iron overload (SIO) were analyzed by Western blot with antibodies to phosphorylated Smad1/5/8 and to β-actin as loading control. Membranes were scanned on the Odyssey Infrared Imaging System. One representative experiment is shown for each strain. (B) Band sizing was performed using the Odyssey 3.0 software (LI-COR Biosciences) and quantification of phosphorylated Smads was calculated by normalizing the specific probe band to β-actin. Mean ratio (p-Smad/β-actin) of 3 *Hfe*-deficient mouse samples (or 3 mice with secondary iron overload) ± SE are represented on this figure, relative to the mean ratio of 3 wild-type mice fed a standard rodent diet. Student *t* tests were used to compare mean ratios between *Hfe*-deficient mice and wild-type controls (*P* = .55 for B6 mice; *P* = .58 for D2 mice) or between mice with secondary iron overload and wild-type mice (***P* = .01 for B6 mice; **P* = .02 for D2 mice). (C) Liver lysates from the same mice were analyzed by Western blot with antibodies to Smad5 and to β-actin as loading control. (D) Quantification using the Odyssey 3.0 software was performed as in panel B. Student *t* tests were used to compare mean Smad5/β-actin ratios. The levels of Smad5 were not significantly different between *Hfe*-deficient mice and wild-type controls (*P* = .59 for B6 mice; *P* = .59 for D2 mice), or between mice with secondary iron overload and wild-type controls (*P* = .15 for B6 mice; *P* = .31 for D2 mice).

Up-regulation of *Bmp6* is preceded by a marked down-regulation of hepcidin expression

Because phosphorylation of Smad proteins 1/5/8 was not significantly different between 7-week-old *Hfe*-deficient mice and wild-type controls, we expected that hepcidin transcription would also be similar in the 2 groups of animals. Indeed, as shown in Figure 1, we found that *Hamp* mRNA levels in *Hfe*^{-/-} mice of the B6 genetic background were equivalent to those in wild-type mice, and only slightly reduced in *Hfe*^{-/-} mice of the D2 background. The excessive iron burden observed in 7-week-old *Hfe*-deficient mice is difficult to reconcile with quasi-normal levels of hepcidin. This led us to hypothesize that iron overload in 7-week-old *Hfe*-deficient mice results from reduced hepcidin production earlier in life. To test this hypothesis, we quantified liver iron as well as *Bmp6* and *Hamp* mRNA levels in 3-week-old *Hfe*-deficient mice and wild-type controls. Weaning from a low-iron diet (milk) to the relatively high-iron diet provided by chow is associated with a rapid increase in transferrin saturation and in hepcidin expression within 1 week (data not shown). We suspected that this increase would be influenced by Hfe and therefore used *Hfe*-deficient mice and litter-matched controls to ensure that they were carefully matched for age. As seen in Figure 4, at 3 weeks of age, *Hfe*-deficient mice have liver iron content and *Bmp6* gene expression similar to wild-type animals. However, their *Hamp* gene expression is approximately 8-fold lower than in control mice. This indicates that down-regulation of hepcidin expression is the first biologic manifestation of *Hfe* deficiency and precedes liver iron

accumulation and increase in *Bmp6* expression. Interestingly, although we were unable to detect a statistically significant decrease in Smad1/5/8 phosphorylation by Western blot analysis (supplemental Figure 3), the levels of *Id1* mRNA, an indicator of activation of the BMP signaling cascade, are reduced by approximately 50% in these young *Hfe*-deficient mice compared with wild-type controls, further suggesting that *Bmp6* signaling is impaired by lack of functional Hfe. In wild-type mice fed an iron-enriched diet (data shown here and in Kautz et al¹¹) or an iron-deficient diet,¹¹ modulation of Smad1/5/8 phosphorylation is always less pronounced than modulation of *Id1* mRNA, which is itself often less pronounced than modulation of *Hamp* mRNA. Therefore, we cannot exclude an amplification of the response to *Bmp6* between Smad1/5/8 phosphorylation and the transcription of the specific targets. Given that there is only a 2-fold decrease in *Id1* mRNA expression in 3-week-old *Hfe*-deficient mice compared with wild-type mice (as seen in Figure 4), it is possible that modulation of Smad1/5/8 phosphorylation in these mice is too low to be visualized by Western blot analyses.

Discussion

Although the site of HFE regulatory function is the hepatocyte,¹⁷ the exact mechanisms by which HFE regulates iron homeostasis remain elusive. Our data suggest that lack of functional Hfe early in life severely impairs the *Bmp*/*Smad* signaling cascade, resulting in

Fold change (3 w.o. *Hfe*^{-/-} vs WT)

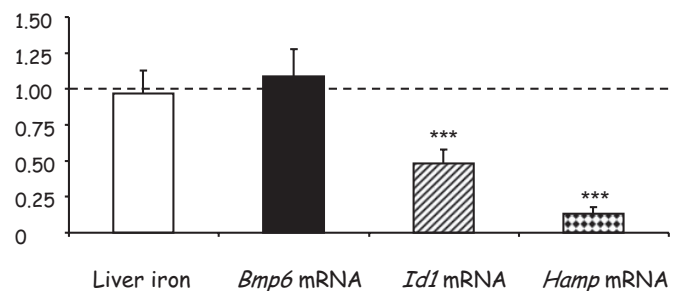


Figure 4. Effect of *Hfe* deficiency on hepatic iron concentrations and *Bmp6*, *Id1*, and *Hamp* gene expression in 3-week-old mice. Fold change in nonheme tissue iron content and expression ratio (and SE) of *Bmp6*, *Id1*, and *Hamp* transcripts normalized to the reference gene mRNA (*Hprt*) in 3-week-old *Hfe*-deficient mice relative to wild-type controls (8 mice per group). Statistical significance was determined using randomization tests. ****P* < .001. At 3 weeks of age, wild-type mice have levels of *Bmp6* and *Id1* mRNAs similar to 7-week-old mice. Although they have slightly less *Hamp* gene expression than 7-week-old mice, the difference is not statistically significant (supplemental Figure 4).

the down-regulation of hepcidin observed in 3-week-old mice in this and previously reported studies.^{28,29} As a consequence, there is no feedback mechanism to limit iron efflux from intestinal enterocytes. Between 3 and 7 weeks of age, *Hfe*-deficient mice progressively accumulate iron and, interestingly, retain their ability to increase *Bmp6* in response to body iron excess, as do mice with secondary iron overload or mice with genetic iron overload due to inactivation of the *Smad4* or the *Hamp* gene.¹¹ However, due to the lack of functional *Hfe*, the response to increased *Bmp6* expression is blunted compared with that of mice with secondary iron overload and, as shown in the present study, reaches only levels observed in wild-type controls fed a standard rodent diet. Given their iron burden, *Smad1/5/8* phosphorylation and *Id1* and hepcidin expression are all inappropriately low in 7-week-old *Hfe*-deficient mice. The age-related changes in *Bmp6* and *Hamp* expression observed here in *Hfe*-deficient mice explain why, several weeks after birth, intestinal iron absorption decreases and hepatic iron concentrations reach a plateau.³⁰ Of note, although *Hfe*-deficient D2 mice have higher *Bmp6* gene expression than *Hfe*-deficient B6 mice ($P = .001$), they have slightly less hepcidin mRNA. Genetically determined differences²² in the maturation, secretion, or inhibition of *Bmp6* between strains may affect the efficacy of signal transduction and explain these variations.

In hemochromatosis patients, iron absorption also declines as the iron load increases.³¹⁻³³ Furthermore, hepcidin concentrations in the sera of iron-loaded patients with HH resulting from mutations in the HFE gene are similar to controls,³⁴⁻³⁶ suggesting a disease time course similar to that observed in mice although more spread out over time. Interestingly, hepcidin concentrations are lower than controls in patients who have been iron depleted by phlebotomy treatment.³⁴⁻³⁶ As liver biopsies are no longer required for the diagnosis of HH, the relationship between liver iron content and *Bmp6* expression is difficult to assess in humans. However, it might be expected that BMP6 levels are high in untreated patients and that therapeutic venesections, by removing excess iron stores, restore these levels to those seen in controls, thus reducing the efficacy of signal transduction. The consequent decrease in hepcidin expression could then explain the reaccumulation of iron in the absence of maintenance phlebotomies. As already suggested in the literature,³⁵ clinical guidelines for the treatment of C282Y homozygotes should probably be revised and the currently recommended serum ferritin thresholds for therapeutic venesections corrected upward.

This is the first demonstration that lack of HFE impairs propagation of the signaling cascade induced by the BMP6 ligand and suggests that HFE and the BMP type I and II serine/threonine kinase receptors are associated at the hepatocyte cell membrane and that this association is required to ensure proper signal transduction. Hemojuvelin, TFR2,²⁶ and, as demonstrated here by immunohistochemistry, BMP6 all localize to the hepatocyte basolateral membrane domain, suggesting a functional interaction of these molecules in the context of iron metabolism regulation. HFE, TFR2, and other proteins such as BMP6, its receptors, and hemojuvelin would then form in this functional membrane domain

an iron signaling complex that induces hepcidin transcription via Smad proteins. Interestingly, there are previous reports of physical associations of major histocompatibility complex class I molecules to tetrameric membrane receptors such as the insulin receptor in mouse liver membranes.^{37,38}

In summary, our data demonstrate that the role of HFE is not solely limited to iron sensing by a mechanism involving a competition between HFE and diferric transferrin for TFR1 binding.¹⁹ Indeed, we showed that HFE is necessary for correct signal transduction from BMP6, suggesting that, when dissociated from TFR1, HFE participates in the BMPRI/II molecular complex. In the presence of HFE, basal levels of BMP6 are probably sufficient for physiologic modulation of hepcidin outside of massive iron overload. Indeed, wild-type D2 mice fed an iron-enriched diet for a short period have increased transferrin saturation and elevated hepcidin expression, but no increase in hepatic iron or in *Bmp6* mRNA expression (data not shown). Furthermore, at weaning from milk to the relatively high-iron diet provided by chow, wild-type mice have a rapid increase in transferrin saturation and in hepcidin expression, but again no increase in hepatic iron or in *Bmp6* mRNA expression (data not shown). Therefore, the ability to increase *Bmp6* expression seems restricted to animals with liver iron accumulation, whether due to *Hfe* deficiency or to an iron-enriched diet for several weeks. A greater amount of the *Bmp6* ligand then allows a more efficient propagation of the signaling cascade that clearly improves the status of *Hfe*-deficient animals and hopefully that of hemochromatosis patients. This may explain why a plateau in iron loading is reached over time and why hepcidin decreases after iron depletion in human patients.

Acknowledgments

The authors thank Julie Seumois and Maryline Calise (Service de Zootechnie, IFR30) for their help in the mouse breeding, and Sophie Allart (Cellular Imaging platform, IFR30) and Florence Capilla (Experimental Histopathology platform, IFR30) for skilled advice.

This work was supported in part by grants from the European Commission (LSHM-CT-2006-037296: EUROIRON1), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue contre le Cancer, and the Fondation pour la Recherche Médicale (L.K.).

Authorship

Contribution: L.K., D.M., C.B.-F., and V.D. performed research, analyzed data, and reviewed the paper; T.A.S. provided expert advice on immunohistochemistry; and H.C. and M.-P.R. conceived the project, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Marie-Paule Roth, Inserm U563, CHU Purpan, BP 3028, F-31024 Toulouse Cedex 3, France; e-mail: marie-paule.roth@inserm.fr.

References

- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996; 13(4):399-408.
- Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature*. 2000;403(6765):46-53.
- Feder JN, Penny DM, Irrinki A, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1472-1477.
- Lebrón JA, West AP Jr, Bjorkman PJ. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol*. 1999;294(1):239-245.
- Pantopoulos K. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J Gastroenterol*. 2008;14(45):6893-6901.
- Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):690-699.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin

- regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-2093.
8. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7811-7819.
 9. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006;38(5):531-539.
 10. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1933-1939.
 11. Kautz L, Meynard D, Monnier A, et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*. 2008;112(4):1503-1509.
 12. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*. 2009;41(4):478-481.
 13. Anderson GJ, Frazer DM. Iron metabolism meets signal transduction. *Nat Genet*. 2006;38(5):503-504.
 14. Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2180-2186.
 15. Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2187-2191.
 16. Vujic Spasic M, Kiss J, Herrmann T, et al. Physiologic systemic iron metabolism in mice deficient for duodenal Hfe. *Blood*. 2007;109(10):4511-4517.
 17. Vujic Spasic M, Kiss J, Herrmann T, et al. Hfe acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis. *Cell Metab*. 2008;7(2):173-178.
 18. Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*. 2006;281(39):28494-28498.
 19. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2008;7(3):205-214.
 20. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*. 2009;9(3):217-227.
 21. Dupic F, Fruchon S, Bensaïd M, et al. Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology*. 2002;122(3):745-751.
 22. Bensaïd M, Fruchon S, Mazeret C, Bahram S, Roth MP, Coppin H. Multigenic control of hepatic iron loading in a murine model of hemochromatosis. *Gastroenterology*. 2004;126(5):1400-1408.
 23. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* (<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/30/9/e36>). 2002;30(9):e36.
 24. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* (<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/29/9/e45>). 2001;29(9):e45.
 25. Knittel T, Fellmer P, Muller L, Ramadori G. Bone morphogenetic protein-6 is expressed in non-parenchymal liver cells and upregulated by transforming growth factor-beta 1. *Exp Cell Res*. 1997;232(2):263-269.
 26. Merle U, Theilig F, Fein E, et al. Localization of the iron-regulatory proteins hemojuvelin and transferrin receptor 2 to the basolateral membrane domain of hepatocytes. *Histochem Cell Biol*. 2007;127(2):221-226.
 27. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells: induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* (<http://www.biomedcentral.com/1471-2172/6/9>). 2005;6(1):9.
 28. Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, et al. Decreased liver hepcidin expression in the hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3):361-366.
 29. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;34(1):97-101.
 30. Ajioka RS, Levy JE, Andrews NC, Kushner JP. Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood*. 2002;100(4):1465-1469.
 31. Gurrin LC, Osborne NJ, Constantine CC, et al. The natural history of serum iron indices for HFE C282Y homozygosity associated with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 2008;135(6):1945-1952.
 32. McLaren GD, Nathanson MH, Jacobs A, Trevett D, Thomson W. Regulation of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med*. 1991;117(5):390-401.
 33. Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M, Birgens H, Nordestgaard BG. Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood*. 2004;103(8):2914-2919.
 34. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10):4292-4297.
 35. Piperno A, Girelli D, Nemeth E, et al. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood*. 2007;110(12):4096-4100.
 36. van Dijk BA, Laarakkers CM, Klaver SM, et al. Serum hepcidin levels are innately low in HFE-related hemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels. *Br J Haematol*. 2008;142(6):979-985.
 37. Due C, Simonsen M, Olsson L. The major histocompatibility complex class I heavy chain as a structural subunit of the human cell membrane insulin receptor: implications for the range of biological functions of histocompatibility antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(16):6007-6011.
 38. Fehlmann M, Peyron JF, Samson M, Van Obberghen E, Brandenburg D, Brossette N. Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(24):8634-8637.

DISCUSSION GENERALE

Nos travaux nous ont permis de mettre en exergue le rôle essentiel de BMP6 dans le maintien de l'homéostasie du fer. BMP6 est l'acteur principal de la voie des BMPs qui permet d'augmenter l'expression de l'hepcidine lorsque le fer est en excès dans l'organisme. Les autres BMPs, bien que fonctionnels, sont incapables de suppléer à l'absence de BMP6 [232]. L'expression de *Bmp6* qui est augmentée dans le foie des souris surchargées et diminuée dans le foie des souris carencées semble donc régulée directement par les stocks de fer de l'organisme [230].

La surcharge en fer observée chez les souris *Bmp6*^{-/-} est semblable à celle des souris *Hjv*^{-/-}, *Hamp*^{-/-} ou encore *Smad4*^{-/-} et significativement plus sévère que celle des souris *Hfe*^{-/-}. Ces observations suggèrent que, chez l'homme, le gène *BMP6* pourrait être un gène candidat pour les formes d'hémochromatose juvénile [58] qui ne sont pas attribuées à des mutations dans les gènes codants pour l'hémojuvéline [58] ou l'hepcidine [36].

Dans les formes d'hémochromatoses causées par la mutation C282Y dans le gène *HFE*, la sévérité de la maladie, notamment le niveau de la surcharge en fer intra-hépatique, est très variable entre les patients homozygotes C282Y en raison du patrimoine génétique différent entre individus. *BMP6* pourrait être un éventuel gène modificateur de l'hémochromatose liée à *HFE* qui serait impliqué dans l'expressivité de la maladie. Pour vérifier cette hypothèse, nous recherchons actuellement des mutations dans le gène *BMP6* chez des patients atteints d'hémochromatose juvénile et les patients C282Y avec les surcharges les plus sévères.

Mon travail de thèse a permis de lever le voile sur une partie de l'énigme que pose la régulation des besoins en fer de l'organisme mais, bien que le rôle de BMP6 ait été une étape significative dans le décryptage des mécanismes impliqués dans l'homéostasie martiale, plusieurs questions restent ouvertes.

I. BMP6 : un nouvel acteur de la voie de régulation de l'hépcidine

1. Quel est le signal qui régule l'expression de *Bmp6* en cas de surcharge martiale?

Jusqu'à présent, seules des évidences indirectes nous permettent de proposer une hypothèse. Lorsque des souris sauvages D2 sont soumises à un régime enrichi en fer sur une courte période (environ 7 jours), la saturation de la transferrine augmente mais ce laps de temps ne permet pas l'installation d'une surcharge en fer intrahépatique. Dans ce cas de figure, l'expression de *Bmp6* ne varie pas (données personnelles) mais on observe pourtant une augmentation de l'expression de l'hépcidine. Ces résultats suggèrent que ce n'est pas la saturation de la transferrine qui régule directement l'augmentation de l'expression de *Bmp6* mais plutôt le contenu en fer du foie. Il est donc possible d'envisager le mécanisme de régulation suivant.

En conditions physiologiques, HFE est associé à TFR1. Lorsque la saturation de la transferrine augmente, HFE est déplacé de TFR1 par l'holotransferrine et devient disponible pour interagir avec TFR2 et réguler l'expression de l'hépcidine [209, 210]. En présence d'un niveau de base de BMP6, HFE et TFR2 semblent suffisants pour réguler les besoins en fer de l'organisme par l'intermédiaire de l'hépcidine. Par contre, lorsque le fer intra-hépatique atteint un certain seuil, le niveau d'expression de *Bmp6* augmente proportionnellement à la surcharge chez des souris *Hfe*^{-/-} [231]. L'activation de la voie BMP6/Smad serait alors un mécanisme de survie pour contrebalancer l'installation d'une surcharge en fer intra-hépatique [230, 233].

2. BMP6 intervient-il dans l'intestin ?

Bien que nos travaux et ceux de plusieurs équipes désignent le foie comme le site principal de la régulation de l'entrée du fer dans l'organisme, une étude récente suggère que l'expression de BMP6 dans les cellules intestinales serait à l'origine de l'expression hépatique de l'hépcidine. Dans leur modèle, les auteurs observent une surcharge en fer plus tardive que celle observée chez nos souris *Bmp6*^{-/-}. De plus, dans le petit intestin, l'expression de *Bmp6* est augmentée en réponse au fer chez les souris sauvages et l'expression de *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp9* est augmentée chez les souris *Bmp6*^{-/-}. [234]. Ces derniers résultats sont contradictoires avec ce que nous obtenons dans nos différents

modèles de souris. En effet nous n'observons pas de variations de l'expression de *Bmp6*, *Bmp2* ou encore *Bmp4* dans le duodénum des souris B6 et D2 surchargées par l'alimentation (données personnelles non publiées) ni au niveau de l'ARN, ni pour BMP6, au niveau de la protéine. Par contre, contrairement aux résultats publiés par ces auteurs, nous observons par immunomarquage une nette augmentation de BMP6 dans les hépatocytes des souris *Hfe*^{-/-} ou des souris surchargées en fer par l'alimentation. Les auteurs attribuent ces contradictions aux différents fonds génétiques, 129Sv ou SWISS, des souris utilisées, ce qui semble peu probable étant donné l'ampleur des différences observées. D'autres travaux sont donc nécessaires pour expliquer ces contradictions.

3. Comment l'expression de *Bmp6* est-elle régulée ?

L'augmentation ou la diminution de l'expression de *Bmp6* est donc un événement primordial lorsque les stocks en fer deviennent trop élevés ou trop faibles. En effet, nous avons vu que l'expression de *Bmp6* est augmentée en situation de surcharge et diminuée en situation de carence [230]. Une question essentielle reste donc posée: comment est régulée la transcription du gène *Bmp6* et par quels mécanismes le fer agit-il sur cette régulation?

La structure du promoteur de *Bmp6* n'a malheureusement pas été étudiée de façon approfondie et nous ne pouvons proposer que des hypothèses pour expliquer la régulation de l'expression de *Bmp6* par le fer.

a) La méthylation du promoteur

La méthylation du promoteur d'un gène est un processus qui permet de bloquer la transcription rendant ainsi ce gène inactif. *Bmp6* fait partie des gènes dont l'expression peut être inhibée par la méthylation de son promoteur dans différentes pathologies [235]. En effet, il a été montré que la méthylation du promoteur de *BMP6* entraîne une suppression de l'expression du gène dans certains types de lymphomes [236]. Une autre étude sur les leucémies confirme que la méthylation de *BMP6* est corrélée avec une diminution de l'expression du message et de la protéine [237]. L'expression de *BMP6* est restaurée par un agent déméthylant (5-aza-2'-déoxycytidine), suggérant que la méthylation est réversible et associée à une inhibition de la transcription. Plus la méthylation des îlots CpG du promoteur *BMP6* est importante, plus l'expression du message décroît.

Si les phénomènes de méthylation ou de déméthylation peuvent jouer un rôle actif *in vivo* sur la régulation de la transcription, on peut supposer que le promoteur de *Bmp6*

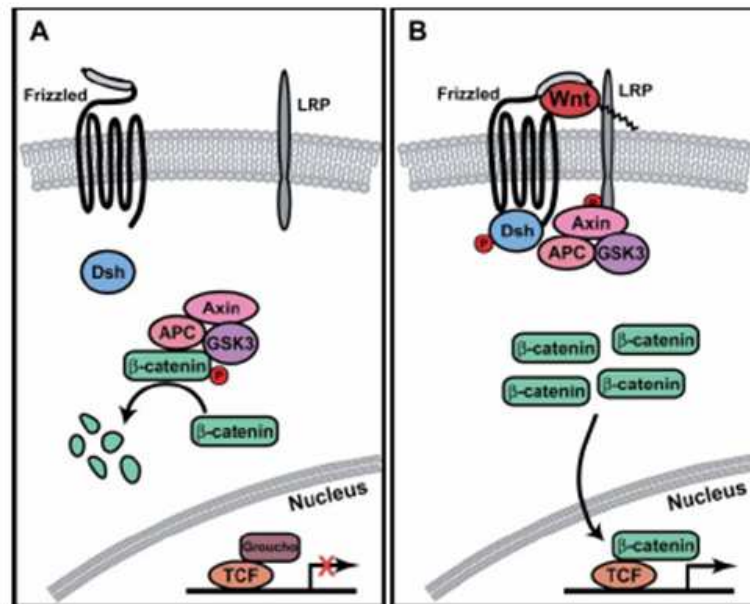


Figure 16 : Représentation de la voie classique des Wnt (d'après [239]):

A : en absence de ligand Wnt, la β -caténine est associée à un complexe formé par les protéine Axine, APC (« adenomatous polyposis coli ») et- GSK3 (« glycogene synthase kinase ») qui va entraîner la phosphorylation et la destruction de la β -caténine. Dans le même temps, l'expression des gènes cibles de la voie Wnt est réprimée par l'association des facteurs de transcription TCF (« T cell-specific transcription factor ») et Groucho.

B : Les ligands Wnt se fixent sur les récepteurs Frizzled et LRP (« low density lipoprotein receptor-related protein ») ce qui induit la phosphorylation de LRP et le recrutement de l'axine. La protéine Dsh (disheveled) est alors phosphorylée, le complexe Axine/APC/GSK3 est inhibé conduisant à l'accumulation de la β -caténine dans le cytosol. La β -caténine va alors transloquer dans le noyau, déplacer Groucho et interagir avec TCF pour activer la transcription de gènes cibles.

pourrait présenter un niveau de méthylation variable en fonction des besoins en fer. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps d'évaluer le niveau de méthylation du promoteur de *Bmp6* dans le foie de souris avec différents stocks de fer. Le promoteur devrait être méthylé en situation de carence et à l'inverse déméthylé lorsque le fer est présent en excès. Toutefois, cette hypothèse laisse toujours plusieurs questions sans réponse : quels sont les agents méthylants et déméthylants mis en jeu et comment sont-ils régulés par les besoins en fer de l'organisme ?

b) La voie Wnt

La voie Wnt pourrait éventuellement être un régulateur potentiel de l'expression de *BMP6*. En effet, il a été montré dans une étude sur le cancer de la prostate chez l'homme que l'expression de *BMP6* peut être induite par la voie Wnt et plus particulièrement par les ligands Wnt3a et Wnt5a [238].

Les protéines Wnt sont une famille de facteurs de croissance. Ce sont des glycoprotéines qui sont impliquées dans des activités très variées, aussi bien dans la régulation homéostatique que dans le développement. Les ligands Wnt se fixent sur un complexe de récepteurs ce qui conduit à la translocation de la β -caténine dans le noyau et à l'activation de la transcription de gènes cibles (Figure 16) [239]. Ces protéines permettent l'expression des BMPs et modulent leurs actions durant le développement embryonnaire [240]. Des travaux sur le cancer colorectal ont établi un lien entre la voie Wnt et le fer. Des mutations dans les gènes *APC* ou *β -caténine* provoquent une dérégulation de la voie Wnt et l'activation d'oncogènes. Lorsque les cellules mutées sont traitées avec du fer, on observe une activation de la voie Wnt et une augmentation de l'expression des messagers *cMyc* et *Nkd1*. [241]

De façon intéressante, *cMyc* activerait le promoteur de l'hepcidine [242], suggérant un lien entre la voie Wnt et l'hepcidine. Plusieurs études ont montré que *cMyc* peut également induire l'expression de *TFR1* et *IRP2* et réprimer l'expression de la ferritine, la protéine de stockage du fer [243-245]. Ce mécanisme permettrait d'augmenter l'assimilation de fer et de maintenir la stimulation de la voie Wnt.

Enfin, le processus de carcinogénèse du cancer colorectal serait associé à une augmentation de l'expression de l'hepcidine [246].

L'ensemble de ces données laisse à penser que le fer pourrait activer la voie Wnt afin d'augmenter l'expression de *BMP6* et, *in fine*, de l'hepcidine. Il serait intéressant de contrôler dans le foie de nos souris surchargées en fer si la voie Wnt est activée et si on observe une induction de l'expression de *Wnt3a* ou *Wnt5a*. On peut imaginer que la voie Wnt serait à l'origine de l'augmentation de l'expression de *Bmp6* en situation de surcharge et à une diminution en situation de carence.

Alternativement, la voie Wnt/ β -caténine pourrait conduire à une inhibition de la signalisation des BMPs car elle active aussi la transcription de *BAMBI* [247]. BAMBI est une protéine transmembranaire dont la structure est proche des récepteurs de type I des BMPs mais dépourvue du domaine intracellulaire kinase sérine/thréonine et qui fonctionne donc comme un antagoniste de la signalisation de la voie BMP/Smad en bloquant l'interaction BMP/BMPR [248]. Dans ce contexte, BAMBI serait impliquée dans un mécanisme de rétrocontrôle de la voie des BMPs. Toutefois, aucun lien n'a pour l'heure été établi entre BAMBI et le métabolisme du fer.

II. Comment la voie BMP/Smad agit-elle spécifiquement sur la régulation de l'hepcidine ?

La voie des BMPs dirige l'expression de l'hepcidine par l'intermédiaire des protéines Smad1/5/8 qui sont à l'origine de l'activation de la transcription de nombreux gènes cibles dans des processus biologiques variés [101]. On peut donc se demander quels sont les partenaires des Smads qui permettent d'activer spécifiquement l'expression de l'hepcidine en réponse au fer ?

1. Les partenaires des Smads lors de l'activation de la transcription

Le complexe Smad se fixe au promoteur sur des séquences de liaison des Smads SBE. Outre les coactivateurs CBP et p300 qui sont essentiels pour l'activation de la transcription, d'autres coactivateurs ou corépresseurs peuvent interagir avec le complexe et définissent le niveau de l'activation transcriptionnelle [99]. Le complexe Smad a une capacité de fixation à l'ADN limitée et interagit donc avec des facteurs de transcription qui augmentent l'affinité de liaison à l'ADN et confèrent la spécificité de l'activation, comme par exemple les facteurs de transcription de type bHLH. Il est donc indispensable d'identifier les facteurs de transcription qui coopèrent avec les Smads pour la fixation au promoteur de l'hepcidine. Plusieurs cas de figures sont envisageables :

- une activation de la transcription de l'hepcidine par des facteurs de transcription de type bHLH, activés directement par le fer ou par l'intermédiaire des Smads.
- le cas inverse où l'activation de la transcription serait réprimée par des facteurs de type HLH, des inhibiteurs de l'activité des bHLH. Ces facteurs seraient activés par un déficit en fer pour réprimer l'expression de l'hepcidine.
- des coactivateurs et corépresseurs qui seraient les partenaires indispensables à l'activité du complexe R-Smad et dont la transcription serait régulée par le fer [249, 250].

Atoh8, Id1 et Smad7 sont des candidats potentiels pour la régulation de la transcription de l'hepcidine.

2. Atoh8

Atoh8 est un facteur de transcription de type bHLH pour « basic helix loop helix » [251]. Ces facteurs bHLH se caractérisent par leur capacité de fixation à l'ADN sur des séquences consensus CANNTG appelées boîtes E (ou « E-boxes »). La modulation de l'expression d'Atoh8 en fonction du fer en fait un candidat potentiel pour l'activation spécifique de la transcription de l'hepcidine. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant Atoh8 que l'on retrouve aussi sous le nom de Math6 pour « mouse atonal homolog 6 ». Atoh8 est impliqué dans le développement du système nerveux, du rein [251, 252] ou encore le développement embryonnaire [253] mais aucun lien avec le métabolisme du fer n'avait été suspecté jusque là. Il a été montré que le promoteur de l'hepcidine contient plusieurs boîtes E capables de fixer des facteurs de transcription bHLH [242]. Des hétérodimères USF1/USF2 et cMyc/Max activeraient le promoteur de l'hepcidine par liaison directe sur ces séquences chez l'homme et la souris. On peut imaginer un mécanisme similaire où Atoh8, lié à un de ces facteurs et au complexe Smad se fixerait directement sur le promoteur de l'hepcidine pour activer sa transcription, spécifiquement en réponse au fer (figure 10 « introduction »).

D'autre part, la régulation de la transcription de *Atoh8* par le fer n'est pas connue. Comme le montre nos résultats, l'expression de *Atoh8* diminue dans le foie des souris *Smad4^{-/-}*. La régulation de l'expression intervient donc en aval de Smad4. Il serait ainsi intéressant de rechercher si le promoteur de *Atoh8* comporte des sites de fixation SBE ce qui permettrait une régulation directe par les Smads en réponse au fer.

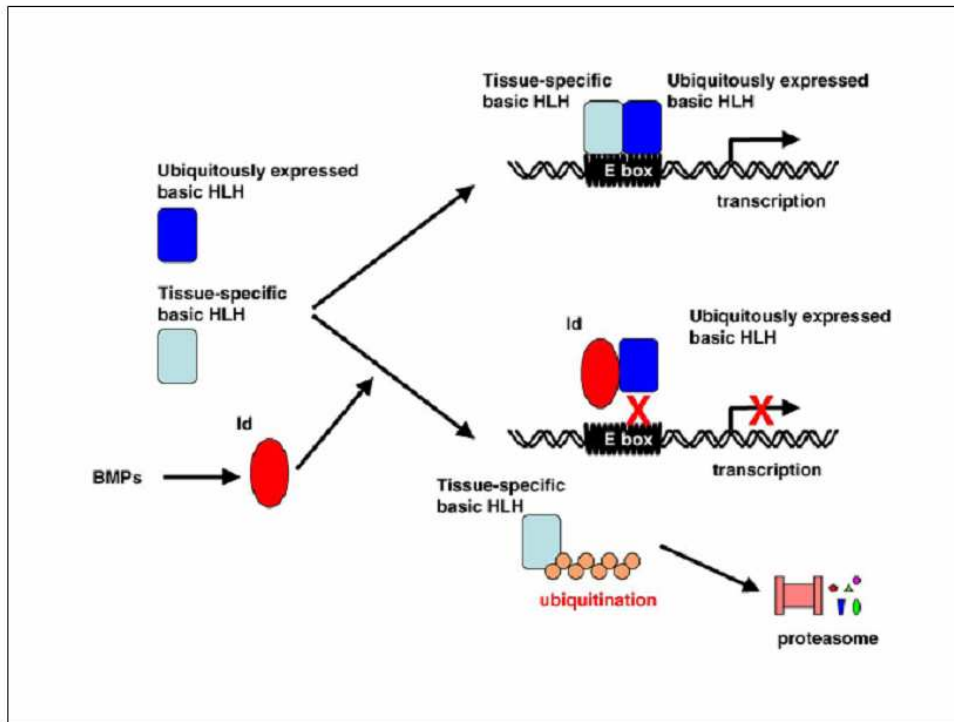


Figure 17 : Mécanismes d'activation et de répression de la transcription par les bHLH ou les HLH (d'après [250])

3. Id1

Id1 (pour « inhibitor of differentiation ») est connu pour être une cible directe de la voie des BMPs [249, 250]. Le promoteur d'*Id1* comporte des sites de fixation des Smads (SBE) ainsi que des séquences riches en GC qui permettent la fixation des Smads 1 et 5 et l'activation de la transcription en réponse à la stimulation par les BMPs [229]. De plus, il a été montré *in vitro* que l'induction de la phosphorylation par BMP6 est rapidement suivie d'une augmentation de l'expression de *Id1* [219]. ID1 est une protéine de la famille des HLH qui sont dépourvus du domaine basique de liaison à l'ADN (figure 17). ID1 forme des complexes hétérodimériques avec les molécules de la famille des bHLH et supprime leur capacité de fixation à l'ADN [254]. ID1 est donc un inhibiteur de la voie des BMPs. Lorsque la phosphorylation des Smads est activée, le complexe Smad1/5/8 se fixe sur les SBE du promoteur de *Id1* et active sa transcription de manière aspécifique. Il est donc peu probable que ID1 soit impliquée dans la régulation spécifique de la voie en réponse au fer.

4. Smad7

Smad7 pourrait également jouer un rôle dans cette régulation en tant que régulateur négatif de l'expression de l'hepcidine. L'expression de Smad7 est rapidement induite par la voie des BMPs [255] et Smad7 est connu pour inhiber la phosphorylation du complexe Smads en se fixant au récepteur de type I ou en recrutant Smurf 1 pour cibler le récepteur vers la voie du protéasome [256, 257]. De cette façon, Smad7 est impliquée dans des régulations de type rétro-contrôle comme cela a déjà été montré par exemple avec MyoD et la myostatine.

L'autorégulation de la myostatine, un facteur de croissance de la famille du TGF- β impliqué dans le développement du muscle, s'opère également par l'intermédiaire de Smad7. La myostatine induit la surexpression de *Smad7* qui va ensuite inhiber l'activité du promoteur myostatine [258].

La régulation de l'expression de la myostatine serait régulée par le facteur MyoD [259]. MyoD est un facteur de transcription de la famille des bHLH qui régule l'expression de gènes spécifiques du muscle et coopère avec Smad7. MyoD active la région proximale du promoteur de *Smad7* qui en retour interagit directement avec MyoD pour augmenter l'activité transcriptionnelle de *MyoD* [260].

On peut imaginer un mécanisme d'auto-régulation similaire avec *BMP6* où *Smad7* serait activé par la voie BMP6/Smad et régulerait en retour l'intensité du signal initié par BMP6. Cependant, de la même façon que pour *Id1*, l'expression de *Smad7* est activée avec la voie des Smads. *Smad7* est une cible directe de la voie des BMPs et fait partie des gènes précoces immédiats de la réponse aux BMPs [250]. Il est donc probable que *Smad7* ne soit guère impliqué dans la régulation de l'expression de l'hepcidine si ce n'est en tant que modérateur de l'intensité de la voie des BMPs.

III. Quels sont les rôles de HFE et TFR2 dans la régulation de l'expression de l'hepcidine ?

Encore récemment, il était admis que HFE et TFR2 agissaient de concert pour réguler l'expression de l'hepcidine. Nos résultats mettent en évidence que HFE est également un acteur de la voie de signalisation des BMPs puisque chez les souris *Hfe*^{-/-} la phosphorylation des Smads 1/5/8 est inférieure à celle attendue. On peut supposer que lorsque la concentration de la transferrine diférrique devient trop élevée, HFE se dissocie de TFR1 [210] et pourrait alors participer au complexe BMP6/HJV/BMPRI/II. Cette hypothèse soulève de nombreuses questions.

1. Quel serait le rôle de HFE dans la voie des BMPs ?

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les souris *Hfe*^{-/-} présentent des niveaux de phosphorylation des Smads1/5/8 insuffisants au regard de leur surcharge en fer et de l'expression élevée de *Bmp6* [231, 233]. HFE intervient donc dans la voie BMP6/Smad, en aval de BMP6, pour réguler l'expression de l'hepcidine et ceci en facilitant par un mécanisme encore inconnu la phosphorylation des Smad1/5/8 [233].

On peut remarquer que nos résultats vont à l'encontre d'une autre étude, effectuée *in vitro* dans des hépatocytes en culture et en utilisant BMP2, BMP4 ou BMP9 comme ligands, qui montre que l'expression de l'hepcidine n'est pas altérée en l'absence de *Hfe* ou de *Tfr2* [114]. Toutefois, les doses de BMPs utilisées pour stimuler l'expression de l'hepcidine n'ont rien de physiologique et l'on peut penser que l'overdose de BMP impose un biais non négligeable dans la sensibilité du système.

2. Les protéines HFE et TFR2 sont-elles associées pour réguler la voie des BMPs ?

Lorsque le fer sérique est élevé, TFR1 fixe l'holotransferrine et HFE libérée interagit avec TFR2 pour réguler l'expression de l'hepcidine [210, 213] suggérant que TFR2 serait associé à HFE lors de l'activation du complexe membranaire et la voie des BMPs. Plusieurs arguments sont en faveur de cette proposition. En effet, une association entre TFR2 et HJV est possible puisque l'hémojuvéline et TFR2 sont colocalisées à la membrane basolatérale de l'hépatocyte [228] et associées *in vivo* à la surface des cryptes duodénales ainsi que dans l'endosome précoce qui assure l'assimilation de l'holotransferrine *in vitro* [185].

Toutefois, l'implication de HFE et de TFR2 dans la voie des BMPs reste une question ouverte et il a notamment été suggéré que HFE et TFR2 réguleraient l'expression de l'hepcidine de manière indépendante.

3. Un modèle de souris double mutant *Hfe*^{-/-}/*Tfr2*^{-/-}

Des travaux récents ont étudié des souris invalidées à la fois pour *Hfe* et pour *Tfr2* [261]. Ces souris présentent une surcharge en fer plus sévère, une diminution de l'expression de l'hepcidine plus importante et des niveaux de phosphorylation des Smads sensiblement plus faibles que les souris invalidées uniquement pour *Hfe* ou *Tfr2*.

Les souris *Tfr2*^{-/-} ont un phénotype plus grave que les souris *Hfe*^{-/-}, ce qui suggère que HFE et TFR2 sont tous deux nécessaires à la voie de signalisation BMP6/Smad mais aussi que TFR2 joue un rôle plus important que HFE. Malheureusement, le niveau d'expression de *Bmp6* n'a pas été mesuré dans le foie de ces souris. Toutefois, des résultats rapportés au congrès IBIS à Porto par R. Fleming (communication personnelle) montrent que l'expression de *Bmp6* est augmentée chez les souris doublement invalidées ce qui indique que HFE et TFR2 agiraient en aval de BMP6.

La phosphorylation de Erk1/2 a également été étudiée. Elle est diminuée de manière significative chez les souris *Hfe*^{-/-} et *Tfr2*^{-/-} et encore plus chez le double mutant. Les auteurs concluent que *Hfe* et *Tfr2* agissent en parallèle dans des voies différentes pour réguler l'expression de l'hepcidine [261]. Des études *in vitro* montrent une induction de la phosphorylation de Erk1/2 et des Smad1/5/8 dans des cultures d'hépatocytes primaires traitées avec de l'holotransferrine [204]. La régulation de l'hepcidine impliquerait donc également la voie des MAP kinases pour la phosphorylation des Smads.

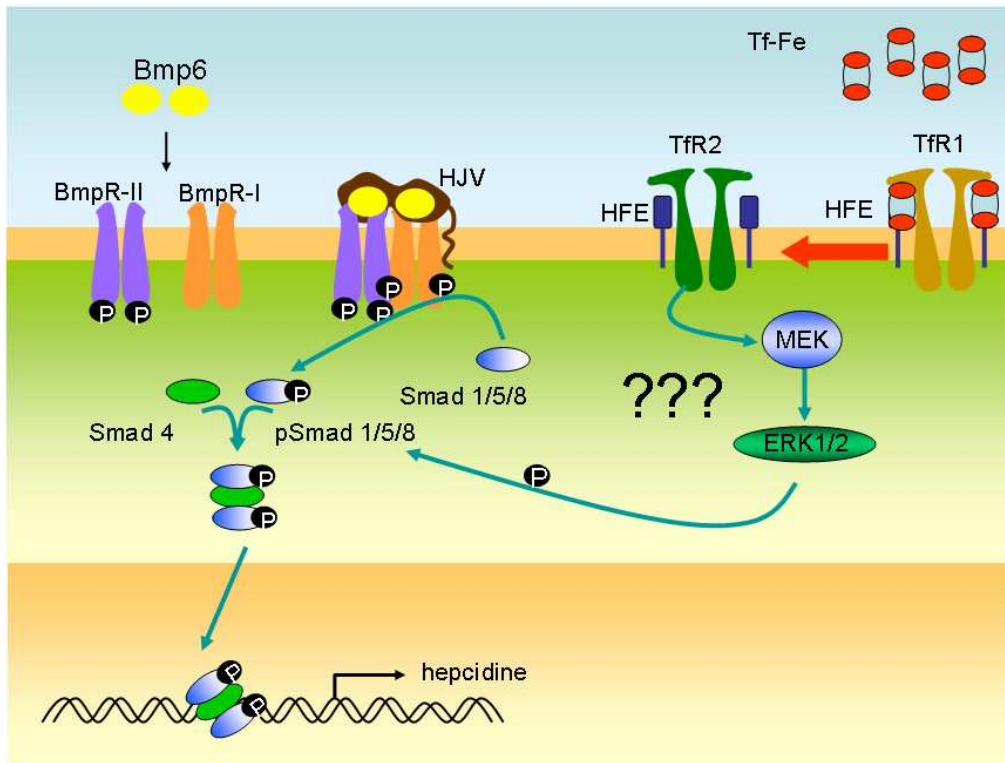


Figure 18 : Hypothèse de l'interaction entre HFE, TFR2, la voie des BMPs et des MAP kinases dans la régulation de l'expression de l'hepcidine

En effet, le lien entre TFR2 et Erk1/2 avait déjà été établi dans une autre étude qui montre que l'holotransferrine induit la phosphorylation de Erk1/2 *in vitro* et suggère que TFR2 régulerait l'expression de l'hepcidine par l'intermédiaire de la voie des MAP kinase [203]. De plus, il a été montré que BMP6 induit la phosphorylation de Smad1/5/8 et de Erk1/2 [262], ce qui pourrait expliquer la forte augmentation de l'expression de l'hepcidine dans le foie des souris sauvages surchargées.

En tenant compte de l'ensemble de ces données quelles hypothèses est-il possible d'envisager pour expliquer le lien entre la voie des BMPs, HFE, TFR2 et la voie des MAP kinase dans la régulation de l'expression de l'hepcidine et de l'homéostasie du fer ?

4. HFE, TFR2, les voies des BMPs et des MAP kinase et la régulation de l'hepcidine

Nous proposons un modèle dans lequel BMP6, HFE, TFR2 et Erk1/2 seraient tous nécessaires pour réguler l'homéostasie du fer et l'expression de l'hepcidine (figure18). En effet, il a été montré que la signalisation par les Smad2/3 induite par le TGF- β requiert un certain niveau d'activité de Erk pour obtenir une activation maximale [263]. La fixation du ligand TGF- β 1 induit la phosphorylation de la région C-terminal des R-Smads mais active également les MAP kinases et notamment Erk1/2 qui vont alors phosphoryler les R-Smads au niveau de la région linker [263]. Nous pouvons donc imaginer qu'en conditions physiologiques, nous avons d'un côté un niveau basal de BMP6 et de l'autre côté un complexe HFE/TFR2 activant Erk1/2 pour augmenter la phosphorylation des Smad1/5/8. Ces deux voies parallèles assureraient conjointement un niveau d'expression de l'hepcidine nécessaire à la régulation de l'homéostasie martiale. Lorsque la saturation de la transferrine augmente, le complexe HFE/TFR2 stimule Erk1/2 pour augmenter la phosphorylation des Smad1/5/8 et répondre aux besoins en hepcidine.

En l'absence de HFE ou de TFR2, cet équilibre est perturbé. Le complexe n'est plus capable d'assurer une stimulation suffisante de Erk1/2 en réponse à l'holotransferrine et l'expression de l'hepcidine devient insuffisante pour contrôler l'entrée du fer qui s'accumule progressivement. Une surcharge s'installe alors dans le foie ce qui constitue le signal d'augmentation de l'expression de *Bmp6*. BMP6 va activer la voie des BMPs pour augmenter le niveau de phosphorylation des Smad1/5/8 et l'expression de l'hepcidine afin de contrebalancer le manque de phosphorylation par Erk1/2. Toutefois, cette activation intervient quand le contenu en fer dans le foie dépasse un certain seuil. Dans ce cas, la surcharge en fer intra hépatique déjà installée ne disparaît pas mais elle se stabilise. Cette

hypothèse est en accord avec nos résultats. Dans le foie de nos souris *Hfe*^{-/-} âgées de 7 semaines, BMP6 a permis de combler le déficit en hepcidine observé à l'âge de trois semaines [233] ce qui explique aussi pourquoi la surcharge atteint un plateau et n'est que légèrement supérieure à l'âge de douze semaines (données personnelles non publiées).

Néanmoins, HFE et TFR2 semblent jouer des rôles différents puisque les souris *Tfr2*^{-/-} sont plus sévèrement touchées que les souris *Hfe*^{-/-} [261]. On peut imaginer que HFE stabiliserait le complexe HFE/TFR2 alors que la détection de l'holotransferrine, son internalisation et l'activation de Erk1/2 serait imputable à TFR2 [203]. En l'absence de HFE, TFR2 activerait la voie Erk de manière moins efficace mais lorsque TFR2 est absent, il n'y a plus d'activation de la voie Erk et seul BMP6 assure l'expression de l'hepcidine.

Cette hypothèse serait conciliable avec la diminution de l'expression de *Bmp6* en situation de carence [230]. HFE/TFR2 n'activerait la phosphorylation qu'en présence d'holotransferrine. Ainsi, lors de déficit en fer, la concentration en holotransferrine est faible et la voie Erk serait logiquement inactive. Dans ce cas, le seul moyen de diminuer d'avantage la phosphorylation des Smad1/5/8 pour réprimer l'expression de l'hepcidine serait de réduire le niveau basal de BMP6 et l'expression de son messager.

Néanmoins ce modèle n'est qu'une proposition mais qui à mon sens est séduisante et qui mérite d'être explorée avec attention.

IV. Les divergences de la littérature

L'expression du messager de l'hepcidine est le sujet central d'un grand nombre d'études. Pourtant, les résultats ne sont pas toujours concordants et les niveaux d'expressions divergent selon les études sur les souris *Hfe*^{-/-}. En effet, nous n'observons pas de différences significatives de l'expression hépatique de l'hepcidine entre nos souris C57BL/6 *Hfe*^{-/-} et les souris sauvages à sept semaines, seule une légère différence est observée avec la souche DBA/2 [233]. A trois semaines, les souris *Hfe*^{-/-} ont en revanche un niveau d'expression de l'hepcidine plus faible que les souris sauvages.

Curieusement, Wallace *et al.* montrent que l'expression de l'hepcidine dans le foie des souris *Hfe*^{-/-} âgées de cinq semaines est trois fois supérieur au niveau observé chez les souris sauvages alors qu'elles sont également sous fond C57BL/6 [261]. Enfin, une autre étude présente une diminution de deux fois de l'expression de l'hepcidine dans le foie de souris C57BL/6 *Hfe*^{-/-} âgées de huit à dix semaines [172]. Ainsi, le niveau d'expression de

l'hepcidine est soumis à des variations considérables qui sont probablement dues à des variations physiologiques encore inexpliquées à l'heure actuelle.

V. Hecpidine et inflammation : existe-t-il une coopération avec la voie du fer ?

Les données de la littérature ainsi que nos travaux suggèrent que l'expression de l'hepcidine induite par l'inflammation passe par voie BMP/Smad [39, 115, 118, 150, 232]. Le ligand responsable de l'activation de la voie n'est pas connu et le TGF- β est un candidat possible. Nous envisageons une dernière série d'expériences pour trancher sur l'implication du TGF- β dans cette activation.

Nos résultats montrent clairement que la voie classique des BMPs en réponse au fer est inhibée par l'inflammation. Ces données suggèrent que l'inflammation n'utilise pas les ligands BMP classiques pour activer la phosphorylation des Smads comme cela a déjà été montré avec l'hémojuvéline [39].

De même, les données de la littérature montrent que TFR2 n'est pas impliqué dans la régulation de l'hepcidine par l'inflammation [197, 200, 202]. Nous avons obtenu des résultats similaires dans le foie de différents modèles de souris invalidées pour le gène *Hfe* (C57BL/6, DBA/2, 129Sv) où l'expression de l'hepcidine est augmentée après injection au LPS jusqu'à atteindre un niveau comparable aux souris sauvages. Ces données suggèrent que HFE, comme TFR2, n'est pas impliquée la régulation de l'hepcidine par l'inflammation.

L'expression de *Hjv* et *Bmp6* est diminuée de façon similaire chez les souris *Hfe*^{-/-} et sauvages confirmant que le complexe membranaire qui initie la voie des BMPs en réponse au fer est différent lors du stimulus inflammatoire. Cependant, la réponse à l'inflammation requiert les récepteurs des BMPs [150] et les voies du fer et de l'inflammation sont bien distinctes au départ mais convergent, par un mécanisme encore inconnu, au niveau de Smad4. Si le TGF- β n'est pas le ligand, il est nécessaire de déterminer quelle molécule est responsable de l'activation de la cascade de signalisation pour augmenter l'expression de l'hepcidine lors de l'inflammation.

VI. Conclusion générale

En résumé, plusieurs voies physiologiques telles que l'érythropoïèse, l'hypoxie, les surcharges en fer et l'inflammation utilisent l'hepcidine pour réguler l'entrée du fer dans l'organisme. Dans la hiérarchie de ces différentes voies, l'érythropoïèse serait le signal prédominant qui détermine l'expression de l'hepcidine [264]. Toutefois, l'ensemble de ces régulations est complexe et seulement partiellement élucidé actuellement.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de BMP6 dans cette régulation mais bien des questions restent ouvertes :

- Comment est régulée l'expression de *BMP6* ?
- *BMP6* serait-il un gène modificateur de l'hémochromatose ?
- Quels facteurs permettent à la voie BMP/Smad d'activer spécifiquement l'hepcidine ?

Enfin, s'il semble acquis que la voie des BMPs, BMP6, HFE, TFR2 et la voie Erk sont impliqués, le rôle exact de chacun de ces acteurs dans la régulation de l'expression de l'hepcidine n'est toujours pas connu. L'intérêt grandissant la voie des MAP kinases devrait rapidement permettre de vérifier son implication et son interaction avec ces molécules.

En définitive, ces différents points nécessitent d'être éclaircis mais conduiront à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Knutson, M. and M. Wessling-Resnick, *Iron metabolism in the reticuloendothelial system*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2003. **38**(1): p. 61-88.
2. McKie, A.T., et al., An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science, 2001. **291**(5509): p. 1755-9.
3. Gunshin, H., et al., Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
4. McKie, A.T., et al., A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 299-309.
5. Donovan, A., et al., Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
6. Abboud, S. and D.J. Haile, A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
7. Hershberger, C.L., et al., *A cloned gene for human transferrin*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **646**: p. 140-54.
8. Vulpe, C.D., et al., Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 195-9.
9. Delaby, C., et al., Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. Blood, 2005. **106**(12): p. 3979-84.
10. Harris, Z.L., et al., Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10812-7.
11. Attieh, Z.K., et al., Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1116-23.
12. Krause, A., et al., LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
13. Pigeon, C., et al., A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7811-9.
14. Nicolas, G., et al., Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8780-5.
15. Park, C.H., et al., Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
16. Nemeth, E., et al., Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
17. Lesbordes-Brion, J.C., et al., Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. Blood, 2006. **108**(4): p. 1402-5.
18. Lou, D.Q., et al., Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. Blood, 2004. **103**(7): p. 2816-21.
19. Ilyin, G., et al., Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload(1). FEBS Lett, 2003. **542**(1-3): p. 22-6.
20. Nicolas, G., et al., The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 1037-44.

21. Hunter, H.N., et al., The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37597-603.
22. Kemna, E.H., et al., *Hepcidin: from discovery to differential diagnosis*. *Haematologica*, 2008. **93**(1): p. 90-7.
23. Farnaud, S., A. Patel, and R.W. Evans, *Modelling of a metal-containing hepcidin*. *Biometals*, 2006. **19**(5): p. 527-33.
24. Valore, E.V. and T. Ganz, Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. **40**(1): p. 132-8.
25. Steiner, D.F., *The proprotein convertases*. *Curr Opin Chem Biol*, 1998. **2**(1): p. 31-9.
26. Shike, H., et al., Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(8): p. 2232-7.
27. Nemeth, E., et al., The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 328-33.
28. Gagliardo, B., et al., Pro-hepcidin is unable to degrade the iron exporter ferroportin unless matured by a furin-dependent process. *J Hepatol*, 2009. **50**(2): p. 394-401.
29. Gagliardo, B., et al., Production of biologically active forms of recombinant hepcidin, the iron-regulatory hormone. *Febs J*, 2008. **275**(15): p. 3793-803.
30. Viatte, L., et al., Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice. *Blood*, 2006. **107**(7): p. 2952-8.
31. Delatycki, M.B., et al., A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis. *Clin Genet*, 2004. **65**(5): p. 378-83.
32. Roetto, A., et al., Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2407-9.
33. Matthes, T., et al., Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene. *Blood*, 2004. **104**(7): p. 2181-3.
34. Roetto, A., et al., Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2003. **33**(1): p. 21-2.
35. Island, M.L., et al., A new mutation in the hepcidin promoter impaires its BMP response and contributes to a severe phenotype in HFE related haemochromatosis. *Haematologica*, 2009. **in press**.
36. Roetto, A., et al., Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2003. **33**(1): p. 21-2.
37. Jacolot, S., et al., HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2835-40.
38. Kemna, E., et al., Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*, 2005. **106**(5): p. 1864-6.
39. Niederkofler, V., R. Salie, and S. Arber, Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2180-6.
40. Huang, F.W., et al., *A mouse model of juvenile hemochromatosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2187-91.

41. Nemeth, E., et al., IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
42. Ganz, T., et al., *Immunoassay for human serum hepcidin*. *Blood*, 2008. **112**(10): p. 4292-7.
43. Swinkels, D.W., et al., Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2706.
44. De Domenico, I., et al., The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab*, 2008. **8**(2): p. 146-56.
45. De Domenico, I., et al., The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(7): p. 2569-78.
46. De Domenico, I., et al., Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(10): p. 3800-5.
47. De Domenico, I., et al., Molecular and clinical correlates in iron overload associated with mutations in ferroportin. *Haematologica*, 2006. **91**(8): p. 1092-5.
48. Letocart, E., 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*, 2009. **147**(3): p. 379-85.
49. Schimanski, L.M., et al., In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4096-102.
50. Liu, X.B., F. Yang, and D.J. Haile, *Functional consequences of ferroportin 1 mutations*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(1): p. 33-46.
51. Drakesmith, H., et al., Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 1092-7.
52. De Domenico, I., et al., *The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(25): p. 8955-60.
53. De Domenico, I., et al., *Evidence for the multimeric structure of ferroportin*. *Blood*, 2007. **109**(5): p. 2205-9.
54. Zohn, I.E., et al., The flatiron mutation in mouse ferroportin acts as a dominant negative to cause ferroportin disease. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4174-80.
55. Lee, P.L. and E. Beutler, *Regulation of hepcidin and iron-overload disease*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 489-515.
56. Darshan, D. and G.J. Anderson, *Interacting signals in the control of hepcidin expression*. *Biometals*, 2009. **22**(1): p. 77-87.
57. Ka, C., et al., Phenotypic and functional data confirm causality of the recently identified hemojuvelin p.r176c missense mutation. *Haematologica*, 2007. **92**(9): p. 1262-3.
58. Papanikolaou, G., et al., Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2004. **36**(1): p. 77-82.
59. Le Gac, G., et al., The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(17): p. 1913-8.
60. Samad, T.A., et al., DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. *J Neurosci*, 2004. **24**(8): p. 2027-36.
61. Brinks, H., et al., The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2004. **24**(15): p. 3862-9.

62. Matsunaga, E., et al., *RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(8): p. 749-55.
63. Monnier, P.P., et al., *RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 392-5.
64. Niederkofler, V., et al., Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. J Neurosci, 2004. **24**(4): p. 808-18.
65. Babitt, J.L., et al., Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29820-7.
66. Babitt, J.L., et al., Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 531-9.
67. Zhang, A.S., et al., Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33885-94.
68. Silvestri, L., A. Pagani, and C. Camaschella, Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. Blood, 2008. **111**(2): p. 924-31.
69. Lin, L., et al., Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(1): p. 122-31.
70. Kuningger, D., et al., Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. BMC Biochem, 2008. **9**: p. 9.
71. Babitt, J.L., et al., Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1933-9.
72. Lin, L., Y.P. Goldberg, and T. Ganz, Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. Blood, 2005. **106**(8): p. 2884-9.
73. Zhang, A.S., et al., Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12547-56.
74. McMahon, S., et al., Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6561-9.
75. Lundby, C., M. Gassmann, and H. Pilegaard, Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. Eur J Appl Physiol, 2006. **96**(4): p. 363-9.
76. Ameln, H., et al., Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. Faseb J, 2005. **19**(8): p. 1009-11.
77. Zhang, A.S., et al., Neogenin-mediated hemojuvelin shedding occurs after hemojuvelin traffics to the plasma membrane. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17494-502.
78. Maxson, J.E., C.A. Enns, and A.S. Zhang, Processing of hemojuvelin requires retrograde trafficking to the Golgi in HepG2 cells. Blood, 2009. **113**(8): p. 1786-93.
79. Zhang, A.S., et al., Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidin expression. J Biol Chem, 2009. **284**(34): p. 22580-9.
80. Finberg, K.E., et al., Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 569-71.
81. Guillem, F., et al., Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. Blood, 2008. **112**(5): p. 2089-91.

82. Melis, M.A., et al., A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*, 2008. **93**(10): p. 1473-9.
83. Du, X., et al., The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*, 2008. **320**(5879): p. 1088-92.
84. Folgueras, A.R., et al., Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2539-45.
85. Silvestri, L., et al., The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*, 2008. **8**(6): p. 502-11.
86. Ramsay, A.J., et al., The type II transmembrane serine protease matriptase-2--identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 569-79.
87. Silvestri, L., et al., Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood*, 2009. **113**(22): p. 5605-8.
88. Truksa, J., et al., Suppression of the hepcidin-encoding gene *Hamp* permits iron overload in mice lacking both hemojuvelin and matriptase-2/TMPRSS6. *Br J Haematol*, 2009.
89. Chambers, J.C., et al., Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels. *Nat Genet*, 2009. **41**(11): p. 1170-2.
90. Benyamin, B., et al., Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nat Genet*, 2009. **41**(11): p. 1173-5.
91. Gazzero, E. and E. Canalis, *Bone morphogenetic proteins and their antagonists*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006. **7**(1-2): p. 51-65.
92. Xiao, Y.T., L.X. Xiang, and J.Z. Shao, *Bone morphogenetic protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(3): p. 550-3.
93. Nishitoh, H., et al., Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem*, 1996. **271**(35): p. 21345-52.
94. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. *Growth Factors*, 2004. **22**(4): p. 233-41.
95. Luyten, F.P., et al., Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*, 1989. **264**(23): p. 13377-80.
96. Ashique, A.M., K. Fu, and J.M. Richman, Signalling via type IA and type IB bone morphogenetic protein receptors (BMPR) regulates intramembranous bone formation, chondrogenesis and feather formation in the chicken embryo. *Int J Dev Biol*, 2002. **46**(2): p. 243-53.
97. Attisano, L., et al., Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 671-80.
98. Nohe, A., et al., Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 3): p. 643-50.
99. Derynck, R. and Y.E. Zhang, Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
100. Samad, T.A., et al., *DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 14122-9.
101. Shi, Y. and J. Massague, Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 685-700.

102. Nishimura, R., et al., *The role of Smads in BMP signaling*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s275-84.
103. Nohe, A., et al., Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. Cell Signal, 2004. **16**(3): p. 291-9.
104. Chacko, B.M., et al., The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. Nat Struct Biol, 2001. **8**(3): p. 248-53.
105. Itoh, S., et al., Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6954-67.
106. Massague, J., *How cells read TGF-beta signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 169-78.
107. Moustakas, A., S. Souchelnytskyi, and C.H. Heldin, *Smad regulation in TGF-beta signal transduction*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 24): p. 4359-69.
108. Watanabe, M., et al., Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 176-82.
109. Xiao, Z., et al., Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39404-10.
110. Inman, G.J., F.J. Nicolas, and C.S. Hill, Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 283-94.
111. Xu, L., et al., Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 271-82.
112. Arora, K. and R. Warrior, *A new Smurf in the village*. Dev Cell, 2001. **1**(4): p. 441-2.
113. Ebisawa, T., et al., Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12477-80.
114. Truksa, J., et al., Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10289-93.
115. Wang, R.H., et al., A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. Cell Metab, 2005. **2**(6): p. 399-409.
116. Lin, L., et al., Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. Blood, 2007. **110**(6): p. 2182-9.
117. Xia, Y., et al., Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. Blood, 2008.
118. Verga Falzacappa, M.V., et al., A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells. J Mol Med, 2008. **86**(5): p. 531-40.
119. Casanovas, G., et al., 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, 2009. **87**(5): p. 471-80.
120. Truksa, J., et al., Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. Br J Haematol, 2007. **139**(1): p. 138-47.
121. Truksa, J., et al., The distal location of the iron responsive region of the hepcidin promoter. Blood, 2007. **110**(9): p. 3436-7.

122. Truksa, J., P. Lee, and E. Beutler, Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood*, 2009. **113**(3): p. 688-95.
123. Brittenham, G.M., New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload. *Curr Opin Hematol*, 1994. **1**(2): p. 101-6.
124. Frazer, D.M., et al., Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut*, 2004. **53**(10): p. 1509-15.
125. Papanikolaou, G., et al., *Hepcidin in iron overload disorders*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4103-5.
126. Vokurka, M., et al., Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res*, 2006. **55**(6): p. 667-74.
127. Pak, M., et al., Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*, 2006. **108**(12): p. 3730-5.
128. Fein, E., et al., *Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells*. *Peptides*, 2007. **28**(5): p. 951-7.
129. Pinto, J.P., et al., Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood*, 2008. **111**(12): p. 5727-33.
130. Courselaud, B., et al., C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 41163-70.
131. Tanno, T., et al., High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1096-101.
132. Kanda, J., et al., Serum hepcidin level and erythropoietic activity after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2008. **93**(10): p. 1550-4.
133. Tanno, T., et al., Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*, 2009. **114**(1): p. 181-6.
134. Raja, K.B., P. Duane, and T.J. Peters, Effects of turpentine-induced inflammation on the hypoxic stimulation of intestinal Fe³⁺ absorption in mice. *Int J Exp Pathol*, 1990. **71**(6): p. 785-9.
135. Salceda, S. and J. Caro, Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
136. McDonnell, S.M., et al., Population-based screening for hemochromatosis using phenotypic and DNA testing among employees of health maintenance organizations in Springfield, Missouri. *Am J Med*, 1999. **107**(1): p. 30-7.
137. Kamura, T., et al., Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(19): p. 10430-5.
138. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway*. *Sci STKE*, 2007. **2007**(407): p. cm8.
139. Peyssonnaud, C., et al., Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*, 2007. **117**(7): p. 1926-32.
140. Mastrogiannaki, M., et al., *HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(5): p. 1159-66.
141. Shah, Y.M., et al., Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab*, 2009. **9**(2): p. 152-64.

142. Means, R.T., Jr., *Hepcidin and anaemia*. Blood Rev, 2004. **18**(4): p. 219-25.
143. Nemeth, E., et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2461-3.
144. Lee, P., et al., *Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1906-10.
145. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
146. Levy, D.E. and C.K. Lee, *What does Stat3 do?* J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1143-8.
147. Wrighting, D.M. and N.C. Andrews, *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3204-9.
148. Verga Falzacappa, M.V., et al., *STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation*. Blood, 2007. **109**(1): p. 353-8.
149. Pietrangelo, A., et al., *STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 294-300.
150. Yu, P.B., et al., *Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(1): p. 33-41.
151. Feder, J.N., et al., *The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 14025-8.
152. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.
153. Niederau, C., et al., *Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis*. Gastroenterology, 1996. **110**(4): p. 1107-19.
154. Barton, J.C., et al., *Management of hemochromatosis*. Hemochromatosis Management Working Group. Ann Intern Med, 1998. **129**(11): p. 932-9.
155. Waheed, A., et al., *Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12384-9.
156. Mura, C., O. Ragueneas, and C. Ferec, *HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2502-5.
157. Merryweather-Clarke, A.T., et al., *The effect of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population*. Br J Haematol, 1998. **101**(2): p. 369-73.
158. McCune, C.A., et al., *Hereditary haemochromatosis: only 1% of adult HFEC282Y homozygotes in South Wales have a clinical diagnosis of iron overload*. Hum Genet, 2002. **111**(6): p. 538-43.
159. Wood, M.J., L.W. Powell, and G.A. Ramm, *Environmental and genetic modifiers of the progression to fibrosis and cirrhosis in hemochromatosis*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4456-62.
160. Le Gac, G., et al., *The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(17): p. 1913-8. Epub 2004 Jul 14.
161. Mura, C., et al., *Variation of iron loading expression in C282Y homozygous haemochromatosis probands and sib pairs*. J Med Genet, 2001. **38**(9): p. 632-6.

162. Dupic, F., et al., Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology*, 2002. **122**(3): p. 745-751.
163. Bensaid, M., et al., Multigenic control of hepatic iron loading in a murine model of hemochromatosis. *Gastroenterology*, 2004. **126**(5): p. 1400-8.
164. Ajioka, R.S., et al., *Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice*. *Blood*, 2002. **100**(4): p. 1465-9.
165. Pantopoulos, K., *Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(45): p. 6893-901.
166. Bridle, K.R., et al., Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*, 2003. **361**(9358): p. 669-73.
167. Ahmad, K.A., et al., *Decreased liver hepcidin expression in the hfe knockout mouse*. *Blood Cells Mol Dis*, 2002. **29**(3): p. 361-6.
168. Nicolas, G., et al., Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*, 2003. **34**(1): p. 97-101.
169. Piperno, A., et al., Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 4096-100.
170. Bozzini, C., et al., Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. **40**(3): p. 347-52.
171. Vujic Spasic, M., et al., Physiologic systemic iron metabolism in mice deficient for duodenal Hfe. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4511-7.
172. Vujic Spasic, M., et al., *Hfe acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis*. *Cell Metab*, 2008. **7**(2): p. 173-8.
173. Bralet, M.P., et al., No hepatic iron overload 12 years after liver transplantation for hereditary hemochromatosis. *Hepatology*, 2004. **40**(3): p. 762; author reply 762.
174. Graham, R.M., et al., *Liver iron transport*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(35): p. 4725-36.
175. Fleming, M.D., et al., Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(3): p. 1148-53.
176. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
177. Kawabata, H., et al., Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*, 1999. **274**(30): p. 20826-32.
178. Fleming, R.E., et al., Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(5): p. 2214-9.
179. Casey, J.L., et al., Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *Embo J*, 1989. **8**(12): p. 3693-9.
180. Casey, J.L., et al., Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science*, 1988. **240**(4854): p. 924-8.
181. Bianchi, L., L. Tacchini, and G. Cairo, *HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(21): p. 4223-7.
182. Lok, C.N. and P. Ponka, Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 24147-52.

183. Tacchini, L., et al., Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 24142-6.
184. Levy, J.E., et al., Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet*, 1999. **21**(4): p. 396-9.
185. Griffiths, W.J. and T.M. Cox, Co-localization of the mammalian hemochromatosis gene product (HFE) and a newly identified transferrin receptor (TfR2) in intestinal tissue and cells. *J Histochem Cytochem*, 2003. **51**(5): p. 613-24.
186. Kawabata, H., et al., Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem*, 2000. **275**(22): p. 16618-25.
187. Deaglio, S., et al., Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3782-9.
188. Robb, A.D., M. Ericsson, and M. Wessling-Resnick, Transferrin receptor 2 mediates a biphasic pattern of transferrin uptake associated with ligand delivery to multivesicular bodies. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(6): p. C1769-75.
189. Kawabata, H., et al., *Regulation of expression of murine transferrin receptor 2*. *Blood*, 2001. **98**(6): p. 1949-54.
190. Johnson, M.B. and C.A. Enns, Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood*, 2004. **104**(13): p. 4287-93.
191. Camaschella, C., et al., The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 14-5.
192. Gerolami, V., et al., Early-onset haemochromatosis caused by a novel combination of TFR2 mutations(p.R396X/c.1538-2 A>G) in a woman of Italian descent. *Haematologica*, 2008. **93**(5): p. e45-6.
193. Biasiotto, G., et al., *New TFR2 mutations in young Italian patients with hemochromatosis*. *Haematologica*, 2008. **93**(2): p. 309-10.
194. Majore, S., et al., Homozygous p.M172K mutation of the TFR2 gene in an Italian family with type 3 hereditary hemochromatosis and early onset iron overload. *Haematologica*, 2006. **91**(8 Suppl): p. ECR33.
195. Le Gac, G., et al., Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north French descent. *Br J Haematol*, 2004. **125**(5): p. 674-8.
196. Roetto, A., et al., New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood*, 2001. **97**(9): p. 2555-60.
197. Nemeth, E., et al., *Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1803-6.
198. Gehrke, S.G., et al., Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 371-6.
199. Fleming, R.E., et al., Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(16): p. 10653-8.
200. Kawabata, H., et al., Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 376-81.
201. Wallace, D.F., et al., First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut*, 2005. **54**(7): p. 980-6.

202. Lee, P., et al., The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(25): p. 9263-5.
203. Calzolari, A., et al., TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 21): p. 4486-98.
204. Ramey, G., J.C. Deschemin, and S. Vaulont, Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica*, 2009. **94**(6): p. 765-72.
205. Feder, J.N., et al., The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1472-7.
206. Lebron, J.A., A.P. West, Jr., and P.J. Bjorkman, The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol*, 1999. **294**(1): p. 239-45.
207. Bennett, M.J., J.A. Lebron, and P.J. Bjorkman, Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 46-53.
208. Salter-Cid, L., et al., Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: implications for cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5434-9.
209. Goswami, T. and N.C. Andrews, Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*, 2006.
210. Schmidt, P.J., et al., The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*, 2008. **7**(3): p. 205-14.
211. Aisen, P. and I. Listowsky, *Iron transport and storage proteins*. *Annu Rev Biochem*, 1980. **49**: p. 357-93.
212. Lebron, J.A., et al., Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*, 1998. **93**: p. 111-123.
213. Gao, J., et al., Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*, 2009. **9**(3): p. 217-27.
214. Chen, J., et al., HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions. *J Biol Chem*, 2007. **282**(51): p. 36862-70.
215. Barry, M. and S. Sherlock, Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy specimens. *Lancet*, 1971. **1**(7690): p. 100-3.
216. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(9): p. e36.
217. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
218. Courselaud, B., et al., Strain and gender modulate hepatic hepcidin 1 and 2 mRNA expression in mice. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. **32**(2): p. 283-9.

219. Kersten, C., et al., BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol*, 2005. **6**(1): p. 9.
220. Solloway, M.J., et al., *Mice lacking Bmp6 function*. *Dev Genet*, 1998. **22**(4): p. 321-39.
221. Goumans, M.J., Z. Liu, and P. ten Dijke, *TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction*. *Cell Res*, 2009. **19**(1): p. 116-27.
222. Lu, Q., et al., Transforming growth factor-beta1 causes pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via ALK5. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **296**(5): p. L825-38.
223. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
224. Ge, G. and D.S. Greenspan, BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol*, 2006. **175**(1): p. 111-20.
225. Kuruvilla, L. and C.C. Kartha, Treatment with TNF-alpha or bacterial lipopolysaccharide attenuates endocardial endothelial cell-mediated stimulation of cardiac fibroblasts. *J Biomed Sci*, 2009. **16**: p. 21.
226. You, S., et al., Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(15): p. 6335-40.
227. Andriopoulos, B., Jr., et al., BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 482-7.
228. Merle, U., et al., Localization of the iron-regulatory proteins hemojuvelin and transferrin receptor 2 to the basolateral membrane domain of hepatocytes. *Histochem Cell Biol*, 2007. **127**(2): p. 221-6.
229. Korchynskiy, O. and P. ten Dijke, Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4883-91.
230. Kautz, L., et al., Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1503-9.
231. Corradini, E., et al., Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology*, 2009. **137**(4): p. 1489-97.
232. Meynard, D., et al., Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 478-81.
233. Kautz, L., et al., BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. *Blood*, 2009. **114**(12): p. 2515-20.
234. Arndt, S., et al., Iron-induced expression of BMP6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo. *Gastroenterology*, 2009.
235. Tamada, H., et al., Molecular cloning and analysis of the 5'-flanking region of the human bone morphogenetic protein-6 (BMP-6). *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1395**(3): p. 247-51.
236. Daibata, M., et al., Promoter hypermethylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in malignant lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(12): p. 3528-35.
237. Taniguchi, A., et al., Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia. *Int J Cancer*, 2008. **123**(8): p. 1824-31.
238. Dai, J., et al., Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5785-94.

239. Gordon, M.D. and R. Nusse, Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22429-33.
240. Nakashima, A., T. Katagiri, and M. Tamura, Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem*, 2005. **280**(45): p. 37660-8.
241. Brookes, M.J., et al., *A role for iron in Wnt signalling*. *Oncogene*, 2008. **27**(7): p. 966-75.
242. Bayele, H.K., H. McArdle, and S.K. Srail, *Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor*. *Blood*, 2006. **108**(13): p. 4237-45.
243. Wu, K.J., A. Polack, and R. Dalla-Favera, *Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC*. *Science*, 1999. **283**(5402): p. 676-9.
244. Habel, M.E. and D. Jung, c-Myc over-expression in Ramos Burkitt's lymphoma cell line predisposes to iron homeostasis disruption in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(4): p. 1309-16.
245. O'Donnell, K.A., et al., Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(6): p. 2373-86.
246. Ward, D.G., et al., *Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(9): p. 1339-45.
247. Sekiya, T., et al., Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem*, 2004. **279**(8): p. 6840-6.
248. Onichtchouk, D., et al., *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. *Nature*, 1999. **401**(6752): p. 480-5.
249. Ogata, T., et al., Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(19): p. 9219-22.
250. Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura, *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. **16**(3): p. 251-63.
251. Inoue, C., et al., Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes Cells*, 2001. **6**(11): p. 977-86.
252. Ross, M.D., et al., Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis. *Dev Dyn*, 2006. **235**(11): p. 3102-9.
253. Lynn, F.C., et al., Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the embryonic pancreas transcriptional network. *PLoS One*, 2008. **3**(6): p. e2430.
254. Norton, J.D., ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 22): p. 3897-905.
255. Nakao, A., et al., Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 1997. **389**(6651): p. 631-5.
256. Valdimarsdottir, G., et al., Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol*, 2006. **7**: p. 16.
257. Itoh, S. and P. ten Dijke, *Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 176-84.
258. Forbes, D., et al., Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(1): p. 264-72.

259. Langley, B., et al., Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49831-40.
260. Kollias, H.D., et al., *Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(16): p. 6248-60.
261. Wallace, D.F., et al., Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology*, 2009.
262. Sivertsen, E.A., et al., Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(10): p. 2937-48.
263. Hayashida, T., M. DeCaestecker, and H.W. Schnaper, Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells. *Faseb J*, 2003. **17**(11): p. 1576-8.
264. Huang, H., et al., Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*, 2009. **113**(15): p. 3593-9.

ANNEXE

Gene expression profiling of *Hfe*^{-/-} liver and duodenum in mouse strains with differing susceptibilities to iron loading: identification of transcriptional regulatory targets of *Hfe* and potential hemochromatosis modifiers

Hélène Coppin^{*†}, Valérie Darnaud^{*†}, Léon Kautz^{*†}, Delphine Meynard^{*†}, Marc Aubry^{‡§}, Jean Mosser^{‡§}, Maria Martinez^{*†} and Marie-Paule Roth^{*†}

Addresses: ^{*}INSERM, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300 France. [†]Université Toulouse III Paul-Sabatier, IFR 30, Toulouse, F-31400 France. [‡]CNRS, UMR6061, Génétique et Développement, Rennes, F-35000 France. [§]Université de Rennes 1, IFR 140, Rennes, F-35000 France.

Correspondence: Marie-Paule Roth. Email: roth@cict.fr

Published: 18 October 2007

Genome Biology 2007, **8**:R221 (doi:10.1186/gb-2007-8-10-r221)

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at <http://genomebiology.com/2007/8/10/R221>

Received: 8 June 2007

Revised: 16 October 2007

Accepted: 18 October 2007

© 2007 Coppin et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: *Hfe* disruption in mouse leads to experimental hemochromatosis by a mechanism that remains elusive. Affymetrix GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 microarrays and bioinformatics tools were used to characterize patterns of gene expression in the liver and the duodenum of wild-type and *Hfe*-deficient B6 and D2 mice (two inbred mouse strains with divergent iron loading severity in response to *Hfe* disruption), to clarify the mechanisms of *Hfe* action, and to identify potential modifier genes.

Results: We identified 1,343 transcripts that were upregulated or downregulated in liver and 370 in duodenum of *Hfe*^{-/-} mice, as compared to wild-type mice of the same genetic background. In liver, *Hfe* disruption upregulated genes involved in antioxidant defense, reflecting mechanisms of hepatoprotection activated by iron overload. *Hfe* disruption also downregulated the expression of genes involved in fatty acid β -oxidation and cholesterol catabolism, and of genes participating in mitochondrial iron traffic, suggesting a link between *Hfe* and the mitochondrion in regulation of iron homeostasis. These latter alterations may contribute to the inappropriate iron deficiency signal sensed by the duodenal enterocytes of these mice, and the subsequent upregulation of the genes encoding the ferrireductase *Dcytb* and several iron transporters or facilitators of iron transport in the duodenum. In addition, for several genes differentially expressed between B6 and D2 mice, expression was regulated by loci overlapping with previously mapped *Hfe*-modifier loci.

Conclusion: The expression patterns identified in this study contribute novel insights into the mechanisms of *Hfe* action and potential candidate genes for iron loading severity.

Background

Hereditary hemochromatosis (HH) accounts for most of the iron overload disorders that occur in individuals of European descent. It is an autosomal-recessive condition that is characterized by increased absorption of iron from the gastrointestinal tract and progressive accumulation of catalytically active iron in parenchymal organs. This iron excess can cause tissue damage and result in serious medical complications, including cirrhosis, primary liver cancer, diabetes, cardiomyopathy, endocrine dysfunction, and arthritis [1]. In Northern Europe, most patients with HH are homozygous for a single mutation (C282Y) in the *HFE* gene (which encodes the hereditary hemochromatosis [HFE] protein) [2]. Although the C282Y mutation disrupts a disulfide bond required for proper folding of the HFE molecule, the exact mechanisms by which HFE regulates iron homeostasis remain elusive. HFE expression can result in either the accumulation or the depletion of intracellular iron stores, depending on the cell type, suggesting that HFE interacts with other proteins that are involved in either the import or the export of iron [3,4]. The challenge remains to identify these proteins.

Despite its high prevalence (approximately 5/1,000 individuals of Northern European descent), C282Y homozygosity is characterized by a low penetrance [5], and family studies have shown that genetic factors contribute to this reduced penetrance [6]. Polymorphisms of modifier genes may have profound effects on the dominance of the *HFE* gene defect itself and explain individual variations in excess iron absorption and their pathologic consequences among carriers of the HH-predisposing genotype. However, the exact nature of these modifier genes in HH remains unknown, which currently precludes accurate prediction of who, among C282Y homozygotes, is likely to develop clinically significant iron-storage disease.

Murine models of iron loading, such as *Hfe* knockout mice (*Hfe*^{-/-}), provide a useful alternative to humans in which to elucidate the physiologic pathways that are involved in the HH disease process and identifying modifier loci [7,8]. We previously reported that, compared with the inbred mouse strain C57BL/6 (B6), the strain DBA/2 (D2) was particularly susceptible to iron loading in response to *Hfe* disruption [9], suggesting the existence of genes other than *HFE* that modify the severity of iron accumulation. We therefore took advantage of the marked phenotypic differences between these two strains to localize five chromosomal intervals that control hepatic iron loading [10]. Analysis of recombinant inbred strains and exploration of strain-specific gene expression changes that result from *Hfe* disruption should facilitate the identification of the *Hfe* modifiers that account for variable disease expression in these intervals.

Thus far, investigations of regulatory circuits in response to *Hfe* disruption have not addressed possible strain differences and have been limited to IronChip cDNA microarrays

customized to analyze a selection of 300 genes encoding proteins that are directly involved in iron metabolism or in linked pathways [11]. Of note, expression of genes that may still have unsuspected importance in iron metabolism cannot be explored using these customized microarrays. Our goal in the present study was to identify functional classes of genes and individual candidates that are involved in the perturbation of mechanisms of iron homeostasis that results from *Hfe* disruption, and to identify differences in gene expression profiles between the inbred mouse strains B6 and D2 that could explain their difference in iron accumulation. To achieve this goal, we used Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 arrays containing 45,101 probe sets for over 39,000 transcripts, including 34,000 well characterized mouse genes, and bioinformatics tools to characterize expression networks in the duodenum and the liver of wild-type control and *Hfe*^{-/-} B6 and D2 mice.

Results

Differential gene expression between *Hfe*-deficient and wild-type mice

Microarray studies of liver and duodenum from *Hfe*^{-/-} mice identified 1,343 transcripts that were upregulated or downregulated in liver of either B6 or D2 *Hfe*^{-/-} mice, as compared with wild-type mice of the same genetic backgrounds. Much fewer genes, namely 370, were upregulated or downregulated in the duodenum of these mice. A list of the transcripts differentially regulated between *Hfe*-deficient and wild-type mice is provided in Additional data files 1 (liver) and 2 (duodenum). As shown in Figure 1, more transcripts were regulated in *Hfe*-deficient D2 mice than in B6 mice, and this difference was particularly striking in duodenum.

In liver, clustering analysis detected groups of transcripts that were similarly regulated in response to *Hfe* disruption in B6 and D2 mice (specifically, they were either downregulated [Figure 2, cluster 4] or upregulated [cluster 5] in both strains). However, most of the transcripts modulated after *Hfe* disruption had expression patterns that were strain specific (regulated only in D2 mice [clusters 1 and 6] or only in B6 mice [clusters 3 and 8]).

In duodenum of B6 mice, the expression of fewer than 20 genes was significantly modified by *Hfe* deficiency (Figure 1). Consequently, clustering analysis was essentially based on expression changes in D2 mice. Two main clusters were therefore identified in duodenum, one with genes upregulated (cluster 1, Additional data file 2) and the other with genes downregulated (cluster 3, Additional file 2) in response to *Hfe* disruption in D2 mice.

Enriched functional categories in the liver of *Hfe*-deficient mice

The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) annotation tool was used to search for

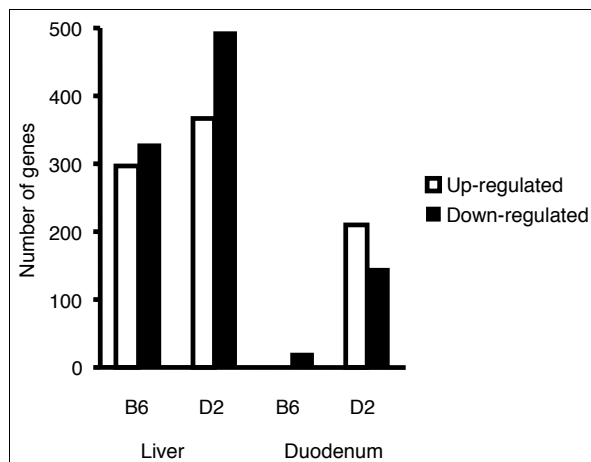


Figure 1
Number of genes regulated by *Hfe* disruption by mouse strain and organ studied. Genes regulated by *Hfe* disruption identified by statistical analysis of microarrays (SAM) were filtered to summarize the number of upregulated or downregulated genes in liver and duodenum. Genes were included if the mean S-score across three independent comparisons was ≥ 2 or ≤ -2 .

over-representation of functional categories within the different gene clusters from Figure 2. Categories found to be enriched within the clusters of genes similarly regulated in the liver of *Hfe*^{-/-} compared with wild-type mice are summarized in Table 1. As detailed below, they mainly concern detoxification mechanisms in response to oxidative stress, fatty acid β -oxidation, cholesterol catabolism, and circadian rhythm.

Detoxification mechanisms in response to oxidative stress

The 84 genes from cluster 5 (Figure 2) and the 248 genes from cluster 1 that were induced by *Hfe*-deficiency in the liver were particularly enriched for functional categories associated with response to oxidative stress and iron ion binding (Table 2). Excess iron is known to generate reactive oxygen species that promote cell damage and fibrosis, and may be responsible for the induction of the aldehyde oxidase and NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase genes observed in these mice. This appears to be counterbalanced by upregulation of genes involved in the glutathione metabolism pathway, in particular genes encoding enzymes that are responsible for glutathione synthesis (*Gclc*, *Gclm*, and *Gss*) and glutathione S-transferases, which catalyze the conjugation of reduced glutathione to electrophilic centers on a wide variety of substrates; the latter activity is useful in the detoxification of endogenous compounds such as peroxidized lipids. Excess iron also appears to be counterbalanced, particularly in *Hfe*^{-/-} D2 mice, by upregulation of genes encoding uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronosyltransferases, which catalyze the glucuronidation reaction (the addition of sugars to lipids), which is an important step in the body's elimination of endogenous toxins. In

addition, there was an enrichment, most notably in *Hfe*^{-/-} D2 mice, of genes with mono-oxygenase activity, particularly genes encoding several cytochrome P450 isoforms and flavin-containing mono-oxygenase-5, which are considered to be xenobiotic detoxication catalysts and believed to protect mammals from lipophilic nucleophilic chemicals [12]. The iron ion binding category, also enriched in the liver of both strains, includes the genes for ferroportin, ferritin light chain, and heme oxygenase, which catalyzes the degradation of heme into carbon monoxide and biliverdin. Of note, although expression of *vanin1* was downregulated in mice lacking *Hfe* in both strains (cluster 4), this regulation is worth noting because mice deficient in vanin-1 exhibit a glutathione-mediated tissue resistance to oxidative stress [13].

Fatty acid β -oxidation and cholesterol catabolism

The 139 genes from cluster 4 (Figure 2) and the 315 genes from cluster 6, which were repressed in liver by *Hfe* deficiency, were particularly enriched for functional categories associated with lipid metabolism (Table 3). In particular, genes encoding the rate-limiting enzyme for β -oxidation of long-chain fatty acids (*Cpt*) and the transcripts for enzymes involved in the three steps of β -oxidation were all significantly downregulated. The expression of the *Cyp4a10* and *Cyp4a14* genes was also repressed in *Hfe*^{-/-} mice of both strains, which could be a physiologic response in the context of the reduced fatty acid β -oxidation. With a decrease in acetyl-coenzyme A generated by decreased β -oxidation, a decrease in citrate (the first intermediate generated in the tricarboxylic acid [TCA] cycle) would be expected in the mitochondria of *Hfe*^{-/-} mice, with a subsequent slowing of the TCA cycle. Indeed, a downregulation of mitochondrial aconitase and isocitrate dehydrogenase suggests that the flux through the TCA cycle is maintained at a low level in order to adapt to the downregulated β -oxidation in these *Hfe*-deficient mice. Interestingly, the cholesterol metabolism category is also enriched among genes downregulated by *Hfe* deficiency in D2 mice, and this mainly affects genes that are involved in the catabolism of cholesterol into bile acids (*Cyp7a1* and *Cyp39a1*).

Circadian rhythm

Hfe^{-/-} mice of both strains exhibit reduced expression of genes encoding Period (*Per2* and *Per3*), D site albumin promoter binding protein (*Dpb*), and the nuclear receptor subfamily 1 (*Nr1d1*). Although surprising, this can be related to the recent observation that the circadian clock and heme biosynthesis are reciprocally regulated in mammals [14] and may be correlated with the upregulation of δ -aminolevulinic synthase (*Alas2*) in the liver of these mice.

Other variations of potential interest

Hfe^{-/-} D2 mice exhibit increased expression of the gene encoding 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (*Hsd3b5*), which is thought to be involved in the inactivation of steroid hormones, for example dihydrotestosterone [15]. They also

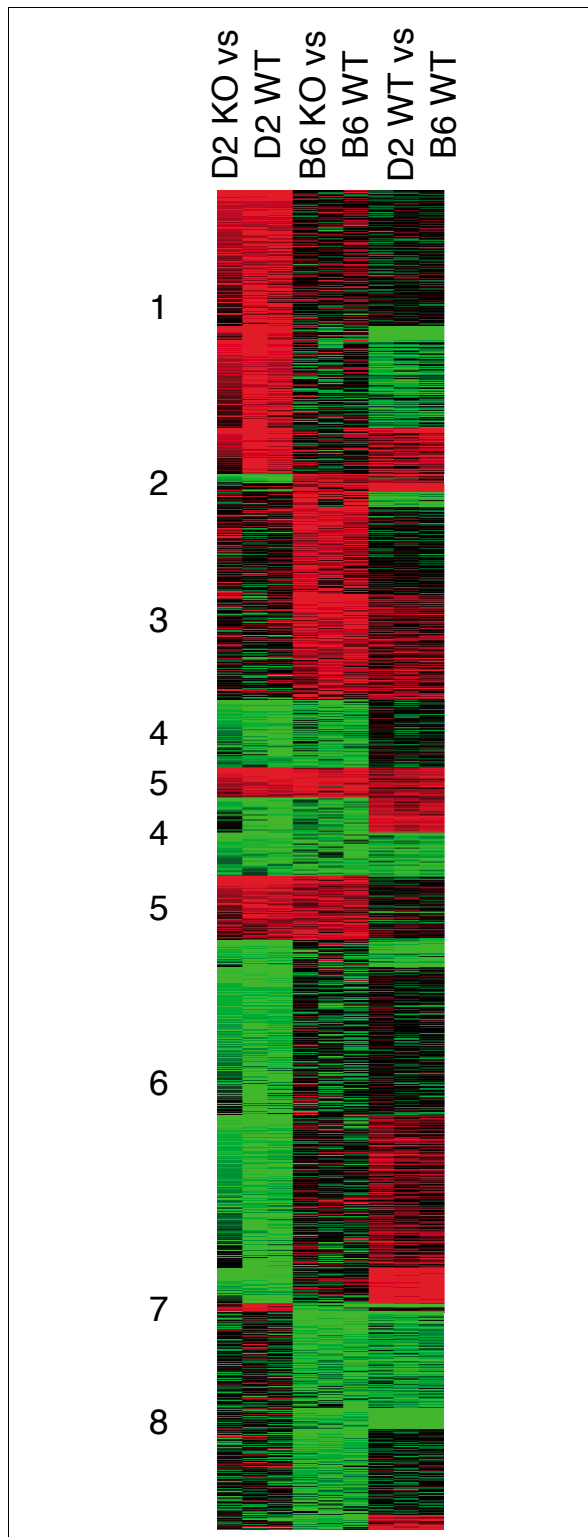


Figure 2

Figure 2

Genes regulated by *Hfe* deficiency in D2 and B6 liver. A tree view image of k-means clustering for 1,343 genes regulated by *Hfe* disruption in liver of D2 or B6 mice is shown. Genes were selected by statistical filtering of knockout (KO) versus wild-type (WT) S-scores, as described in Materials and methods. Corresponding values for wild-type D2 versus B6 S-scores are also shown. Red indicates upregulation by *Hfe* deficiency or more highly expressed in D2 mice; green indicates downregulation by *Hfe* deficiency or more highly expressed in B6 mice; and black indicates no difference.

exhibit induction of the dopachrome tautomerase gene (*Dpt*), which affects pigmentation [16]. It would be interesting to investigate whether these variations in gene expression are related to the deficit in testosterone and melanoderma observed in patients with severe hemochromatosis.

Enriched functional categories in the duodenum of *Hfe*-deficient mice

As shown in Table 4, there was no clearly enriched functional categories among the 177 genes (cluster 1) that were induced in #*Hfe*^{-/-} D2 mice. Conversely, there was significant enrichment of genes involved in the immune defense among the 131 genes that were repressed in the same mice (cluster 3), particularly for genes involved in apoptosis (*Casp4*, *Cdca7l*, *Ifit1* and *Ifit2*, *Oasl2*, and *Scotin*), innate antiviral or antimicrobial activity (*Defer4*, *Ddx58*, and *Lzp-s*), and B and T cell mediated immune response (*Mpa2l*, *Psme1*, *Trfrsf13b*, and *Trfrsf17*). This suggests a link between the control of iron metabolism and the immune system that should be explored.

Although mRNAs for duodenal iron transporters were not found to be significantly upregulated, expression levels of other metal ion transporters were increased in duodenum of *Hfe*^{-/-} D2 mice, most notably the zinc transporters *Slc39a4* and *Slc39a14*. The copper transporter *Slc31a1* and, more anecdotally, the sodium-dependent vitamin C transporter *Slc23a2* (previously observed to be increased in response to dietary iron deprivation [17]) were also induced in D2 mice lacking *Hfe*. In addition, *Hfe*^{-/-} D2 mice had increased expression of the mucin (*Muc3*) and spermin synthase (*Sms*) genes, which encode proteins that both may modulate iron uptake [18,19].

Changes in expression of genes encoding proteins of iron metabolism

The Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 arrays contain probe sets for the transcripts of all the genes directly or indirectly involved in iron metabolism [20]. Significant alterations in their expression in liver or duodenum of *Hfe*^{-/-} mice and gene expression differences between wild-type strains are summarized in Table 5. Specifically in the D2 strain, *Hfe* disruption induces expression of the *Cybrd1* gene in duodenum; this gene encodes Dcytb, which converts dietary ferric iron into its ferrous form for transport. In the liver, *Hfe*-deficient mice of both strains exhibit upregulated expression of the gene encoding the ferritin light chain, which

Table 1**Functional categories over-represented in clusters of genes similarly regulated by *Hfe*-disruption in the liver**

Category	Term	<i>n</i>	EASE score
Cluster 1 (284 Affy IDs [248 genes])			
GOTERM_BP	Steroid metabolism	11	1.4×10^{-5}
GOTERM_MF	Mono-oxygenase activity	10	3.7×10^{-5}
GOTERM_MF	UDP glucuronosyltransferase activity	5	2.9×10^{-2}
Cluster 3 (218 Affy IDs [196 genes])			
No functional category overrepresented			
Cluster 4 (145 Affy IDs [139 genes])			
GOTERM_BP	Rhythmic process	6	6.5×10^{-5}
KEGG_PATHWAY	Fatty acid metabolism	7	3.2×10^{-6}
GOTERM_BP	Defense response	14	4.7×10^{-3}
GOTERM_BP	Nitrogen compound metabolism	9	5.6×10^{-3}
Cluster 5 (94 Affy IDs [84 genes])			
KEGG_PATHWAY	Glutathione metabolism	8	5.8×10^{-8}
GOTERM_MF	Iron ion binding	8	2.7×10^{-4}
Cluster 6 (364 Affy IDs [315 genes])			
SP_PIR_KEYWORDS	Fatty acid metabolism	15	2.5×10^{-14}
SP_PIR_KEYWORDS	Oxidoreductase	31	1.1×10^{-8}
GOTERM_MF	Iron ion binding	19	1.6×10^{-6}
KEGG_PATHWAY	Bile acid biosynthesis	6	1.1×10^{-3}
GOTERM_BP	Cholesterol metabolism	6	3.2×10^{-3}
Cluster 8 (219 Affy IDs [209 genes])			
No functional category overrepresented			

Affymetrix probesets in the different k-means clusters shown in Figure 2 were compared with Affymetrix MG-430 2.0 probe sets for over-representation of gene categories, using the DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) functional annotation tool. The Category column shows the original database/resource from which the terms originate. The Term column indicates enriched terms associated with the gene list. The *n* column indicates the number of genes involved in the term. The expression analysis systematic explorer (EASE) score is a modified Fisher exact *P* value [51]. BP, biological processes; GO, Gene Ontology; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MF, molecular functions; PIR, Protein Information Resource; UDP, Uridine 5'-diphospho.

is responsible for cytosolic iron storage, and of the ferroportin gene, which is consistent with the notion that this protein plays a protective role by facilitating the release of excess iron [21]. Somewhat unexpectedly, we observed significant down-regulation of the sideroflexin gene (*Sfxn2*) and upregulation of the mitoferrin gene (*Slc25a37*) and the Bcrp gene (*Abcg2*), which encode three molecules that are involved in the mitochondrial import/traffic of iron and heme export. Also worthy of mention are several strain-specific modifications of the messengers of some regulators of iron metabolism in *Hfe*-deficient mice. First, we confirmed that wild-type B6 and D2 diverge in terms of the amounts of the two hepcidin messengers, namely *Hamp1* and *Hamp2* [22], and we observed a downregulation of the two genes in *Hfe*^{-/-} D2 mice. Conversely, we observed significant upregulation of the gene encoding the upstream transcription factor *Usf2*, which was recently found to be involved in the control of hepcidin expression [23], in the B6 strain. Finally, and worthy of note within the context of modifiers of iron loading severity, wild-type D2 mice have significantly lower expression of the

Smad4 transcription factor, also involved in the control of hepcidin expression, than wild-type B6 mice.

Confirmation of differential gene expression by quantitative PCR

Quantitative real-time PCR was performed on 21 genes expressed in the liver and four genes expressed in the duodenum. The selection of these genes was based on different criteria. The first group included genes of an enriched functional category identified using the DAVID annotation tool (*Aox1*, *Ftl1*, *Fpn1*, *Hmox1*, *Vnn1*, *Por*, *Cpt1a*, *Aco2*, *Cyp7a1*, and *Hsd3b5*). The second group of genes encode proteins of iron or heme metabolism, and their expression was either induced or repressed in *Hfe*^{-/-} mice (*Hfe2*, *Hamp1*, *Hamp2*, *Usf2*, *Lcn2*, *Sfxn2*, *Alas2*, *Slc25a37*, and *Abcg2*). The third group encode proteins that might modulate iron absorption in the duodenum (*Dcytb*, *Slc39a4*, and *Muc3*). The fourth group includes genes that, although their involvement in iron metabolism regulation cannot be assumed, were highly regulated in liver (*Lcn13* and *Fmo3*) or duodenum (*Cla4*) of

Table 2**Main genes regulated by *Hfe* deficiency in liver and pertaining to enriched functional categories related to response to oxidative stress**

Gene	Protein	S-score		
		D2 KO versus WT	B6 KO versus WT	D2 WT versus B6 WT
Glutathione metabolism pathway				
<i>Gclc</i>	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	3.68	4.74	3.24
<i>Gclm</i>	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	NS	4.11	NS
<i>Gss</i>	Glutathione synthetase	NS	2.15	NS
<i>Gsta2</i>	Glutathione S-transferase alpha2	8.83	9.10	NS
<i>Gsta3</i>	Glutathione S-transferase alpha3	2.44	2.24	NS
<i>Gsta4</i>	Glutathione S-transferase alpha4	4.64	5.99	4.35
<i>Gstm1</i>	Glutathione S-transferase mu1	NS	2.65	NS
<i>Gstm3</i>	Glutathione S-transferase mu3	3.04	4.04	2.56
<i>Gstm6</i>	Glutathione S-transferase mu6	3.36	2.26	NS
UDP glucuronosyltransferase activity				
<i>Ugt2b1</i>	UDP glucuronosyltransferase 2B1	3.72	NS	NS
<i>Ugt2b5</i>	UDP glucuronosyltransferase 2B5	2.56	3.91	NS
<i>Ugt2b34</i>	UDP glucuronosyltransferase 2B34	NS	2.25	NS
<i>Ugt2b35</i>	UDP glucuronosyltransferase 2B35	2.56	3.91	NS
<i>Ugt2b36</i>	UDP glucuronosyltransferase 2B36	4.66	NS	-4.89
Mono-oxygenase activity				
<i>Cyp1a2</i>	Cytochrome P450 1A2	3.14	2.60	3.49
<i>Cyp2c29</i>	Cytochrome P450 2C29	NS	2.79	4.84
<i>Cyp2c44</i>	Cytochrome P450 2C44	3.07	NS	-5.89
<i>Cyp2c55</i>	Cytochrome P450 2C55	3.94	6.22	4.43
<i>Cyp2c70</i>	Cytochrome P450 2C70	5.55	4.70	4.17
<i>Cyp2j6</i>	Cytochrome P450 2J6	2.70	NS	NS
<i>Cyp2j9</i>	Cytochrome P450 2J9	NSD	2.91	2.14
<i>Cyp2u1</i>	Cytochrome P450 2U1	3.50	NS	NS
<i>Fmo5</i>	Flavin mono-oxygenase 5	2.12	NS	NS
Iron ion binding				
<i>Ftl1</i>	Ferritin light chain 1	1.70	2.24	NS
<i>Slc40a1</i>	Ferroportin	3.18	4.89	3.94
<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase 1	5.27	2.40	-3.66
<i>Blvrb</i>	Biliverdin reductase (for information)	2.50	3.06	NS
<i>Vnn1</i>	Vanin 1 (for information)	-4.27	-2.73	2.69

S-scores were obtained as described in Materials and methods and are proportional to fold changes. Positive S-scores indicate that the genes are more highly expressed in knockout (KO) than in wild-type (WT) mice, or in WT D2 than in WT B6 mice. NS, not significant; UDP, Uridine 5'-diphospho.

Hfe^{-/-} mice. A further 20 mice that were not analyzed using Affymetrix arrays (five per genotype/strain combination) were included in the analysis to test the validity of the results.

Concordant results were obtained for 24 out of 25 genes selected. Downregulation of the hemojuvelin gene (*Hfe2*) in *Hfe*^{-/-} B6 mice was not confirmed. Downregulation of *Lcn2*, *Hamp1*, and *Hamp2* in *Hfe*^{-/-} D2 mice was confirmed in the samples used for Affymetrix array hybridizations but not in the additional samples used for validation, although a trend toward downregulation was observed in the validation set for

Hamp1 and *Hamp2*. The upregulation of *Ufs2* and *Slc25a37*, originally found only in the liver of *Hfe*^{-/-} B6 mice, was observed by quantitative PCR in both strains. Interestingly, *Lcn13* and *Fmo3* - which had highly significant S-scores of 11.06 and -6.66, respectively, in the liver of *Hfe*^{-/-} D2 mice - were confirmed to be regulated by *Hfe* deficiency in both datasets. Because neither of these two genes is regulated by dietary iron content in wild-type mice (data not shown), these variations appear specific to *Hfe* disruption and warrant further investigation.

Table 3

Main genes regulated by *Hfe* deficiency in liver and pertaining to the enriched functional categories fatty acid β -oxidation and cholesterol metabolism

Gene	Protein	S-score		
		D2 KO versus WT	B6 KO versus WT	D2 WT versus B6 WT
Fatty acid β-oxidation				
<i>Cpt1a</i>	Carnitine palmitoyl transferase 1a	-2.95	-1.94	NS
<i>Cpt2</i>	Carnitine palmitoyl transferase 2	-2.59	NS	NS
<i>Acadm</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, medium chain	-2.97	-1.80	NS
<i>Acadl</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, long chain	-3.00	NS	NS
<i>Acadvl</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	-2.40	NS	NS
<i>Ehhadh</i>	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-2.30	NS	NS
<i>Hadha</i>	Tripartite protein, alpha subunit	-2.08	-1.58	NS
<i>Hadhb</i>	Tripartite protein, beta subunit	-2.96	-1.90	NS
<i>Hadh2</i>	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II	NS	-4.05	-4.61
<i>Acox1</i>	Acyl-CoA oxydase I, palmitoyl (peroxisomal)	-2.10	-1.63	-4.27
<i>Cyp4a10</i>	Cytochrome P450 4A10	-6.76	-2.46	NS
<i>Cyp4a14</i>	Cytochrome P450 4A14	-9.21	-3.09	NS
TCA cycle				
<i>Aco2</i>	Aconitase 2, mitochondrial	-2.14	-1.82	NS
<i>Idh2</i>	Isocitrate dehydrogenase 2, mitochondrial	-2.09	NS	NS
Cholesterol catabolism				
<i>Cyp7a1</i>	Cholesterol 7 α -hydroxylase	-3.15	NS	NS
<i>Cyp39a1</i>	Oxysterol 7 α -hydroxylase	-2.60	NS	NS

S-scores were obtained as described in Material and methods and are proportional to fold changes. Negative S-scores indicate that the genes are more highly expressed in wild-type (WT) than in knockout (KO) mice, or in WT B6 than in WT D2 mice. Variations in the expression of genes involved in the tricarboxylic acid (TCA) cycle are provided for information. CoA, coenzyme A; NS, not significant.

Table 4

Functional categories over-represented in clusters of genes similarly regulated by *Hfe* disruption in duodenum

Category	Term	<i>n</i>	EASE score
Cluster 1 (209 Affy IDs [177 genes])			
No functional category overrepresented			
Cluster 3 (141 Affy IDs [131 genes])			
GOTERM_BP	Defense response	21	1.6×10^{-7}
GOTERM_BP	Induction of apoptosis	6	1.7×10^{-3}

Affymetrix probesets in the different k-means clusters shown in Additional data file 2 were compared with Affymetrix MG-430 2.0 probe sets for over-representation of gene categories, using the DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) functional annotation tool. The Category column shows the original database/resource from which the terms originate. The Term column indicates enriched terms associated with the gene list. The *n* column indicates the number of genes involved in the term. The expression analysis systematic explorer (EASE) score is a modified Fisher exact *P* value [51]. BP, biological process; GO, Gene Ontology.

Correlation of expression profiling with studies on *Hfe* modifiers

Differences in liver or duodenal expression of specific genes between B6 and D2 wild-type mice could contribute to the divergent phenotypes induced by *Hfe* disruption in the two strains. We therefore established a list of the 1,538 transcripts with differential expression between wild-type D2 and B6 mice (Additional data file 3). In order to relate genomic results to severity of hemochromatosis, we first identified 210

genes exhibiting differences in basal expression between strains or with expression regulation in response to *Hfe* disruption, which reside within the five *Hfe*-modifier regions that we previously mapped on chromosomes 3, 7, 8, 11, and 12 [10]. To identify those that could be potential candidates for disease severity, we used the WebQTL interface to map the loci that regulate the expression of these genes. The information necessary to map these regulatory loci was available for a subset of 139 of these 210 genes.

Table 5

Changes in expression of genes involved in iron metabolism

Gene	Protein	Major biochemical activity	Role	Organ	S-score		
					D2 KO versus D2 WT	B6 KO versus B6 WT	D2 WT versus B6 WT
Iron storage							
<i>Ftl1</i>	Ferritin L chain	Fe mineralization	Cytosolic storage	Liver	+1.70	+2.24	NS
Iron transport							
<i>Slc40a1</i>	Ferroportin	Membrane transporter	Cellular export	Liver	+3.18	+4.89	+3.94
<i>Abcg2</i>	Bcrp	Membrane transporter	Possible mitochondrial heme export	Liver	+2.97	NS	NS
<i>Sfxn2</i>	Sideroflexin2	Membrane transporter	Mitochondrial traffic	Liver	-2.38	-2.16	NS
<i>Slc25a37</i>	Mitoferrin	Membrane transporter	Mitochondrial traffic	Liver	NS	+2.28	NS
<i>Lcn2</i>	Lipocalin2	Siderophore iron binding	Traffic of siderophore-bound iron	Liver	-2.91	NS	NS
Receptors							
<i>Tfrc</i>	Transferrin receptor I	Transferrin binding	Transferrin iron uptake	Duodenum	-2.07	NS	NS
<i>Lrp1</i>	LRP/CD91	Hemopexin receptor	Hemopexin uptake	Liver	NS	-2.03	NS
Regulators							
<i>Ireb2</i>	IRP2	RNA binding	Control of cellular iron	Duodenum	+2.26	NS	-2.64
<i>Hamp1</i>	Hepcidin 1	Ferroportin binding	Control of systemic iron	Liver	-6.27	NS	-3.57
<i>Hamp2</i>	Hepcidin 2	?	?	Liver	-3.40	NS	+3.36
<i>Hfe</i>	HFE	TfR1 binding	?	Liver	-7.96	-8.96	-3.16
				Duodenum	-5.70	-7.32	NS
<i>Hfe2</i>	HJV	Neogenin binding	Control of hepcidin expression	Liver	NS	-2.01	NS
<i>Fxn</i>	Frataxin	Iron binding	Chaperon for Fe-S synthesis	Liver	NS	NS	-3.09
<i>Smad4</i>	Smad4	Transcription factor	Control of hepcidin expression	Liver	NS	NS	-3.59
				Duodenum	NS	NS	-5.05
<i>Usf2</i>	Usf2	Transcription factor	Control of hepcidin expression	Liver	NS	+2.08	NS
Oxidoreductases							
<i>Cybrd1</i>	Dcytb	Fe(III) reduction	Facilitates duodenal transport by DMT1	Duodenum	+2.97	NS	NS

Iron metabolism genes are cited in this table where significant expression variations in *Hfe*^{-/-} mice (knockout [KO]) or expression differences between wild-type (WT) strains were detected. S-scores were obtained as described in Material and Methods and are proportional to fold changes. Positive S-scores indicate that the genes are more highly expressed in KO than in WT mice, or in WT D2 than in WT B6 mice. NS, not significant.

We found that two genes on chromosome 3, four on chromosome 7, six on chromosome 8, 17 on chromosome 11, and one on chromosome 12 exhibited highly significant evidence for *cis* regulation (for regulation by a polymorphic variant between B6 and D2 mice located in the region of the gene itself; Table 6). None of them, except for *Hamp*, has yet been implicated in iron metabolism.

Discussion

Recent advances in the field of iron metabolism have elucidated basic processes of iron absorption and distribution in mammals [24]. However, many aspects of iron metabolism remain obscure, in particular the mechanisms by which HFE regulates iron absorption. In this study we investigated the expression patterns of 34,000 well characterized mouse genes in liver and duodenum of wild-type and *Hfe*^{-/-} mice of

two inbred strains with different susceptibilities to iron accumulation.

Variations in duodenal gene expression in *Hfe*-deficient mice, as compared with wild-type mice, are consistent with our previously reported hypothesis [9] that hyperabsorption of iron in these mice reflects an inappropriate iron deficiency signal that is sensed by duodenal enterocytes. Indeed, expression of the *Cybrd1* gene (encoding Dcytb, which converts dietary ferric iron to its ferrous form for transport by the divalent metal iron transporter Dmt1 to the duodenum) and the expression levels of several metal ion transporters, most notably the zinc transporters Zip4 (*Slc39a4*) and Zip14 (*Slc39a14*), were increased in the duodenum of *Hfe*^{-/-} D2 mice. Although *Hfe* knockout was previously shown to increase *Cybrd1* expression [11] and mucosal reductase activity near the villus tips [25], the increase in expression of the

Table 6

Genes differentially expressed between wild-type strains or regulated by *Hfe* deficiency, located within the chromosomal regions containing *Hfe*-modifiers, and with evidence for *cis* regulation

Gene name	Chromosome	Position (Mb)	Type	Position of linkage peak (Mb) for <i>cis</i> regulator	Max LRS for <i>cis</i> regulator
<i>Cca2</i>	3	144.73	D	144.70 to 144.94	46.7
<i>Lphn2</i>	3	148.87	S	149.36 to 151.27	15.5
<i>Uble1a</i>	7	15.49	S	15.19 to 15.53	51.53
<i>Ckap1</i>	7	29.93	S	29.49 to 30.12	53.8
<i>Hamp1/Hamp2</i>	7	30.63	L, S	30.43 to 34.11	18.9
<i>Fxyd5</i>	7	30.74	D	34.41 to 34.62	15.2
<i>Gpsn2</i>	8	86.46	S	83.77 to 85.83	15.2
<i>Ddx39</i>	8	86.61	L	86.07 to 88.74	12.7
<i>2410018C20Rik</i>	8	87.14	S	86.07 to 88.74	20.6
<i>Ier2</i>	8	87.55	L	86.07 to 88.74	15.9
<i>Gadd45gip1</i>	8	87.72	S	86.07 to 88.74	116.4
<i>Prdx2</i>	8	87.86	S	83.77 to 85.83	36.1
<i>Pttg1</i>	11	43.26	S	42.87 to 44.25	68.9
<i>5730409G07Rik</i>	11	45.79	S	42.21 to 46.06	16.4
<i>2900006B13Rik</i>	11	51.43	L, S	50.95 to 53.90	38.9
<i>Tnip1</i>	11	54.75	S	50.95 to 53.90	60.6
<i>Sparc</i>	11	55.24	S	55.24 to 55.92	26.1
<i>Guk1</i>	11	59.00	S	58.93 to 59.04	50.8
<i>Sat2</i>	11	69.44	S	69.42 to 70.27	133.2
<i>Mpdu1</i>	11	69.47	S	72.49 to 72.98	43.3
<i>Asgr2</i>	11	69.91	S	69.42 to 70.27	69.9
<i>Rabep1</i>	11	70.66	L	73.93 to 75.08	18.3
<i>Txn15</i>	11	72.02	S	67.96 to 68.74	11.1
<i>Pafah1b1</i>	11	74.49	L, S	75.29 to 76.41	14.5
<i>Crk</i>	11	75.50	L	76.76 to 76.83	10.5
<i>Ccl9</i>	11	83.39	L, S	88.48 to 89.36	36.9
<i>Bcas3</i>	11	85.17	S	89.57 to 89.92	12.2
<i>Dhx40</i>	11	86.59	S	83.52 to 88.25	36.8
<i>Scpep1</i>	11	88.74	L, S	83.52 to 88.25	39.2
<i>9030617003Rik</i>	12	101.18	S	100.97 to 102.71	51.5

The Chromosome and Position columns indicate, respectively, the chromosome number and position (in megabases [Mb]) within one of the five *Hfe*-modifier intervals of the gene with expression variation. In the Type column, S indicates that expression differed between wild-type strains, D that expression was modulated by *Hfe* deficiency in duodenum, and L that expression was modulated by *Hfe* deficiency in liver. Max LRS indicates the maximum likelihood ratio statistic in favor of the *cis* regulator. Position of linkage peak for *cis* regulator and maximum LRS were retrieved from the WebQTL interface.

two zinc transporters has not yet been observed and is interesting within the context of recent reports indicating that Zip4 is a minor intestinal iron importer [26] and that Zip14 mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells [27]. Of note, *Hfe*^{-/-} D2 mice also have increased duodenal expression of mucin and spermine synthase. Increased binding of Dmt1 to mucin in vesicles near the intestinal surface was observed in iron-deficient animals, which is believed to facilitate iron internalization [19], and recent studies have suggested that polyamines such as spermine modulate iron uptake [18].

Although it cannot be excluded that a slight upregulation of the *Cybrd1*, *Slc39a4*, and *Muc3* messengers also exists in *Hfe*^{-/-} B6 mice but does not reach a level detectable by microarray or RT-PCR analysis, the differential expression of these genes between *Hfe*^{-/-} D2 and B6 mice does not appear to be related to the individual capacity of the two strains to respond to an iron-deficiency signal. Indeed, as shown in Figure 3, wild-type mice of both B6 and D2 genetic backgrounds fed an iron-deficient diet have induced duodenal expression of *Cybrd1*, *Slc39a4*, and *Muc3*, as compared with wild-type mice of the same genetic backgrounds fed a standard diet. Rather, the

differences between *Hfe*^{-/-} D2 and B6 mice appear to be related to their varying capacity to perceive the iron-deficiency signal when *Hfe* is not functional. This probably explains the differences in extent of liver iron accumulation between the two strains.

As a result of *Hfe* deficiency, both strains accumulate iron, although the extent of iron overload is more severe in the D2 strain. This leads, in liver, to variations in expression of genes encoding glutathione synthetases, glutathione *S*-transferases, UDP-glucuronosyltransferases, vanin, ferroportin, the ferritin light chain, and heme oxygenase. These variations are encountered at a significant level more often in the liver of *Hfe*^{-/-} D2 mice than in that of B6 mice, which is consistent with the observation that *Hfe*^{-/-} D2 mice are more heavily iron loaded than *Hfe*^{-/-} B6 mice. Global expression profiling of *Hfe* wild-type mice of both strains fed an iron-supplemented diet for 3 weeks showed that they also had significant induction of several genes that are involved in the glutathione metabolism pathway or with UDP-glucuronosyltransferase activity (data not shown). In addition, these mice fed an iron-supplemented diet exhibited significant induction of *Ftl1*, *Fpn1*, and *Hmox1* genes, as shown in Figure 3, which reinforces the hypothesis that these modifications are the consequence of iron overload and lipid peroxidation, and contribute to hepatoprotection [28].

Finally, as shown in Figure 3, only slight downregulation in levels of *Hamp1* and *Hamp2* was observed in *Hfe*^{-/-} D2 mice, and no significant variation was observed in *Hfe*^{-/-} B6 mice. These observations run counter to the marked induction of *Hamp1* and *Hamp2* expression by secondary iron overload, and virtually complete repression by secondary iron deficiency in wild-type mice of both B6 and D2 genetic backgrounds. In contrast to previous hypotheses regarding hepcidin regulation by *Hfe*, we speculate that hepcidin expression in *Hfe*-deficient mice might be subject to the counter-regulatory and conflicting influences of an inappropriate iron deficiency signal (which tends to downregulate hepcidin transcripts) and iron overload (which tends to upregulate them). This probably explains why, globally, the hepcidin transcripts are not largely altered by *Hfe* disruption, despite the excess iron accumulated by *Hfe*-deficient mice. This could also explain why young, 4-week-old *Hfe*^{-/-} mice exhibit reduced hepcidin expression, as compared with wild-type mice of the same genetic background [29], whereas this

downregulation disappears in more severely iron loaded 8-week-old mice.

Notably, we observed enrichment of functional gene categories associated with lipid metabolism among genes that were downregulated in liver of *Hfe*^{-/-} mice. First, we noted an important downregulation of transcripts encoding key enzymes in the conversion of cholesterol to bile acids in *Hfe*^{-/-} D2 mice. Dietary iron overload in rats [30] was previously shown to affect the activity of key intracellular enzymes in cholesterol metabolism, in particular cholesterol 7 α -hydroxylase (*Cyp7a1*), and was attributed to a marked membrane lipid peroxidation. The strain specificity of the downregulation of these transcripts may therefore be related to the variable iron accumulation observed in mice of the two genetic backgrounds. *Cyp7a1* controls the main pathway whereby cholesterol is removed from the body in mammals. Thus, a decrease in cholesterol catabolism could lead to accumulation of plasma cholesterol and explain our previous observation that *Hfe*^{-/-} mice of the D2 genetic background have slightly higher plasma cholesterol levels than D2 wild-type mice (Table 7). Second, we observed striking and coordinated downregulation of multiple genes that regulate mitochondrial fatty acid β -oxidation in the *Hfe*^{-/-} mice of both strains, as well as variations in gene expression levels, suggesting that the flux through the TCA cycle is maintained at a low level to adapt to the downregulated β -oxidation in these *Hfe*^{-/-} mice. This suggests altered mitochondrial functioning induced by lack of *Hfe*, which warrants further investigation. Interestingly, the observed variations in the expression of genes encoding proteins involved in the mitochondrial iron or heme traffic, such as *Sfxn2*, *Slc25a37*, and *Abcg2*, are also compatible with the hypothesis that mitochondrial iron homeostasis is affected in *Hfe*^{-/-} mice.

The reasons why *Hfe*-deficient mice incorrectly perceive the body's iron needs are still unknown, and one of our goals in this study was to identify gene expression changes that could help to elucidate why lack of functional *Hfe* leads to an inappropriate iron deficiency signal. Interestingly, we observed that the expression levels of several genes that participate in mitochondrial iron traffic and heme biosynthesis were altered in *Hfe*-deficient mice; in particular, the mRNA level of hepatic sideroflexin *Sfxn2* was downregulated in both strains. Because of sequence and structural similarity to sideroflexin 1, sideroflexin 2 was suggested to be in the mitochondrion

Figure 3 (see following page)

mRNA expression changes: *Hfe* disruption versus secondary iron deficiency or iron overload. shown is a comparison of mRNA expression changes induced by *Hfe* disruption with changes induced by secondary iron deficiency or iron overload within the B6 and D2 strains. Quantification of duodenal (*Cybrd1*, *Slc39a4*, and *Muc3*) or liver (*Ftl1*, *Fpn1*, *Hmox1*, *Hamp1*, and *Hamp2*) mRNAs was performed by quantitative real-time PCR on 7-week-old mice fed a diet containing 280 mg Fe/kg (wild-type [WT] controls and *Hfe*^{-/-} mice), an iron-deficient, or an iron-supplemented diet [40] for 3 weeks before they were killed. Expression values for each mouse were calculated as described in Materials and methods, and divided by the mean expression in control WT mice of the same genetic background. Error bars denote standard deviations. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

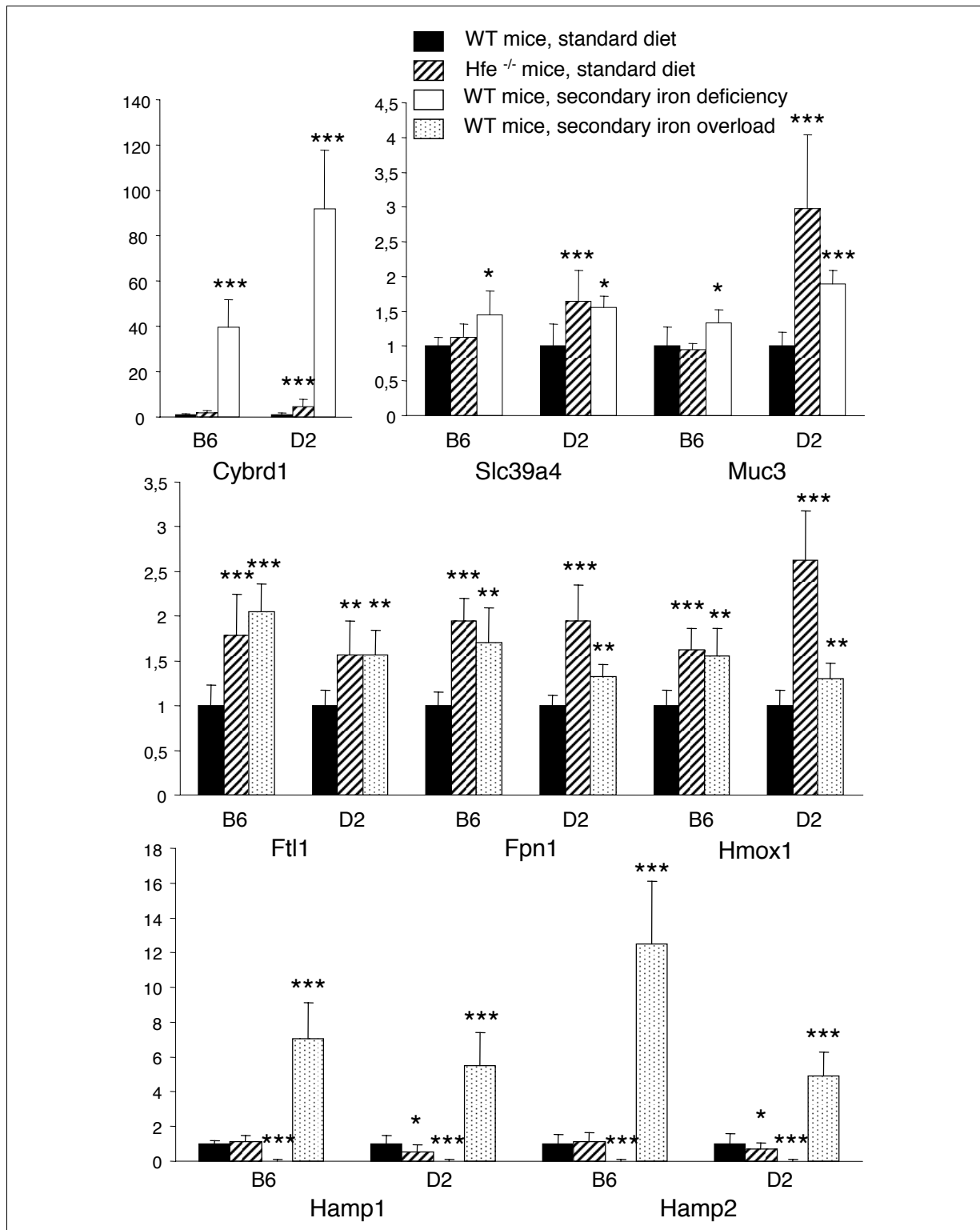


Figure 3 (see legend on previous page)

Table 7**Effect of *Hfe* disruption on plasma lipid profiles**

	C57BL/6 strain			DBA/2 strain		
	<i>Hfe</i> ^{-/-}	<i>Hfe</i> ^{+/+}	<i>P</i>	<i>Hfe</i> ^{-/-}	<i>Hfe</i> ^{+/+}	<i>P</i>
Total cholesterol (mg/ml)	0.93 ± 0.24	1.07 ± 0.05	0.28	1.46 ± 0.25	1.17 ± 0.13	0.04
HDL-cholesterol (mg/ml)	0.71 ± 0.18	0.86 ± 0.05	0.16	1.14 ± 0.11	0.97 ± 0.08	0.02

Hfe^{-/-} and *Hfe*^{+/+} mice (five males per group) were killed at age 7 weeks. Blood was removed and plasma lipid levels were determined by chromatography. Results are expressed as mean ± standard deviation in each group. *P* values for comparisons of plasma lipid levels between *Hfe*^{-/-} and *Hfe*^{+/+} mice of each strain were obtained by Student's *t*-test. HDL, high-density lipoprotein.

[31], and in a proteomic study [32] it was proved to be located in the mitochondrial inner membrane. Whether, like sideroflexin 1, sideroflexin 2 facilitates transport of pyridoxine or another Alas co-factor into the mitochondrion remains to be demonstrated. However, if this were the case, then *Hfe*^{-/-} mice with lower expression of *Sfxn2* than wild-type mice would have reduced levels of Alas co-factor in the mitochondrion and have lower efficacy of heme biosynthesis, thus leading to the inappropriate iron-deficiency signal and the consequent upregulation of intestinal iron absorption. This would also be compatible with the paradoxical upregulation of δ -aminolevulinic acid synthase (*Alas2*), mitoferrin (*Slc25a37*; a mitochondrial iron importer essential for heme biosynthesis), and Bcrp (*Abcg2*; a possible mitochondrial heme exporter [24,33]) observed in these mice. Although this possible mechanism is still speculative, it would establish a link between *Hfe* and the mitochondrion in regulation of iron homeostasis. It is also consistent with recent studies suggesting that intermediates in heme metabolism, in particular levels of hepatic 5-amino-levulinate, regulate intestinal iron absorption [34-36].

Our expression studies also identified a large number of genes exhibiting differences in basal expression between strains or with regulation in response to *Hfe* disruption, and which reside within one of the five chromosomal regions harboring *Hfe*-modifier genes [10]. In order to relate these genomics findings to severity of hemochromatosis, we used the information available from WebQTL and found that several of these genes exhibited highly significant evidence for *cis* regulation. For example, expression profiling identified four genes residing in the critical region on chromosome 7, which were differentially expressed between B6 and D2 mice, and whose basal expression was linked to a chromosomal position coinciding with the gene itself. Among those, *Hamp* was also regulated by *Hfe* disruption in the liver of D2 mice. Previous studies have implicated *Hamp* in the severity of hemochromatosis [37,38], thus supporting recent suggestions that expression profiling can accelerate identification of genes that control complex traits [39]. Although none of the other *cis*-regulated genes has yet been implicated in iron metabolism, these genes are attractive candidate modifiers for phenotypic expression of hemochromatosis and warrant further

investigation. Additional work is also needed to identify possible *trans* regulators in the chromosomal regions that harboring *Hfe*-modifier genes, because those could be candidate modifiers as well.

Conclusion

In this study we investigated *Hfe* deficiency induced gene expression profiles in the liver and the duodenum of B6 and D2 mice, which are two inbred mouse strains with divergent iron loading severity in response to *Hfe* disruption. We identified organ-specific patterns of gene expression that contribute novel insight into the mechanisms of *Hfe* action in liver and duodenum. We also identified multiple genes with differential expression between wild-type or between *Hfe*-deficient strains, which had expression-regulating loci overlapping with disease modifier loci. Superimposing expression data and genetic data has thus yielded a testable set of hypotheses regarding genes related to iron loading severity and signaling events evoked by *Hfe* deficiency, with potential functional relevance to human hemochromatosis.

Materials and methods

Mice and tissue collection

Male *Hfe*^{-/-} (knockout) mice of the C57BL/6 (B6) and DBA/2 (D2) backgrounds were produced in the Institut Fédératif de Recherche (IFR) 30 animal facility [9]. Wild-type *Hfe*^{+/+} controls (wild-type) of the same sex and genetic backgrounds were purchased from the Centre d'Élevage Robert Janvier (Le Genest St-Isle, France). The studied population consisted of 16 wild-type mice (eight B6 and eight D2) and 16 knockout mice (eight B6 and eight D2). Three mice in each of the four genotype/strain groups were used for genome-wide expression profiling, and five for validation of microarray results. Wild-type and knockout mice were housed in the IFR30 animal facility and had free access to water and R03 diet (UAR, Epinay-sur-Orge, France) containing 280 mg Fe/kg. All mice were analyzed at 7 weeks of age and fasted for 14 hours before they were killed. Experimental protocols were approved by the Midi-Pyrénées Animal Ethics Committee. Liver and duodenum were dissected for RNA isolation, rapidly frozen, and stored in liquid nitrogen. Nonheme iron was quantified as

described previously [10]. Mean \pm standard deviation iron concentrations were 304 ± 50 , 456 ± 68 , 946 ± 110 , and $2,937 \pm 282$ $\mu\text{g/g}$ dry weight in liver of B6 wild-type, D2 wild-type, B6 knockout, and D2 knockout mice, respectively. Mice fed an iron-deficient or an iron-supplemented diet were obtained as described previously [40]. Liver and duodenum samples were used to compare gene expression variations resulting from lack of functional *Hfe* with those induced by secondary iron deficiency or iron overload.

RNA isolation, preparation of labeled cRNA, and microarray hybridization

Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA quality was checked on RNA 6000 Nano chips using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). RNA samples used for chip experiments all had RNA Integrity Numbers [41] ranging from 9 to 10. Double-stranded cDNA and biotin-labeled cRNA were synthesized using the Affymetrix cDNA synthesis and IVT Labeling kits. Fragmented cRNAs (15 μg) were hybridized to 24 GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), in accordance with the standard protocol of the manufacturer. The arrays were scanned with a GeneChip[®] Scanner 3000 (Affymetrix) and raw image files were converted to probe set data (*.CEL files), using the Affymetrix GeneChip[®] Operating Software. Expression microarray data have been submitted to the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus repository (accession number Genbank: [GSE7357](#)).

Microarray data analysis

All the analyses were performed using Bioconductor, an open source software for the analysis of genomic data rooted in the statistical computing environment R [42]. Arrays were normalized to have the same target mean intensity of 100. Quality control metrics were first obtained using the simpleaffy Bioconductor package [43]. Average background and the number of genes called present (42% to 48% in liver and 50% to 55% in duodenum) were similar across all chips. All arrays had a scale factor lower than 1.4-fold away from the average scale factor for all samples, a GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 3':5' ratio at around 1 and a β -actin 3':5' ratio of under 2.2. Furthermore, plots of mean intensity per probe position averaged over all probe sets had very similar slopes for the different arrays, permitting valid comparisons within genes across arrays. Genes that were not reliably detected in at least three liver samples or three duodenum samples, in accordance with the Affymetrix detection call algorithm, were excluded from further analysis [44]. Of the 45,101 probe sets represented on the GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 arrays, 28,031 were retained for assessing changes in gene expression between groups of mice.

The S-score algorithm, available in the Bioconductor Sscore package [45], was applied to compare hybridization signals between two arrays. It uses the statistical power of all oligo-

nucleotide pairs for a given gene and is thus particularly useful for studies having limited numbers of Affymetrix microarrays [46]. S-scores have a normal distribution with mean of 0 and standard deviation of 1, and are correlated with the fold change. Three types of comparisons were made: S-scores were calculated for D2 wild-type versus B6 wild-type samples within each organ to examine basal strain expression differences between D2 and B6 mice; S-scores were calculated for knockout versus wild-type samples within each organ and mouse strain to study responses to *Hfe* disruption; and control S-scores were calculated between biologic replicates within the different groups. To reduce the contribution of biologic and technical noise, S-scores were divided by the greater of 1 or the standard deviation of control S-scores within each organ. This general approach has been applied previously to microarrays [47] and reduces variance across experimental replicates [48]. Statistical analysis of microarrays (SAM) [49], a rank-based permutation method, was carried out to identify genes with S-scores significantly different from 0, using the R samr package. Genes regulated by *Hfe* deficiency were identified for each strain/organ combination by performing one-class SAM on knockout versus wild-type scores, using a false discovery rate of $\leq 10\%$ to avoid eliminating genes that may be biologically important and increase our ability to populate functional networks of genes in subsequent bioinformatics studies. *Hfe*-regulated transcripts identified by SAM were filtered to count transcripts with an average S-score over three observations of ≥ 2 or ≤ -2 . Genes that exhibited both significant and reproducible changes were further analyzed for correlated gene expression patterns by application of k-means clustering, as described by Eisen and coworkers [50]. Genes differentially expressed between mice strains were identified by one-class SAM on wild-type D2 versus wild-type B6 S-scores, using a false discovery rate of $\leq 1\%$. This gene list was further filtered for an average S-score of ≥ 2.6 or ≤ -2.6 over three observations.

Bioinformatics analysis of gene expression patterns

DAVID (2007), a functional annotation tool [51,52], was used to identify enriched biologic themes and to discover function-related enriched gene groups among clusters, compared with all genes present on the Mouse Genome 430 2.0 array. The following annotation groupings were analyzed for overrepresentation in gene lists: the Protein Information Resource keywords, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes and BioCarta pathways, and Gene Ontology biological processes and molecular functions. Results were filtered to remove categories with EASE (expression analysis systematic explorer) scores, based on a Fisher exact test, greater than 0.05. Redundant categories with the same gene members were removed to yield a single representative category. The chromosomal location of all genes exhibiting differential basal expression between strains or regulation by *Hfe* deficiency was superimposed on support intervals for hepatic iron loading modifiers on mouse chromosomes 3, 7, 8, 11, and 12 [10], and a list of differentially expressed genes mapping to these intervals was

Table 8

Sequences of the primers used for validation of microarray results by real-time PCR

Gene	GeneBank accession	Forward primer	Reverse primer	Amplification efficiency
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'-CTG GTT AAG CAG TAC AGC CCC AA-3'	5'-CAG GAG GTC CTT TTC ACC AGC-3'	1.99
<i>Aox1</i>	NM_009676	5'-CAC CCT GTA TTC ATC TAA GGG CCT-3'	5'-CAC TGC ATC ATG GAT GGC AA-3'	1.92
<i>Ftl</i>	NM_01024	5'-GGA GAA GAA CCT GAA TCA GGC C-3'	5'-GGT TGC CCA TCT TCT TGA TGA G-3'	2.00
<i>Fpn1</i>	NM_016917	5'-CAT TGC TGC TAG AAT CGG TCT T-3'	5'-GCA ACT GTG TCA CCG TCA AAT-3'	1.97
<i>Hmox1</i>	NM_010442	5'-CAG ATG GCG TCA CTT CGT CA-3'	5'-CTC TGC AGG GGC AGT ATC TTG-3'	2.00
<i>Vanin1</i>	NM_011704	5'-GGC TGC ACA CCG TGG AAG-3'	5'-GGT AAA AGC CGT GTC CAC TGA A-3'	1.90
<i>Por</i>	NM_008898	5'-GCC TCG TCG TCT AAG GTC CA-3'	5'-GAC TTC GCT TCA TAC TCC ACA GC-3'	1.99
<i>Cpt1a</i>	NM_013495	5'-GAC CCC ACA ACA ACG GCA G-3'	5'-ATG GCG AGG CGG TAC AGG T-3'	2.00
<i>Aco2</i>	NM_080633	5'-GAC CAT TCA AGG CCT GAA GG-3'	5'-ACG CAC TTC AGA GGC TTT CC-3'	2.00
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824	5'-GCT CTG GAG GGA ATG CCA T-3'	5'-CCG CAG AGC CTC CTT GAT G-3'	2.00
<i>Hsd3b5</i>	NM_008295	5'-AGA GGA ATT GTC CAA GCT GCA-3'	5'-TGT GGA TGA CAG CAG ACA TGC-3'	1.99
<i>Hfe2</i>	NM_027126	5'-ACC ACC ATC CGG AAG ATC ACT-3'	5'-AAG GCT GCA GGA AGA TTG TCC-3'	2.00
<i>Hamp1</i>	AF_503444	5'-AAG CAG GGC AGA CAT TGC GAT-3'	5'-CAG GAT GTG GCT CTA GGC TAT GT-3'	1.98
<i>Hamp2</i>	AY_232841	5'-AAG CAG GGC AGA CAT TGC GAT-3'	5'-GGA TGT GGC TCT AGG CTC TCT ATT-3'	2.00
<i>Usf2</i>	NM_011680	5'-ATG GAA CCA GAA CTC CTC GAG A-3'	5'-CCG TTC CAC TTC ATT GTG CTG-3'	1.93
<i>Lcn2</i>	NM_008491	5'-TCT GTC CCC ACC GAC CAA T-3'	5'-CCA GTC AGC CAC ACT CAC CAC-3'	1.99
<i>Sfxn2</i>	NM_053196	5'-CGC ACA AGT GGT TAT CTC TCG G-3'	5'-CCA TGA TGA CAG GCA ACA GGA-3'	1.99
<i>Alas2</i>	NM_009653	5'-TGG AAC TCT TGG CAA GGC C-3'	5'-CAA GTC CCG AGT GCT GGC T-3'	1.99
<i>Slc25a37</i>	NM_026331	5'-GAG CAC TCC ATC ATG TAC CCG-3'	5'-TGG ATT CAA ACT CTG CAT CCG-3'	2.00
<i>Abcg2</i>	NM_011920	5'-TTG GCT GTC CTG GCT TCA GTA C-3'	5'-CAA AGC TGT GAA GCC ATA TCG A-3'	1.99
<i>Cybrd1</i>	AF_354666	5'-GCA ACG GGC TCG AGT TTA-3'	5'-TTC CAG GTC CAT GGC AGT CT-3'	1.98
<i>Slc39a4</i>	NM_028064	5'-GCG ACT GAG AGC AGA GCT GA-3'	5'-GTT GTG TAC CGC GTC GCC-3'	2.00
<i>Mucin3</i>	NM_355711	5'-TCG TGT TCT CCA TCC GCT TC-3'	5'-GAC ACT CTG GAC CGT TGC CT-3'	1.99
<i>Lcn13</i>	NM_153558	5'-TGT TTG TGC CAG AGA TCG GAG-3'	5'-GCT GGC TCA GCT GTT GCA G-3'	1.95
<i>Fmo3</i>	NM_008030	5'-GGA ACT TGC ACT TTG CCT TCT G-3'	5'-GGT GGT GCT ATT GCC ATA CCA-3'	1.96
<i>Clca4</i>	NM_139148	5'-GCC GTC ATA GAA GCT GAG AGT GG-3'	5'-AGC ACC TGC CCC GTT GTC-3'	2.00

Hfe^{-/-} and *Hfe*^{+/+} mice (five males per group) were killed at age 7 weeks. Blood was removed and plasma lipid levels were determined by chromatography. Results are expressed as mean ± standard deviation in each group. *P* values for comparisons of plasma lipid levels between *Hfe*^{-/-} and *Hfe*^{+/+} mice of each strain were obtained by Student's *t*-test. HDL, high-density lipoprotein.

obtained. The WebQTL resource [53,54], which includes measures of mRNA expression in livers of 35 adult BXD recombinant inbred male mice obtained with Agilent G4121A microarrays, was used to link expression of the genes in this list to genetic markers and identify potential *cis*-regulators.

Validation of microarray results by real-time PCR

All primers were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR reactions were prepared with M-MLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green (Eurogentec, Seraing, Belgium), as described previously [9], and run in duplicate. GenBank accession numbers, forward (F) and reverse (R) primers, and measured PCR efficiencies for the genes to be validated are given in Table 8. For each mouse, an expression measure was calculated as $E_{GoI}^{Ct GoI} / E_{HPRT}^{Ct HPRT}$, where GoI is the gene of interest; HPRT is a transcript

with stable level between strains and genotypes, quantified to control for variation in cDNA amounts; *E* is the PCR reaction efficiency associated with either the gene of interest (E_{GoI}) or the reference gene (E_{HPRT}); and *Ct* is the cycle number at which fluorescence reaches a given threshold. Data were analyzed by one-factor (iron-deficient, standard, or iron-supplemented diet) or two-factor (chip/validation experiment and wild-type/knockout genotype) analysis of variance followed by Scheffe post-hoc tests using SAS software (version 9.1.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Abbreviations

DAVID, Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery; HFE, hereditary hemochromatosis protein; HH, hereditary hemochromatosis; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SAM, statistical analysis of microarrays; TCA, tricarboxylic acid.

Authors' contributions

HC and MPR designed the experiments, participated in their execution, analyzed the data, and wrote the manuscript. VD, LK, and DM assisted with the execution of the experiments. MA and JM provided conceptual expertise for functional annotation, and MM for statistical analysis. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Additional data files

The following additional data are available with the online version of this paper. Additional data file 1 lists genes significantly regulated by *Hfe* disruption in the liver of D2 or B6 mice, according to microarray analysis. Additional data file 2 lists genes significantly regulated by *Hfe* disruption in duodenum of D2 or B6 mice. Additional data file 3 lists genes differentially expressed in the liver or the duodenum of wild-type D2 and B6 mice.

Acknowledgements

The authors thank Corinne Senty and Maryline Calise (Service de Zootechnie, IFR30) for assistance with mouse breeding, Véronique Le Berre (Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, plateforme Transcriptome-Biopuces) and Julien Sarry (Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, plateforme Génomique) for skilled advice, François Tercé (Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, plateforme Lipidomique, plateforme Exploration Fonctionnelle) for lipid dosages, and Benoit Albaud (Institut Curie, plateforme Génomique Fonctionnelle) for realizing the microarray experiments.

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Réseau National des Génopoles (RNG), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, programme IRONGENES), and the European Commission (LSHM-CT-2006-037296: EUROIRON1).

References

1. Bothwell TH, MacPhail AP: **Hereditary hemochromatosis: etiological, pathologic, and clinical aspects.** *Semin Hematol* 1998, **35**:55-71.
2. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, et al.: **A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis.** *Nat Genet* 1996, **13**:399-408.
3. Carlson H, Zhang AS, Fleming WH, Enns CA: **The hereditary hemochromatosis protein, HFE, lowers intracellular iron levels independently of transferrin receptor 1 in TRVb cells.** *Blood* 2005, **105**:2564-2570.
4. Drakesmith H, Sweetland E, Schimanski L, Edwards J, Cowley D, Ashraf M, Bastin J, Townsend AR: **The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:15602-15607.
5. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T: **Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA.** *Lancet* 2002, **359**:211-218.
6. Bulaj ZJ, Ajioka RS, Phillips JD, LaSalle BA, Jorde LB, Griffen LM, Edwards CQ, Kushner JP: **Disease-related conditions in relatives of patients with hemochromatosis.** *N Engl J Med* 2000, **343**:1529-1535.
7. Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, Moret R, Schulze JB, Lebeau A, Schumann K: **Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:13312-13317.
8. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, Fei Y, Brunt EM, Ruddy DA, Prass CE, et al.: **HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:2492-2497.
9. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Borot N, Radosavljevic O, Loreal O,

- Brissot P, Gilfillan S, Bahram S, Coppin H, et al.: **Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains.** *Gastroenterology* 2002, **122**:745-751.
10. Bensaid M, Fruchon S, Mazeret C, Bahram S, Roth MP, Coppin H: **Multigenic control of hepatic iron loading in a murine model of hemochromatosis.** *Gastroenterology* 2004, **126**:1400-1408.
11. Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, DeGraaf J, Montross LK, Andrews NC, Hentze MW: **Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis.** *Nat Genet* 2003, **34**:102-107.
12. Cashman JR, Zhang J: **Human flavin-containing monooxygenases.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006, **46**:65-100.
13. Berruyer C, Martin FM, Castellano R, Macone A, Malergue F, Garrido-Urbani S, Millet V, Imbert J, Dupre S, Pitari G, et al.: **Vanin-1-/- mice exhibit a glutathione-mediated tissue resistance to oxidative stress.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:7214-7224.
14. Kaasik K, Lee CC: **Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals.** *Nature* 2004, **430**:467-471.
15. Abbaszade IG, Clarke TR, Park CH, Payne AH: **The mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins.** *Mol Endocrinol* 1995, **9**:1214-1222.
16. Guyonneau L, Murisier F, Rossier A, Moulin A, Beermann F: **Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:3396-3403.
17. Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, Ghishan FK: **Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **288**:G964-G971.
18. Gaboriau F, Kreder A, Clavreul N, Moulinoux JP, Delcros JG, Lescoat G: **Polyamine modulation of iron uptake in CHO cells.** *Biochem Pharmacol* 2004, **67**:1629-1637.
19. Simovich M, Hainsworth LN, Fields PA, Umbreit JN, Conrad ME: **Localization of the iron transport proteins Mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: the surprising role of mucin.** *Am J Hematol* 2003, **74**:32-45.
20. Cairo G, Bernuzzi F, Recalcati S: **A precious metal: iron, and essential nutrient for all cells.** *Genes Nutr* 2006, **1**:25-40.
21. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ, Ram GA: **Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated hemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis.** *Lancet* 2003, **361**:669-673.
22. Courselaud B, Troadec MB, Fruchon S, Ilyin G, Borot N, Leroyer P, Coppin H, Brissot P, Roth MP, Loreal O: **Strain and gender modulate hepatic hepcidin 1 and 2 mRNA expression in mice.** *Blood Cells Mol Dis* 2004, **32**:283-289.
23. Bayele HK, McArdle H, Srai SK: **Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor.** *Blood* 2006, **108**:4237-4245.
24. Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR: **Iron uptake and metabolism in the new millennium.** *Trends Cell Biol* 2007, **17**:93-100.
25. Simpson RJ, Debnam E, Beaumont N, Bahram S, Schumann K, Srai SK: **Duodenal mucosal reductase in wild-type and Hfe knockout mice on iron adequate, iron deficient, and iron rich feeding.** *Gut* 2003, **52**:510-513.
26. Gunshin H, Tohyama C, Vainshtein Y, Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC: **Metal distribution and gene expression profile in DMT1 knockout mice.** *Am J Hematol* 2007, **82**:508.
27. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ: **Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:13612-13617.
28. Farombi EO, Surh YJ: **Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection.** *J Biochem Mol Biol* 2006, **39**:479-491.
29. Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Sly WS, Fleming RE: **Decreased liver hepcidin expression in the hfe knockout mouse.** *Blood Cells Mol Dis* 2002, **29**:361-366.
30. Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E: **Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats.** *Hepatology* 1999, **29**:1809-1817.
31. Fleming MD, Campagna DR, Haslett JN, Trenor CC III, Andrews NC: **A mutation in a mitochondrial transmembrane protein is responsible for the pleiotropic hematological and skeletal phenotype of flexed-tail (ff) mice.** *Genes Dev* 2001, **15**:652-657.

32. Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC: **Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane.** *J Biol Chem* 2003, **278**:41566-41571.
33. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosling H, et al.: **The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:15649-15654.
34. Laftah AH, Raja K, Simpson RJ, Peters TJ: **Effect of Tin-mesoporphyrin, an inhibitor of haem catabolism, on intestinal iron absorption.** *Br J Haematol* 2003, **122**:298-304.
35. Laftah AH, Raja KB, Beaumont N, Simpson RJ, Deacon A, Solanky N, Srani SK, Peters TJ: **The effects of inhibition of haem biosynthesis by griseofulvin on intestinal iron absorption.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004, **94**:161-168.
36. Laftah AH, Raja KB, Latunde-Dada GO, Vergi T, McKie AT, Simpson RJ, Peters TJ: **Effect of altered iron metabolism on markers of haem biosynthesis and intestinal iron absorption in mice.** *Ann Hematol* 2005, **84**:177-182.
37. Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, Quere I, Mura C, Ferec C: **HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype.** *Blood* 2004, **103**:2835-2840.
38. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, McHugh PJ, Chapman RW, Pointon JJ, Wimhurst VL, et al.: **Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**:2241-2247.
39. Hitzemann R, Malmanger B, Reed C, Lawler M, Hitzemann B, Coulombe S, Buck K, Rademacher B, Walter N, Polyakov Y, et al.: **A strategy for the integration of QTL, gene expression, and sequence analyses.** *Mamm Genome* 2003, **14**:733-747.
40. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Loreal O, Brissot P, Borot N, Roth MP, Coppin H: **Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice.** *Gut* 2002, **51**:648-653.
41. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T: **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** *BMC Mol Biol* 2006, **7**:3.
42. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, et al.: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** *Genome Biol* 2004, **5**:R80.
43. Wilson CL, Miller CJ: **Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix quality control and data analysis.** *Bioinformatics* 2005, **21**:3683-3685.
44. McClintick JN, Edenberg HJ: **Effects of filtering by Present call on analysis of microarray experiments.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:49.
45. Kennedy RE, Kerns RT, Kong X, Archer KJ, Miles MF: **SScore: an R package for detecting differential gene expression without gene expression summaries.** *Bioinformatics* 2006, **22**:1272-1274.
46. Zhang L, Wang L, Ravindranathan A, Miles MF: **A new algorithm for analysis of oligonucleotide arrays: application to expression profiling in mouse brain regions.** *J Mol Biol* 2002, **317**:225-235.
47. Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, et al.: **Functional discovery via a compendium of expression profiles.** *Cell* 2000, **102**:109-126.
48. Kerns RT, Ravindranathan A, Hassan S, Cage MP, York T, Sikela JM, Williams RW, Miles MF: **Ethanol-responsive brain region expression networks: implications for behavioral responses to acute ethanol in DBA/2J versus C57BL/6J mice.** *J Neurosci* 2005, **25**:2255-2266.
49. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5116-5121.
50. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:14863-14868.
51. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA: **DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery.** *Genome Biol* 2003, **4**:P3.
52. **The DAVID Bioinformatics Resources 2007** [<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>]
53. Chesler EJ, Lu L, Wang J, Williams RW, Manly KF: **WebQTL: rapid exploratory analysis of gene expression and genetic networks for brain and behavior.** *Nat Neurosci* 2004, **7**:485-486.
54. **The WebQTL resource** [<http://www.genenetwork.org/>]

ABSTRACT

Iron, by virtue of its ability to accept or donate electrons, is essential for many of the biological reactions carried out by living systems. This same characteristic, however allows free iron in solution to form highly reactive oxygen species and to become toxic. The major source of iron is its absorption from the diet at the surface of the enterocytes. As there is no physiological means for excreting iron in mammals, systemic iron must be maintained by tight regulation to avoid potentially deleterious overload.

In some diseases like hereditary hemochromatosis (HH), one of the most common genetic disorder in northern Europe caused by a single mutation in the *HFE* gene, this regulation is disrupted. HH is characterized by high levels of iron absorption from the diet, leading to iron overload. In the absence of treatment, gradual deposition of iron in parenchymal tissues may lead to severe organ damage such as hepatic fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.

Hepcidin, a small peptide secreted by the liver, is the key regulator of intestinal iron absorption. It acts by binding to ferroportin, the only known iron exporter today, and induces its internalization and degradation. Its expression is regulated by the body iron content, enhanced by iron excess and repressed by iron deficiency. The role of the BMP-SMAD signaling pathway in directing hepcidin expression is now well established. BMPs bind two type I and two type II BMP receptors. This induces the phosphorylation of BMPR-I by BMPR-II and the activated complex, in turn, phosphorylates a complex composed of Smad1/5/8 proteins. The receptor activated Smads then form heteromeric complexes with the common mediator Smad4 and these translocate to the nucleus where they regulate the transcription of the hepcidin gene.

We have shown that, similarly to hepcidine, *Bmp6*, *Id1*, *Smad7* and *Atoh8* genes expression is significantly modulated genes by dietary iron in the mouse liver. We have found that targeted disruption of *Bmp6* in mice results in a rapid and severe iron overload as well as in a markedly reduced hepcidin expression. This work has provided evidence that BMP6 is critical to activate the signalling cascade directing hepcidin expression and body iron homeostasis. Finally, we have recently demonstrated using *Hfe* deficient mice that the increase in *Bmp6* gene expression secondary to iron overload is independent of HFE. We therefore suggest that HFE facilitates signal transduction initiated by the BMP6 ligand and that *Hfe* deficiency triggers iron overload by impairing hepatic BMP/SMAD signalling.

RESUME

Le fer est un élément indispensable à l'organisme. Il est impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que le transport de l'O₂ ou la respiration cellulaire et se caractérise par sa capacité à générer des radicaux libres. Le fer est apporté par l'alimentation et absorbé dans le duodénum au niveau des entérocytes. Il n'existe pas de système d'excrétion actif du fer et en cas d'absorption excessive celui-ci peut donc devenir toxique, en particulier pour le foie où il est stocké en grande majorité. L'absorption du fer nécessite donc d'être finement régulée en fonction des besoins afin d'éviter l'établissement d'une surcharge potentiellement délétère. Dans certaines maladies comme l'hémochromatose, une maladie génétique fréquente dans le nord de l'Europe, due à une mutation ponctuelle dans le gène *HFE*, cette régulation ne se fait plus correctement. Les apports sont supérieurs aux besoins ce qui conduit à une accumulation de fer dans le foie et, en l'absence de traitement, à un risque accru de cirrhose ou de cancer du foie.

L'entrée du fer dans l'organisme est régulée au niveau intestinal par l'hepcidine, un petit peptide synthétisé par le foie. A la membrane basolatérale de l'entérocyte, l'hepcidine lie la ferroportine, le seul exportateur de fer connu à ce jour, et induit son internalisation et sa dégradation, inhibant ainsi le passage du fer de l'entérocyte au compartiment sanguin. L'expression de l'hepcidine est modulée par le contenu en fer dans l'organisme, et donc stimulée lorsque le fer est présent en excès et à l'inverse diminuée lors de déficit en fer.

Il est désormais établi que l'expression de l'hepcidine est dirigée par la voie de signalisation des « Bone Morphogenetic Proteins ». L'activation d'un complexe de récepteurs membranaires par un ligand BMP va permettre la phosphorylation d'un complexe formé par les protéines Smad1/5/8 qui peut alors interagir avec Smad4, transloquer dans le noyau et activer la transcription de l'hepcidine.

Nous avons montré *in vivo* chez la souris que l'expression des gènes *Bmp6*, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* est, comme l'hepcidine, significativement modulée par le contenu en fer dans l'organisme. Nous avons ensuite mis en évidence le rôle essentiel de BMP6 dans l'activation de la voie des BMPs en réponse au fer en étudiant des souris *Bmp6*^{-/-}. En effet, ces souris présentent une surcharge en fer multiviscérale ainsi qu'une perte drastique de l'expression de l'hepcidine.

Enfin, nous avons montré à l'aide de souris *Hfe*^{-/-} que, d'une part, la stimulation de l'expression de *Bmp6* était indépendante de HFE et, d'autre part, que HFE est nécessaire à la transduction du signal initié par BMP6. HFE interviendrait dans la cascade de signalisation BMP6/Smad pour réguler l'expression de l'hepcidine en aval de BMP6 en facilitant, par un mécanisme encore inconnu, la phosphorylation des protéines Smad1/5 et 8.

ABSTRACT

Role of BMP6 and HFE in the regulation of iron homeostasis

Iron is essential for many of the biological reactions carried out by living systems. However, free iron in solution can form highly reactive oxygen species and become toxic. The major source of iron is its absorption from the diet at the surface of the enterocytes. As there is no physiological means for excreting iron in mammals, systemic iron must be maintained by tight regulation to avoid potentially deleterious overload.

In some diseases like hereditary hemochromatosis (HH), one of the most common genetic disorder in northern Europe caused by a single mutation in the *HFE* gene, this regulation is disrupted. In the absence of treatment, gradual deposition of iron in parenchymal tissues may lead to severe organ damage such as hepatic fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.

Hepcidin, a peptide secreted by the liver, is the key regulator of intestinal iron absorption. It binds to ferroportin, the only known iron exporter today, and induces its degradation. Its expression is regulated by the body iron content, enhanced by iron excess and repressed by iron deficiency, and directed by the BMP-SMAD signaling pathway.

We have shown that, similarly to hepcidine, *Bmp6*, *Id1*, *Smad7* and *Atoh8* genes expression is significantly modulated genes by dietary iron in the mouse liver. Using *Bmp6* KO mice, we have provided evidence that BMP6 is critical to activate the signalling cascade directing hepcidin expression and body iron homeostasis. Finally, we have demonstrated using *Hfe* deficient mice that the increase in *Bmp6* gene expression secondary to iron overload is independent of HFE and that HFE is implicated in the BMP6/Smad signalling cascade directing hepcidin expression.

AUTEUR : Léon KAUTZ

TITRE : Rôle de BMP6 et de HFE dans la régulation de l'entrée du fer dans l'organisme

DIRECTEUR DE THESE : Dr Marie-Paule ROTH & Hélène COPPIN

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : CHU Purpan, Toulouse, le 18 Décembre 2009

RESUME

Le fer est un élément indispensable à l'organisme pour de nombreux processus biologiques et se caractérise par sa capacité à générer des radicaux libres. Il est apporté par l'alimentation mais il n'existe pas de système d'excrétion actif du fer. En cas d'absorption excessive, il peut rapidement devenir toxique, en particulier pour le foie où il est stocké en grande majorité. L'absorption du fer nécessite donc d'être finement régulée en fonction des besoins afin d'éviter l'établissement d'une surcharge potentiellement délétère. Dans certaines maladies comme l'hémochromatose, une maladie génétique due à une mutation ponctuelle dans le gène *HFE*, cette régulation est biaisée et le fer s'accumule dans le foie.

L'entrée du fer dans l'organisme est régulée au niveau intestinal par l'hepcidine, un peptide synthétisé par le foie. L'hepcidine lie la ferroportine, le seul exportateur de fer connu à ce jour, et induit son internalisation et sa dégradation, inhibant ainsi le passage du fer au compartiment sanguin. L'expression de l'hepcidine est modulée par le contenu en fer dans l'organisme et dirigée par la voie de signalisation des « Bone Morphogenetic Proteins ».

Nous avons montré *in vivo* chez la souris que l'expression des gènes *Bmp6*, *Smad7*, *Id1* et *Atoh8* est, comme l'hepcidine, modulée par le contenu en fer dans l'organisme. Nous avons ensuite mis en évidence le rôle essentiel de BMP6 dans l'activation de la voie des BMPs en réponse au fer en étudiant des souris *Bmp6*^{-/-}. Enfin, nous avons montré à l'aide de souris *Hfe*^{-/-} que l'expression de *Bmp6* était indépendante de HFE et que HFE interviendrait dans la cascade de signalisation BMP6/Smad pour réguler l'expression de l'hepcidine.

MOTS CLEFS : hémochromatose, surcharge en fer hépatique, régulation, absorption, hepcidine, Bone Morphogenetic Protein

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Physiopathologie moléculaire, cellulaire et intégrée

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

INSERM U563, IFR150, CPTP
CHU Purpan, Place Baylac
Département de Génétique, Equipe MP.ROTH
Bâtiment B, étage 5
31059 Toulouse cedex 03