

Université de Montréal

# **Mutations du gène *HFE* dans le cancer épithélial de l'ovaire**

Par

Sanae Medelci

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en Sciences Biomédicales

Décembre 2008

© Sanae Medelci, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Mutations du gène *HFE* dans le cancer épithélial de l'ovaire

Présentée par :  
Sanae Medelci

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Anne-Marie Mes-Massons, président-rapporteur  
D<sup>r</sup> Manuela Santos, directeur de recherche  
D<sup>r</sup> Euridice Carmona, membre du jury

Décembre 2008

Thèse acceptée le : 4 août 2009

## Résumé

Le cancer épithélial de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus agressif avec le plus haut taux de mortalité. La croissance des cellules cancéreuses de l’ovaire est limitée par les nutriments de l’environnement, le fer étant un des éléments indispensables à leur prolifération. L’hémochromatose héréditaire est une maladie associée à une accumulation corporelle de fer. Cette maladie est liée à deux mutations majeures du gène *HFE* soit H63D et C282Y. Étant donnée l’influence de la protéine HFE sur l’entrée du fer dans la cellule, des mutations du gène *HFE* pourraient être associées à une croissance rapide des cellules cancéreuses. Des études de génotypage du gène *HFE* effectuées chez 526 patientes avec cancer épithélial de l’ovaire, ont révélées une fréquence allélique de la mutation C282Y significativement plus élevées chez les patientes avec tumeur ovarienne comparativement aux patientes du groupe contrôle (5.9% versus 1.3%,  $p = 0.02$ ). De plus, le taux de survie des patientes avec mutations C282Y et tumeur ovarienne de G3, après 2 ans, est faible (20%) lorsque comparé à celui des patientes sans mutations (60%,  $p = 0.005$ ). Une analyse de régression multivariée de Cox a démontrée un risque relatif de 3.1, suggérant que les patientes avec mutations C282Y ont 3 fois plus de chance d’avoir une faible survie ( $p=0.001$ ). Également, des études de corrélation ont démontrées que les niveaux de ferritine du sérum étaient plus élevés chez les patientes avec grade avancé du cancer épithélial de l’ovaire ( $r = 0.445$  et  $p= 0.00001$ ), suggérant que ce paramètre pourrait servir comme marqueur tumoral. Afin de comprendre ces résultats, nous avons tout d’abord étudiés l’influence des mutations *HFE* sur les cellules cancéreuses. Pour ce faire, la lignée du cancer de l’ovaire TOV-112D, homozygote pour la mutation C282Y, a été transfectée avec les vecteurs  $HFE_{wt}$  et  $HFE_{C282Y}$ . Bien qu’aucune différence significative n’ait été trouvée en termes de TfR totaux, des analyses par FACS ont démontrées un phénotype de déficience de fer pour les clones stables  $HFE_{wt}$ . *In vitro*, la restauration de la protéine HFE, dans la lignée TOV-112D du cancer de l’ovaire, n’influence pas la croissance cellulaire. Ensuite, nous avons étudiés l’influence des niveaux de fer sur la progression tumorale. Une expérience *in vivo* préliminaire a démontré une tendance à un volume tumoral supérieur dans un modèle de souris de surcharge de fer,  $HfeRag1^{-/-}$ . De plus, les souris  $HfeRag1^{-/-}$ , injectées avec la lignée du cancer de l’ovaire TOV-21G, ont montrées des niveaux significativement plus faibles de fer sérique comparativement à leur contrôle (fer sérique  $40 \pm 7 \mu M$  versus  $27 \pm 6 \mu M$ ,  $p = 0.001$ ). En conclusion, des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre davantage le rôle des mutations *HFE* sur la progression tumorale. Notamment, les niveaux élevés de fer pourraient rendre les cellules tumorales résistantes aux traitements ou encore, augmenter la toxicité et ainsi, contribuer à un mauvais pronostique.

**Mots-clés :** Cancer de l’ovaire, Fer, HFE, mutations, prolifération, C282Y, survie, marqueur tumoral, ferritine,  $HfeRag1^{-/-}$

## Abstract

Epithelial ovarian cancer is the most aggressive gynecological cancer with the highest mortality rates. Growth of the ovarian cancer cells is limited by nutrients in the environment; iron being one of the elements essential to their proliferation. Hereditary hemochromatosis is a disease associated with an accumulation of body iron, and is linked to two mutations of the *HFE* gene including C282Y and H63D. Given the influence of HFE protein on the entry of iron in the cell, mutations in the *HFE* gene may be associated with rapid growth of cancer cells. By genotyping the *HFE* gene of 526 patients with epithelial ovarian cancer, we have found that the allelic frequency of the C282Y mutation is significantly higher in patients with ovarian cancer compared to patients in the control group (5.9% versus 1.3%  $p = 0.02$ ). Moreover, the 2-year survival rate, of patients with C282Y mutations and G3 ovarian tumor, is low (20%) when compared to patients without mutations (60%,  $p = 0.005$ ). A multivariate survival analysis, using Cox's regression model, also showed a hazard ratio value of 3.1, suggesting that patients with the C282Y mutation are 3 times more likely to have a poor survival ( $p = 0.001$ ). As well, correlation studies have demonstrated that serum ferritin levels were higher in patients with advanced grade of ovarian cancer ( $r = 0.445$  and  $p = 0.00001$ ), suggesting that this iron parameter could serve as a tumor marker for assessing the progression of ovarian cancer. In order to investigate these findings, we first studied the influence of *HFE* mutations on cancer cells. The ovarian cancer cell line TOV-112D, homozygous for the C282Y mutation, was transfected with the  $HFE_{wt}$  and  $HFE_{C282Y}$  vector, and although there were no differences in total TfR levels, FACS analysis demonstrated an iron deficient phenotype for the  $HFE_{wt}$  stable clones ( $p < 0.05$ ). *In vitro*, restoration of the HFE protein, in the TOV-112D ovarian cancer cell line, does not influence cell growth. We then studied the influence of iron levels on tumor progression. A preliminary *in vivo* experiment has demonstrated a tendency to a higher tumor volume in a mouse model of iron overload, *HfeRag1*<sup>-/-</sup>. Furthermore, *HfeRag1*<sup>-/-</sup> mice that were injected with the ovarian cancer cell line TOV-21G showed significant lower serum iron levels compared to their controls (SI  $40 \pm 7 \mu\text{M}$  versus  $27 \pm 6 \mu\text{M}$ ,  $p = 0.001$ ). In conclusion, more studies are required to further understand the role of *HFE* mutations on tumor progression. Higher iron levels may confer tumor cells to be drug resistant or increase toxicity and thus, may contribute to a bad prognostic.

**Keywords:** Ovarian Cancer, Iron, HFE, mutations, proliferation, C282Y, tumor marker, ferritin, *HfeRag1*<sup>-/-</sup>

## Liste des abréviations

ACD	Anemia of Chronic Disease
ALAS	5-Aminolevulinic Acid synthetase
AP-1	Activator Protein 1
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BOV	Benign
BRCA1	Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene product
BRCA2	Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene product
BSA	Serum Bovine Albumin
CA125	Cancer Antigen 125
CAT	Catalase
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Dcytb	Duodenal Cytochrome B
DFO	Desferrioxamine
DMT-1	Divalent Metal-ion Transporter 1
dNTP	deoxyribonucleotide
EOC	Epithelial Ovarian Cancer
FAC	Ferric Ammonium Citrate
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe	Fer
Fe <sup>2+</sup>	Fer ferreux
Fe <sup>3+</sup>	Fer ferrique
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FPN	Ferroportin
G1	Grade 1
G2	Grade 2
G3	Grade 3
G1418	Geneticin
GADD45	Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45 Gene
GFP	Green Fluorescent Protein

GPx	Gluthatione Peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxide d'hydrogène
HAMP	Hepcidin
HCP1	Haem Carrier Protein 1
HH	Hereditary Hemochromatosis
HJV	Hemojuvelin
HO-1	Haem Oxygenase 1
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IRE	Iron Responsive Element
IRP1	Iron-Regulatory protein 1
IRP2	Iron-Regulatory protein 2
LIP	Labile Iron Pool
LMP	Low Malignant Potential
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein -2
MtFt	Mitochondrial Ferritin
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium
NaAz	Sodium Azide
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NGAL	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NTBI	Non-Transferrin-Bound plasma Iron
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anion superoxide
OH <sup>•</sup>	Radical Hydroxyl
pb	paire de base
p53	Tumor protein 53
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Reactive Oxygen Species
RR	Ribonucléotide Réductase
RT	Reverse Transcription
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SOD	Superoxide dismutase

TPA	Tissue Polypeptide Antigen
Tf	Transferrin
TfR1	Tranferrin Receptor 1
TfR2	Tranferrin Receptor 2
TOV	Ovarian Tumor
ZIP-14	Zinc Transporter 14

# Table des matières

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>Page</b>
1. Propriétés chimiques et fonctions biologiques du fer.....	3
1.1 Les protéines à fer.....	3
1.1.1 Les hémoprotéines.....	3
1.1.2 Les protéines fer-soufre.....	4
1.1.3 Autres protéines contenant du fer et protéines liant le fer.....	5
1.2 Protéines liant le fer.....	6
1.2.1 La transferrine.....	6
1.2.2 La lactoferrine.....	7
1.2.3 La ferritine.....	8
2. Toxicité du fer.....	8
3. Métabolisme cellulaire du fer.....	10
3.1 Régulation de l'expression du TfR1 et de la ferritine.....	10
3.2 Capture cellulaire par des mécanismes dépendants de la Tf.....	12
3.2.1 Récepteur de la transferrine (TfR).....	12
3.2.2 Cycle de la Transferrine.....	14
3.3 Capture du fer par des mécanismes indépendants de la Tf.....	15
4. Métabolisme systémique du fer.....	17
4.1 Absorption intestinale du fer.....	17
4.1.1 Réduction du fer et passage dans l'entérocyte.....	19
4.1.2 Utilisation et stockage du fer dans la cellule.....	20
4.1.3 Export du fer vers la circulation.....	20
4.2 Distribution corporelle du fer.....	21



4.3 Régulation systémique du fer.....	22
4.3.1 Modèle de programmation par les cellules de la crypte.....	23
4.3.2 Régulateurs de l'absorption intestinale.....	23
4.3.3 L'hepcidine.....	24
4.3.4 Contrôle de l'homéostasie du fer par l'hepcidine.....	24
5. Désordres de surcharge du fer.....	25
5.1 Désordre de surcharge du fer lié au gène <i>HFE</i> .....	26
5.1.1 La protéine HFE.....	26
5.1.2 Mutations <i>HFE</i> .....	29
5.1.3 Effets des mutations <i>HFE</i> sur l'interaction HFE-TfR.....	31
5.1.4 Effets des mutations <i>HFE</i> sur l'absorption intestinale.....	31
5.1.5 Hémochromatose héréditaire de type 1.....	32
5.2 Désordres de surcharge du fer non liés au gène <i>HFE</i> .....	33
6. Implications du fer dans la néoplasie.....	35
6.1 Les mécanismes liés à la carcinogenèse du fer.....	35
6.2 La ferritine comme marqueur tumoral.....	36
6.3 Chélation du fer comme thérapie.....	37
7. Cancer épithélial de l'ovaire.....	38
7.1 Généralités sur le cancer épithélial de l'ovaire.....	38
7.1.1 Classification des tumeurs ovariennes.....	38
7.1.2 Détection du cancer épithélial de l'ovaire.....	40
7.1.3 Traitements du cancer épithélial de l'ovaire.....	40
7.2 Implication du fer dans le cancer épithélial de l'ovaire.....	41
II. OBJECTIFS ET BUTS SPÉCIFIQUES.....	43

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	45
IV. RÉSULTATS	
1. Études chez les patientes avec cancer épithélial de l’ovaire.....	58
1.1 Fréquences des mutations H63D et C282Y des patientes à l’étude.....	59
1.2 Les patientes avec mutations C282Y ont un pronostique plus faible.....	62
1.3 Les paramètres de fer sont en corrélation avec le grade de la tumeur.....	65
2. Influence des mutations <i>HFE</i> sur les cellules cancéreuses.....	67
2.1 Génération des clones exprimant la protéine HFE <sub>wt</sub> et HFE <sub>C282Y</sub> .....	67
2.2 Phénotype des clones exprimant la protéine HFE <sub>wt</sub> et HFE <sub>C282Y</sub> .....	72
2.2.1 Les clones ont des niveaux de TfR totaux semblables.....	72
2.2.2 La protéine HFE <sub>wt</sub> augmente le nombre de TfR à la surface cellulaire.....	73
2.3 HFE <sub>wt</sub> ne change pas la prolifération des cellules TOV-112D.....	75
<i>in vitro</i>	
3. Influence du fer corporel dû aux mutations <i>HFE</i> .....	76
3.1 Les tumeurs des souris HfeRag1 <sup>-/-</sup> ont une tendance à croître plus rapidement.....	76
3.2 Les souris avec tumeur ont de faibles niveaux de fer comparativement aux souris contrôles.....	79
V. DISCUSSION.....	81
VI. PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	91
VII. RÉFÉRENCES.....	95

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
I. INTRODUCTION	
Tableau I. Classification des hémochromatoses	34
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES	
Tableau II. Description des patientes à l'étude	47
Tableau III. Amorces utilisées pour génotypage du gène HFE et Rag1 des souris	55
IV. RÉSULTATS	
Tableau IV. Génotype et fréquence allélique de la population néonatale québécoise et des patientes à l'étude	60
Tableau V. Génotype et fréquence allélique des mutations H63D et C282Y des différentes pathologies de l'ovaire	61
Tableau VI. Analyse multi-variée : Étude du risque relatif	64

## Liste des figures

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>Page</b>
Figure 1. Structure des clusters de fer	5
Figure 2. Structure de cristal de la Tf de sérum humain	7
Figure 3. Détoxification de l'oxygène et réaction de Fenton	9
Figure 4. Régulation du métabolisme cellulaire du fer par le système IRE/IRP	11
Figure 5. a) Structure de cristal du TfR humain	13
b) Structure du complexe Tf-TfR1 en microscopie cryo-électronique	
Figure 6. Capture du fer via la voie dépendante de la transferrine	15
Figure 7. Croissance des cellules du petit intestin	18
Figure 8. Absorption intestinale du fer	21
Figure 9. Distribution corporelle du fer chez l'adulte	22
Figure 10. a) Le gène <i>HFE</i>	27
b) La protéine HFE	
c) Structure de cristal de la protéine HFE	
Figure 11. Structure de cristal du complexe TfR-HFE	29
Figure 12. Histologie de tumeurs ovariennes de type papillaire séreuses	39
<b>III. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	
Figure 13. Plasmide pCDNA 3.1+	50

<b>IV. RÉSULTATS</b>	<b>Page</b>
Figure 14. Survie des patients avec mutations <i>HFE</i> et cancer épithélial de l’ovaire	63
Figure 15. Corrélation entre les grades de tumeurs ovariennes (G0-G3) et les paramètres du fer	66
Figure 16. Génotype de la lignée du cancer épithélial de l’ovaire TOV-112D	67
Figure 17. Efficacité de transfection des cellules TOV-112D	68
a) Analyse par FACS montrant la fluorescence émise par le GFP	
b) Cellules TOV-112D en microscopie	
Figure 18. Expression de $HFE_{wt}$ et $HFE_{C282Y}$ dans les clones TOV-112D	70
a) Amplification du gène <i>HFE</i> par PCR dans les clones transfectés	
b) Expression de l’ARNm par RT-PCR dans les clones transfectés	
c) Expression des protéines $HFE_{C282Y}$ et $HFE_{wt}$ par Western Blot	
Figure 19. Séquençage des clones $HFE_{wt}$ et $HFE_{C282Y}$	71
Figure 20. Western Blot de l’expression totale du TfR dans les clones TOV-112D $HFE_{wt}$ et $HFE_{C282Y}$ et le vecteur vide	72
Figure 21. Analyse des niveaux de TfR à la surface cellulaire des clones par FACS	74
a) Comparaison entre les clones exprimant la protéine $HFE_{wt}$ , les cellules TOV-112D traitées avec DFO et avec FAC	
b) Comparaison entre les niveaux de TfR des clones exprimant $HFE_{wt}$ versus les clones $HFE_{C282Y}$ et le vecteur vide	
c) Représentation graphique de la MFI obtenue par FACS représentant les différents clones et les contrôles.	
Figure 22. Prolifération <i>in vitro</i> des clones stables $HFE_{wt}$ et $HFE_{C282Y}$	75
Figure 23. Génotypage des souris <i>HfeRag1</i> <sup>-/-</sup> générées pour les expériences <i>in vivo</i>	76
Figure 24. Croissance tumorale des souris <i>HfeRag1</i> <sup>-/-</sup> et <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup>	78
Figure 25. Niveaux du fer dans le sérum des <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> et <i>HfeRag1</i> <sup>-/-</sup>	80

*À ma famille et mon mari qui m'ont soutenu tout au long de mes études*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le D<sup>r</sup> Manuela Santos de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir ainsi permis d'y effectuer mes études de maîtrise. Je la remercie également de m'avoir suggérée un projet très intéressant qui m'a permis d'élargir mes connaissances sur un sujet qui me passionnait beaucoup (le cancer) et qui m'a également permis de me perfectionner au point de vue technique. D<sup>r</sup> Manuela Santos a su m'encadrer et m'encourager tout le long de mon projet.

Je tiens également à remercier les différentes personnes qui ont collaborées à mon travail. Tout d'abord le laboratoire du D<sup>r</sup> Anne-Marie Mes-Massons qui ont toujours été présent pour répondre à mes questions et à me donner les échantillons dont j'avais besoin. J'aimerais remercier tout particulièrement Marise, Manon, Lise, Magdalena, Véronique et et Philippe; je vous remercie pour votre patience et votre collaboration.

Je veux aussi remercier le D<sup>r</sup> Christine Maugard d'avoir si gentilement acceptée de m'aider sur le plan génétique et statistique.

J'aimerais remercier l'ensemble du laboratoire du D<sup>r</sup> Wu qui a également été présents lorsque j'avais besoins d'aide, notamment le D<sup>r</sup> Rafik Terra pour son incroyable soutien.

J'aimerais remercier l'ensemble des gens de mon laboratoire et ce, même ceux qui nous ont déjà quittés : Marco, Dongmei, Massar, Hua, Jean-Baptiste, Alex et Antonio. Je vous remercie pour vos belles discussions, vos encouragements et votre amitié.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille de m'avoir supporté pendant ces années qui n'ont pas toujours été faciles. Merci également de m'avoir encouragé même si vous ne comprenez pas toujours ce que je fais. Merci à celui qui partage ma vie pour son soutien et son réconfort.

# I. INTRODUCTION



## I. INTRODUCTION

Le fer est un élément d'une importance cruciale pour la croissance et la survie des organismes. Il est donc compréhensible qu'un maintien adéquat des niveaux de fer labile est critique pour l'homéostasie. Le fer est un constituant de plusieurs macromolécules essentielles dans la respiration, la production d'énergie, la synthèse d'ADN et le métabolisme. Cependant, le fer en excès a la capacité de générer des radicaux libres potentiellement toxiques pour les cellules. Ainsi, l'organisme a développé des systèmes élaborés afin de contrôler les concentrations de fer, tant au niveau cellulaire qu'au niveau systémique, afin de fournir des quantités suffisantes de ce métal, essentiel à la croissance et au développement et ce, tout en évitant un excès qui pourrait être toxique. Des perturbations des niveaux de fer peuvent être la cause de divers états pathologiques tels que l'anémie, une maladie de carence en fer, ou l'hémochromatose héréditaire, un désordre de surcharge du fer. De plus, bien que le fer ne soit pas classé comme étant un carcinogène classique, il est étroitement associé au cancer.

# 1. Propriétés chimiques et fonctions biologiques du fer

L'importance métabolique de l'élément fer provient de ses propriétés chimiques. Il peut former jusqu'à six liaisons de coordination en acceptant une paire d'électrons sur chacune de ses six orbitales atomiques. Des éléments électronégatifs comme l'oxygène, l'azote et le soufre ont la capacité de se lier avec le fer. Cette propriété fondamentale permet au fer de s'associer à des protéines. Sa nature de métal de transition lui confère la capacité d'exister sous deux formes, l'une réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ , le fer ferreux), l'autre oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ , le fer ferrique). Cette capacité de pouvoir accepter ou donner alternativement un électron, fait du fer le cofacteur de choix de nombreuses réactions enzymatiques d'oxydoréduction. En association avec des protéines, le fer est ainsi impliqué dans de nombreuses réactions de transfert d'électrons.

## 1.1 Les protéines à fer

Les protéines à fer peuvent être regroupées en trois classes, correspondant à la façon dont le métal est coordonné aux protéines : les protéines à hème, les protéines fer-soufre, et les protéines dans lesquelles le fer est directement lié à la chaîne protéique.

### 1.1.1 Les hémoprotéines

Une fraction importante du fer est associée à des protéines sous la forme d'un complexe appelé hème; un groupement prosthétique constitué de la protoporphyrin IX et du  $\text{Fe}^{2+}$  [1, 2]. La biosynthèse de l'hème implique 8 enzymes, dont 4 cytoplasmiques et 4 mitochondriales. Cette synthèse de l'hème débute dans la mitochondrie par la condensation de la succinyl coenzyme A et de la glycine dans le but de former l'acide 5-aminolevulinic (ALA), précurseur de l'anneau tetrapyrrol porphyrine. Par la suite, une série de conversion enzymatique mèneront à l'étape finale, soit l'insertion du fer ferreux dans la protoporphyrin IX, catalysée par la ferrochelatase mitochondriale. L'hème est ensuite transporté au cytosol pour être incorporé aux hémoprotéines [3]. Les hémoprotéines regroupent plusieurs

molécules dont l'hémoglobine, la myoglobine, le cytochrome c, le cytochrome P450, les oxydases, catalases et peroxydases [4].

Les hémoprotéines sont impliquées dans une série de fonctions biologiques cruciales chez les mammifères. Les plus abondantes de ces protéines, l'hémoglobine et la myoglobine, sont respectivement nécessaires au transport d'oxygène par les érythrocytes et par le muscle [1]. Ensuite, les cytochromes sont une source d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale [3].

Les oxydases, catalases et peroxydases sont quant à elles, importantes dans le processus de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, dans des conditions normales, une petite portion de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est réduit pour former ROS tels que l'anion superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ) [5]. Ainsi, la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx) permettent la conversion de l' $O_2^{\bullet-}$  en eau ( $H_2O$ ).

#### 1.1.2 Les protéines fer-soufre

La forme prévalente de fer non-héminique sont les centres Fe-S, qui résultent de l'assemblage d'ions sulfures et d'atomes de fer dans différents états d'oxydation. Ces agrégats tels que le 2Fe-2S, le 3Fe-4S ou le 4Fe-4S forment une structure plus communément appelée cluster [6, 7] (Figure 1). La mitochondrie occupe un rôle central dans la synthèse de ces groupements soufre-fer puisqu'elle contient toute la machinerie nécessaire pour leur assemblage [8]. Ces groupes ont divers rôles notamment, au niveau du transfert d'électrons tels les clusters 2Fe-2S des protéines Rieske, présents dans le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, et les clusters 3Fe-4S du complexe I et II. De plus, la protéine IRP1 (iron regulatory protein) est un senseur de fer et est présente sous deux formes ayant des activités différentes [8, 9]. La première forme de la protéine, possède un centre 4Fe-4S qui agit comme aconitase dans le cycle de l'acide citrique. Dans les cas de carence en fer, la protéine IRP1 est retrouvée sous la forme 3Fe-4S et joue le rôle de régulateur de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du fer (voir section 3.1).

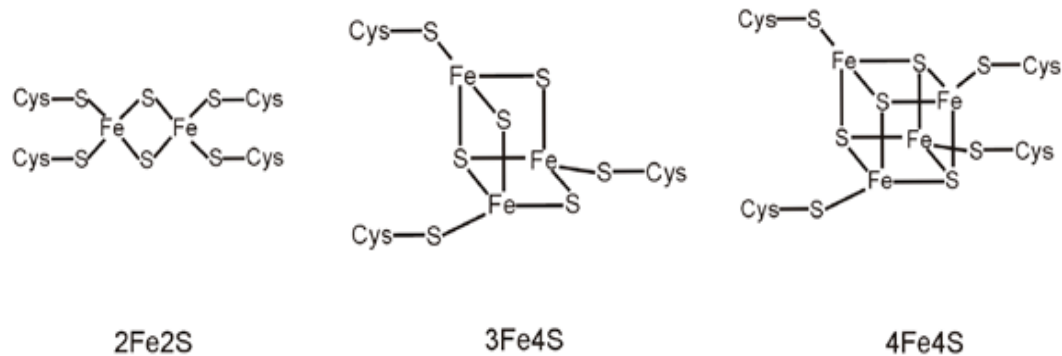


Figure 1. Structure des clusters de fer. Les protéines de Rieske du complexe III de la chaîne mitochondriale contiennent des clusters  $2\text{Fe}-2\text{S}$ . Les clusters  $3\text{Fe}4\text{S}$  sont également présents dans les complexes respiratoires I et II et participent aussi au transfert d'électrons. Les centres  $4\text{Fe}-4\text{S}$  sont organisés selon une structure cubique et sont présents dans les aconitases, enzymes impliquées dans le cycle de Krebs. Adapté de [9].

### 1.1.3 Autres protéines contenant du fer et protéines liant le fer

Cette classe de protéines se caractérise par la présence d'atome(s) de fer directement associé(s) à la protéine. La ribonucléotide réductase (RR) catalyse la réduction d'un ribonucléoside diphosphate en désoxyribonucléoside phosphate nécessaire lors de la phase S de la synthèse de l'ADN. En effet, sans le fer, les cellules sont incapables de passer de la phase  $G_1$  à la phase S du cycle cellulaire. Chez *Escherichia coli*, la levure, et les mammifères, la RR contient deux atomes de fer réagissant avec une tyrosine impliquée dans la formation du site actif pour donner un radical tyrosyl nécessaire à la réaction catalytique. Le fer semble également jouer un rôle critique dans l'expression et la régulation de plusieurs molécules contrôlant le cycle cellulaire : p53, GADD45 et WAF1/p21 [10, 11].

Les lipoxygénases contiennent un atome de fer dont l'oxydation permet leur activation. Elles catalysent l'oxydation des acides gras et participent à la synthèse de l'acide jasmonique chez les végétaux. Les lipooxygénases et les cyclooxygénases sont également des enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire [1].

## 1.2 Protéines liant le fer

Comme mentionné précédemment, la capacité du fer en milieu aqueux à se retrouver sous deux états redox différents, notamment en  $\text{Fe}^{2+}$  et en  $\text{Fe}^{3+}$ , lui permet de participer à plusieurs réactions biochimiques importantes. Cependant, cette propriété devient aussi dangereuse puisque le fer libre est extrêmement toxique et pose une menace importante pour les cellules et les tissus. En conséquence, le fer nécessite d'être lié à des protéines afin d'éviter toute toxicité. Trois protéines ont pour fonction la captation et le stockage du fer : la transferrine (Tf), la lactoferrine et la ferritine.

### 1.2.1 La transferrine

Chez les individus normaux, le fer extracellulaire circule lié à la Tf, une protéine abondante, ayant une très grande affinité pour le fer. La Tf est une glycoprotéine monomérique constituée de deux lobes similaires, le lobe N et le lobe C, qui sont liés par un court peptide. Chacun de ces lobes est divisé en deux domaines (N1, N2 et C1, C2) au milieu desquels on y trouve un site de liaison au  $\text{Fe}^{3+}$ . Les deux sites de liaison au fer sont similaires [12] (Figure 2). Le rôle fondamental de la Tf est de contrôler les niveaux de fer libre en liant, séquestrant et en transportant les ions  $\text{Fe}^{3+}$ . Par le fait même, la Tf maintient la biodisponibilité du fer et prévient le dépôt d'agrégats hydroxides  $\text{Fe}^{3+}$  insolubles. La Tf est principalement synthétisée par les hépatocytes et est sécrétée par le foie dans le plasma [13]. Normalement, tout le fer non héminique de la circulation est lié à la Tf. De plus, environ 30% des sites de la Tf sont occupés de manière à ce que la protéine soit vide de fer [14]. Les niveaux de Tf sont stables dès la naissance, et varient entre 2 et  $3\text{gL}^{-1}$  [15]. Des niveaux de Tf inférieur à  $0.1\text{gL}^{-1}$  sont associés à une plus grande incidence d'infections, des retards de croissance et de l'anémie [16].

Le fer qui est lié à la Tf peut être capté par les cellules via deux récepteurs décrit jusqu'à aujourd'hui : le récepteur de la Tf 1 et 2 (TfR1 et TfR2) [17].

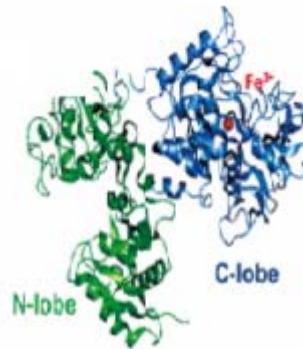


Figure 2. Structure de cristal de la Tf de sérum humain [12]. Le lobe C, illustré en bleu, contenant un ion  $Fe^{3+}$ , et le lobe N, en vert, montrant une structure ouverte vide en fer.

### 1.2.2 La lactoferrine

La lactoferrine est une glycoprotéine qui fait partie de la famille des Tf liant le fer [18]. Celle-ci est retrouvée majoritairement dans le colostrum qui est sécrété par les cellules glandulaires épithéliales. Elle est également présente dans la plupart des sécrétions exocrines et fait partie des granules secondaires des neutrophiles [19, 20]. La chaîne peptidique unique qui la constitue est repliée pour former deux lobes homologues pouvant lier chacun un ion  $Fe^{3+}$  [21]. Bien que ce soit le sujet de plusieurs débats, il a été longtemps proposé que la lactoferrine serait impliqué dans le transport du fer intestinal [22-24]. Cependant, un des rôle qui semble faire l'unanimité est celui de peptide antimicrobien [25, 26]. En effet, la lactoferrine, en liant le fer, limite la disponibilité de celui-ci pour les pathogènes [21]. Plusieurs autres protéines sont impliquées dans la défense de l'hôte incluant la lipocaline 2 (lipocaline neutrophile associée à la gélatinase (NGAL), également appelée sidéroacaline) et la protéine inflammatoire macrophage 2 (MIP-2) qui semblent séquestrer le fer des tissus infectés par des microorganismes invasifs [27].

### 1.2.3 La ferritine

La ferritine peut également lier le fer ; elle a le rôle de protéine de stockage du fer. Celle-ci est composée de 24 sous-unités de chaînes légères et lourdes, assemblées de manière à former une cavité pouvant accommoder plus de 4500 ions  $\text{Fe}^{3+}$  [28-30]. Cette protéine acquiert le  $\text{Fe}^{3+}$ , catalyse son oxydation et induit sa minéralisation au niveau de sa cavité [31]. La séquestration du fer par la ferritine, empêche une toxicité éventuelle par le fer, notamment dû à sa participation dans la formation des ROS.

## 2. Toxicité du fer

Comme il a été mentionné préalablement (page 4), les ROS, notamment l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) et le peroxyde d'oxygène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sont continuellement produits par les cellules via le métabolisme respiratoire de la mitochondrie. Seuls, ces deux intermédiaires ne sont pas des oxydants très puissants. Cependant, si le  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas rapidement détoxifié par la CAT ou la Gpx, il peut y avoir production de radicaux hydroxyls très toxiques lorsqu'il réagit avec le  $\text{Fe}^{2+}$  (Figure 3) [5].

## Peroxydation lipidique/ Dommage à l'ADN

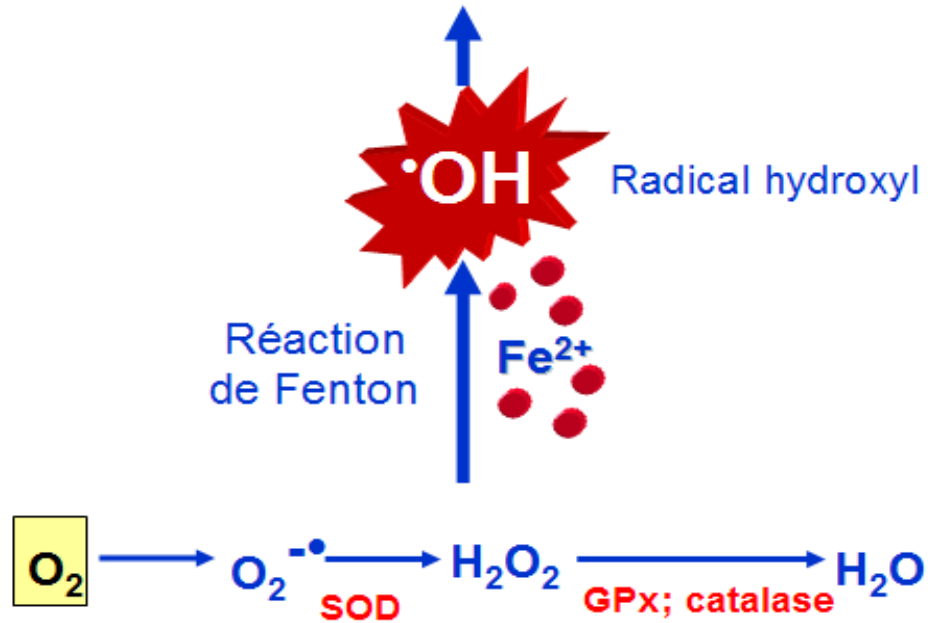
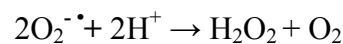
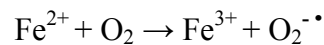


Figure 3. Détoxification de l'oxygène et réaction de Fenton. Le métabolisme respiratoire génère l'anion  $O_2^{\bullet -}$  qui est rapidement détoxifié par la SOD en  $H_2O_2$ . Ce dernier est réduit en  $H_2O$  par la GPx et la catalase. Par contre, en présence d'ions  $Fe^{2+}$ , la réaction de Fenton prend place produisant le radical hydroxyl  $\bullet OH$ .

Donc, le fer libre, particulièrement sous la forme  $Fe^{2+}$ , possède un pouvoir pro-oxydant très fort en catalysant les réactions de Fenton et Haber Weiss. En effet, dans des conditions aérobiques, le fer catalyse la génération de radicaux libres comme suit :



Cette séquence génère le radical hydroxyle  $\bullet OH$  qui est l'oxydant le plus réactif dans les systèmes biologiques et par conséquent, le plus dommageable [14]. Les radicaux libres sont hautement réactifs et sont responsables de l'oxydation des protéines, de la peroxydation des membranes lipidiques et de la modification des acides nucléiques. Ceci mène



éventuellement à une perte de l'intégrité cellulaire ainsi qu'à des dysfonctionnements importants [32].

Une augmentation des niveaux d'oxygène réactifs, au-delà des capacités antioxydatives de l'organisme, est rencontrée dans plusieurs pathologies, telles que l'inflammation chronique ou encore les désordres neurodégénératifs. De plus, des excès de fer, en état redox, aggrave le stress oxydatif ce qui accélère la dégénération des tissus [1, 33]. Cet état est retrouvé notamment chez des patients souffrant de désordre de surcharge du fer.

Ainsi, afin d'empêcher toute toxicité et ce, tout en maintenant des niveaux appropriés de fer, l'homéostasie du fer est finement régulée à la fois au niveau cellulaire et systémique. Au niveau cellulaire, les quantités de fer sont régulées par une expression coordonnée de molécules servant à la capture du fer et à son stockage, telles que le récepteur de la transferrine (TfR) et la ferritine.

### **3. Métabolisme cellulaire du fer**

#### 3.1 Régulation de l'expression du TfR1 et de la ferritine

Les protéines régulatrices de fer 1 et 2 (IRP1 et IRP2) sont des régulateurs post-transcriptionnels du fer [34]. Ces protéines interagissent avec des éléments de réponse au fer (IREs) qui sont des séquences nucléotidiques avec structures secondaires en épingle à cheveux. L'ARNm (l'acide ribonucléique messager) du TfR1 comporte 5 séquences IRE dans leur région 3' non traduite (3'UTR). Les ARNm des chaînes légères et lourdes de la ferritine présentent un seul IRE dans leur région 5'UTR [35, 36]. L'effet de la liaison IRP/IRE est différent selon que la séquence IRE est localisée en 3' ou en 5'. Ainsi, lorsque les quantités de fer intracellulaire sont faibles, l'interaction IRP/IRE stabilise l'ARNm codant le TfR1 (augmentant l'entrée de fer dans la cellule) et inhibe la traduction de l'ARNm codant pour la ferritine (empêchant le stockage du fer en excès). Un dispositif adaptif inverse se met en place en cas d'augmentation du contenu cellulaire en fer [37-39] (Figure 4).

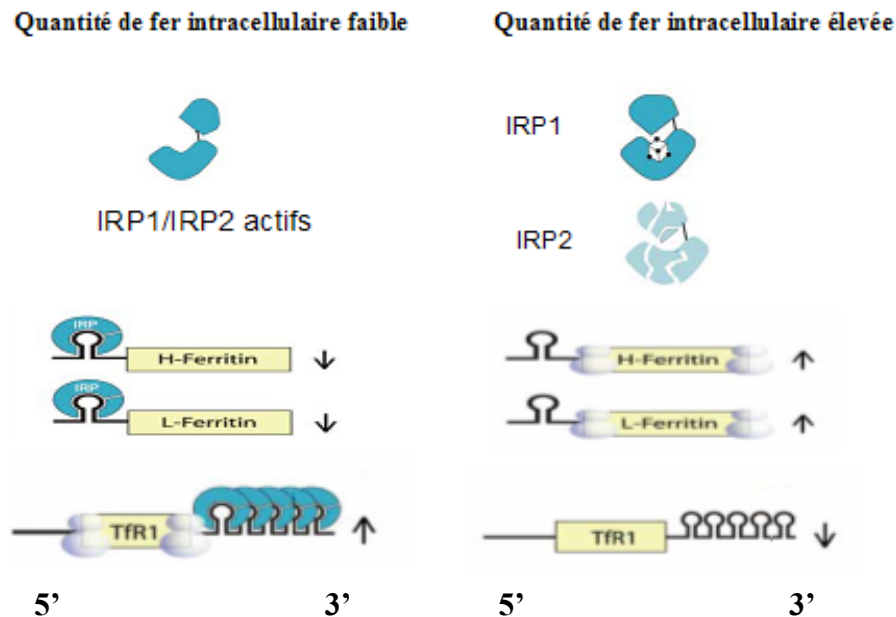


Figure 4. Régulation du métabolisme cellulaire du fer par le système IRE/IRP. Lorsque la cellule est déficiente en fer, les IRP1/IRP2 sont actives et peuvent se lier dans la région 5'UTR de l'ARNm de la ferritine pour inhiber son expression, et dans la région 3'UTR de l'ARNm du TfR1 pour augmenter son expression. À l'opposé, lorsque la cellule a des niveaux élevés de fer, l'IRP1/IRP2 sont inactives, ce qui augmente l'expression de la ferritine et diminue celle du TfR. Adapté de [36].

De ce fait, lorsque les quantités intracellulaires en fer sont élevées, l'IRP1 s'assemble avec un cluster 4Fe-4S, l'empêchant alors de se lier à l'ARNm du TfR1 et de la ferritine. De plus, le groupement 4Fe-4S converti l'IRP1 en aconitase cytosolique, une enzyme catalysant la conversion du citrate en iso-citrate. À l'opposé, l'IRP2 est dégradée via la voie ubiquitine/protéasome [37, 39-41]. La réponse IRP n'est pas seulement influencée par les niveaux de fer, mais également par l'oxygène, le stress oxydatif et l'oxide nitrique [37].

Les souris déficientes en IRP1 démontrent un métabolisme du fer normal à l'exception du rein et de la présence de gras brun. Une déficience en IRP2, quant à elle, démontre des niveaux élevés de ferritine et de faible niveau de TfR1 dans plusieurs tissus [42]. La déficience en IRP2 mène également à une maldistribution du fer, à une microcytose et des désordres neurodégénératifs [43-45]. Enfin, l'inactivation combinée de IRP1 et IRP2 est

létale pour les embryons, soulignant l'importance physiologique du système régulateur IRE/IRP [46, 47].

À noter que des séquences IRE sont également présentes sur les gènes codant pour la DMT-1 (divalent metal-ion transporter 1), la FPN (ferroportin) et l'ALAS (enzyme impliquée dans la synthèse de l'hème) [36, 48]. La FPN a un IRE dans son extrémité 5' alors que la DMT1 a un IRE dans sa région 3'.

Comme décrit ci-haut, la capture du fer par les cellules est majoritairement contrôlée localement par les niveaux intracellulaires de fer. En effet, le système IRE/IRP permet à chaque cellule de maîtriser la quantité de fer qui y pénètre de manière à assurer des quantités suffisantes pour les fonctions basales, et à éviter les accumulations de fer dans les tissus. Par contre, l'export du fer, particulièrement par les cellules du foie, des macrophages et du petit intestin, semble être régulé par des signaux systémiques.

Les différentes cellules de l'organisme sont dotées de plusieurs moyens pour capturer le fer de la circulation. En effet, les cellules peuvent acquérir du fer par des mécanismes dépendants ou indépendants de la Tf.

### 3.2 Capture cellulaire par des mécanismes dépendants de la Tf

#### 3.2.1 Récepteur de la transferrine (TfR)

Chez l'humain, le TfR1 est une glycoprotéine transmembranaire composée de deux sous-unités liées par un pont disulfure [49]. Le TfR1 est un homodimère pouvant lier deux molécules de Tf. Chaque sous-unité est constituée de trois domaines distincts organisés de manière à donner une structure en forme de papillon (Figure 5a). Le mécanisme par lequel la Tf lie le TfR1 est encore peu compris, cependant, des études récentes en microscopie cryo-électronique, ont révélées que le lobe C de chaque Tf entre en contact avec le domaine hélicoïdal du TfR. De plus, le lobe N de la Tf se lie sous le TfR entrant ainsi en contact avec le domaine hélicoïdal et protéase (Figure 5b) [50]. Il semblerait également se produire un changement conformationnel au niveau du TfR1, dépendant du pH, permettant ainsi la liaison à la Tf et la libération du fer [51]. Le TfR1 a pour rôle de capturer le fer à travers un cycle d'endocytose et d'exocytose de la Tf [52].

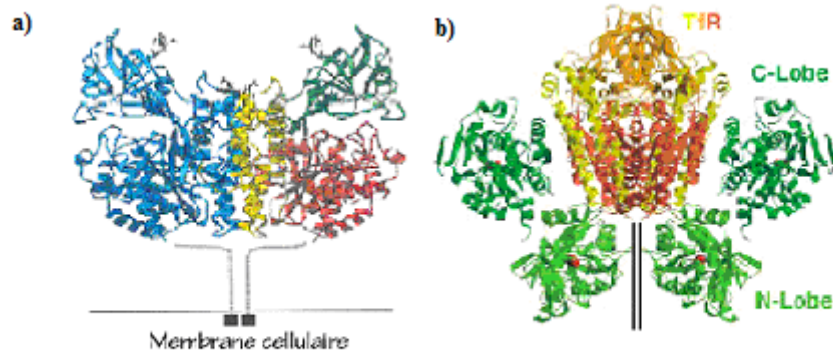


Figure 5. a) Structure de cristal du TfR humain. Récepteur transmembranaire dimérique composé de 3 domaines colorés : en vert, le domaine apical, en rouge le domaine protéase et en jaune le domaine hélicoïdal. En bleu, pour illustrer l'autre monomère. Adapté de [51]. b) Structure du complexe Tf-TfR1 en microscopie cryo-électronique. Le lobe C de chaque Tf entre en contact avec le domaine hélicoïdal (jaune) du TfR et les lobes N, sous le TfR, entrent en contact avec les domaines hélicoïdal et protéase (rouge) [50].

Récemment, un second récepteur, le TfR2, qui possède une forte homologie avec le TfR1, a été cloné et séquencé [17]. Deux transcrits du gène du TfR2 ont été identifiés, une forme  $\alpha$  et une forme  $\beta$ . Le TfR2-  $\alpha$  peut lier la Tf avec une affinité 25 fois plus faible que le TfR1, suggérant que la capture du fer n'est pas la principale fonction de ce récepteur [53]. Le TfR2-  $\beta$  ne possède ni domaine transmembranaire ni domaine intracellulaire et pourrait être une protéine intracellulaire [54]. Alors que l'expression du TfR1 est ubiquitaire [36, 55], le TfR2 est limitée aux hépatocytes, aux cellules de la crypte intestinale et aux cellules érythroïdes, lui suggérant un rôle davantage spécialisé [17]. Des niveaux plus faibles ont également été détectés dans la rate, les poumons, les muscles et la prostate. Ainsi, l'expression du TfR1 et TfR2 est spécifique aux tissus et est régulée par des mécanismes distincts, leur attribuant probablement différents rôles au niveau du métabolisme du fer.

Dans un modèle murin déficient en TfR1, les souris montrent des dysfonctionnements sévères au niveau du développement des précurseurs érythroïdes [56]. Ceci suggère un rôle important pour ce récepteur dans l'érythropoïèse, notamment à cause des besoins énormes de fer pour la synthèse d'hémoglobine [36]. Pour ce qui est du TfR2, des études démontrent

que des mutations, au niveau du gène de ce récepteur, sont liées à une forme d'hémochromatose [57, 58].

### 3.2.2 Cycle de la Transferrine

La capture du fer est initiée par la liaison de la Tf diférique au TfR1 à la surface cellulaire (Figure 6). Le TfR1, étant exprimé de manière ubiquitaire, la voie Tf-TfR1 est retrouvée dans la majorité des cellules, à l'exception des entérocytes matures de l'intestin. À pH neutre, le complexe Tf-Fe<sup>3+</sup>-TfR1 est internalisé via une endocytose dépendante de la clathrine [52]. L'acidification des endosomes, par des pompes à protons ATP-dépendante, permet la libération du Fe<sup>3+</sup> de la Tf. Ensuite, le Fe<sup>3+</sup> est réduit en Fe<sup>2+</sup> possiblement par la ferriréductase Steap3, dans les cellules érythroïdes et les hépatocytes [59], et est transporté par la DMT1 vers le cytoplasme. Dans d'autres cellules, la Steap3 n'est pas nécessaire à l'acquisition efficace du fer.

Suite à la libération du fer dans l'endosome, la Tf demeure liée au TfR1 et le complexe est recyclé vers la surface cellulaire. À pH neutre, à la surface cellulaire, la Tf se dissocie du TfR1 et celui-ci est alors libre de lier d'autre Tf diférique [60]. À l'intérieur de la cellule, une fraction importante du fer est utilisée pour la synthèse de l'hème et l'assemblage de groupement soufre-fer par la mitochondrie. La ferritine mitochondriale (MtFt), récemment découverte, est une protéine impliquée dans le transport du fer vers la mitochondrie [61]. Le fer en excès est stocké dans la ferritine et une autre fraction rejoint le LIP (labile iron pool). Les niveaux de LIP reflètent le statut cellulaire et ainsi, des augmentations ou des baisses dans le LIP, activent des réponses liées à une déficience ou à une surcharge en fer [5].

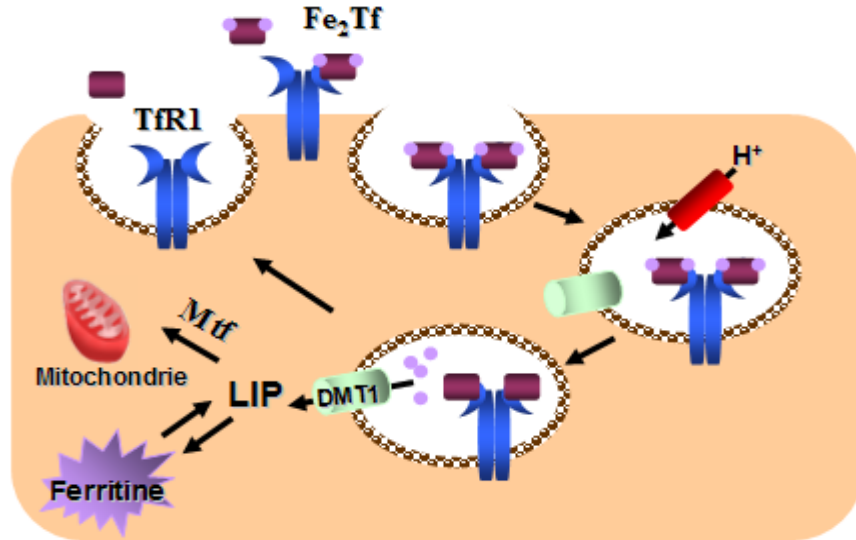


Figure 6. Capture du fer via la voie dépendante de la transferrine. Le complexe  $Fe_2Tf$  se lie au TfR1 à la surface cellulaire et est internalisé par un mécanisme impliquant la clathrine. L'acidification de l'endosome par une pompe à protons permet la libération du fer de la Tf, et la DMT1 permet le transport du fer vers le cytosol. Une fois dans le cytosol, le fer peut être transporté via la Mtf vers la mitochondrie où il est utilisé pour fin métabolique. Les surplus de fer sont stockés dans la ferritine et une fraction demeure dans le LIP. Le complexe Tf-TfR1 est recyclé vers la surface cellulaire et la Tf est relâchée.

### 3.3 Capture du fer par des mécanismes indépendants de la Tf

L'existence de mécanismes indépendants de la Tf a été suggéré par la présence de fer non lié à la Tf (NTBI) chez des patients avec désordre de surcharge du fer (thalassémie et hémochromatose héréditaire (HH)) [62, 63]. De plus, les patients souffrant de désordre de synthèse de la Tf comme l'atransferrinémie (absence de la Tf) ou l'hypotransferrinémie (déficit en Tf), présente également une accumulation de fer au niveau des tissus [64, 65]. Ces observations appuient donc la présence, dans le plasma, de NTBI. Environ 50 à 70% du NTBI, chez des patients avec HH, est retrouvé sous la forme de complexe citrate-fer [62].

Les transporteurs du NTBI sont encore peu connus. Une étude récente, suggère que le transporteur de Zinc SLC39A, Zip14, pourrait être impliqué dans la capture du NTBI. La

Zip14 est hautement exprimée dans le duodénum et le jéjunum, le foie et le coeur. La surexpression de la Zip14 dans des cellules HEK293 augmente la capture du  $\text{Fe}^{2+}$ , alors qu'une inhibition de Zip14 diminue l'accumulation de fer dans des hépatocytes murins [66]. D'autres transporteurs impliqués dans le transport du NTBI incluent la DMT1. L'implication de la DMT1 a été démontré par la conversion du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  dans des hépatocytes, suggérant la présence d'une ferriréductase [67].

Un autre mécanisme de transport du NTBI est retrouvé dans les cardiomyocytes. La capture du fer s'effectue via des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L. Cette voie est importante dans des conditions de surcharge de fer car elle permet l'entrée de NTBI au niveau du coeur. Cette entrée mène à une accumulation de fer au niveau de cet organe et engendre éventuellement une cardiomyopathie [68]. L'utilisation d'antagonistes des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L inhibe l'accumulation de fer dans les cardiomyocytes, soulignant leur rôle dans le transport du NTBI [69].

En plus de la voie Tf-TfR, les hépatocytes et les cellules érythroïdes précurseurs peuvent également capturer le fer via la ferritine [70, 71]. De plus, l'hémoglobine liée à l'haptoglobine peut être captée par les macrophages du système réticulo-endothélial et les monocytes via le récepteur CD163. Une autre partie de l'hémoglobine est fixée à l'hémopexine dans le sang, puis se fixe au récepteur de l'hémopexine sur les hépatocytes, mais aussi sur macrophages. Une fois captée, l'hémoglobine est digérée pour libérer l'hème, qui est également catalysée pour produire du  $\text{Fe}^{2+}$  [72, 73].

Au niveau des cellules rénales, notamment, il semblerait que le fer puisse être capté par la cubiline. En effet, le fer serait internalisé via l'endocytose de la cubiline et de la Tf [74].

Une nouvelle voie pour la capture du fer a récemment été décrite et implique la molécule NGAL [75, 76]. Cette protéine est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires (notamment modulateur de la réponse inflammatoire) et est sécrétée entre autre par les neutrophiles et les cellules épithéliales. Il a été montré que cette protéine couplée à un sidérophore (métabolites chélateurs liant le fer) peut transporter le fer. Le mécanisme par lequel les cellules acquièrent le fer via NGAL est encore peu compris, cependant il a été décrit que NGAL est internalisée dans des endosomes tout comme la Tf.

## 4. Métabolisme systémique du fer

Étant donnée l'absence de moyens efficaces d'excréter le fer chez les mammifères, l'équilibre des quantités corporelles de fer est maintenu par le contrôle des taux d'absorption de la diète. Cette régulation, au niveau systémique, a pour but d'obtenir des quantités suffisantes de fer pour répondre aux besoins de toutes les cellules du corps, particulièrement les érythrocytes qui sont les consommateurs majeurs de fer du corps.

### 4.1 Absorption intestinale du fer

Dans des conditions normales, les mammifères acquièrent du fer exclusivement de la diète. L'absorption du fer se fait au niveau du petit intestin, plus précisément par les entérocytes matures de la villosité duodénale. En effet, des cellules précurseurs multipotentes, présentes dans les cryptes du duodénum, prolifèrent et se différencient en cellules absorbantes ou entérocytes [77] (Figure 7). Ces entérocytes sont hautement spécialisés dans l'absorption de nutriments présents dans la lumière intestinale du petit intestin. Leur membrane apicale est constituée de microvillosités ce qui permet d'augmenter la surface d'absorption [78]. Une fois que les cellules ont migrées de la crypte au sommet de la villosité duodénale, les entérocytes sénescents sont exfoliés et excrétés. Étant donnée l'absence de TfR à la surface des entérocytes matures, le transport du fer, par les cellules intestinales, diffèrent des autres cellules [79]. En effet, seules les cellules immatures de la crypte du petit intestin expriment le TfR [80, 81].



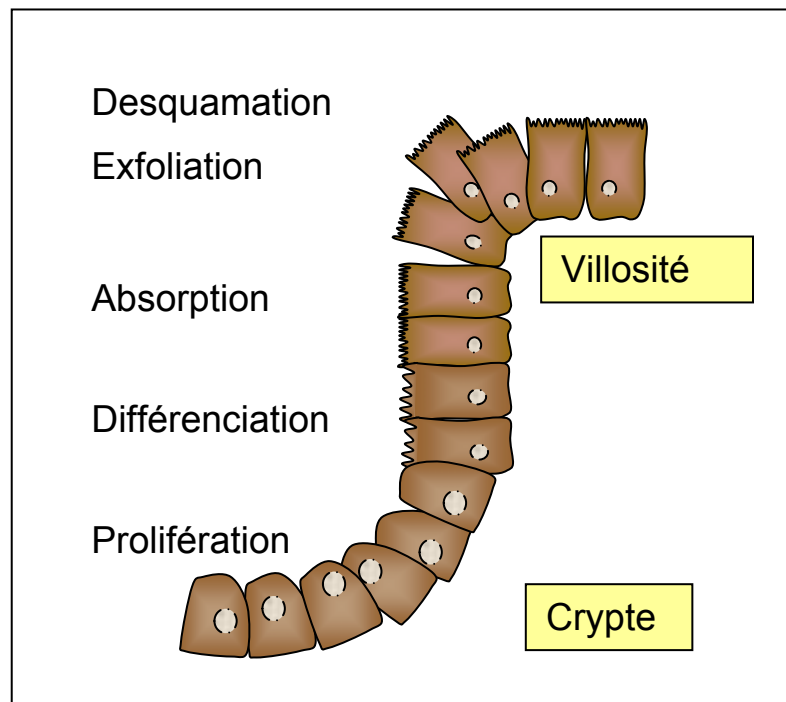


Figure 7. Croissance des cellules du petit intestin. Les cellules souches de la crypte intestinale prolifèrent et se différencient en entérocytes. Les entérocytes de la villosité intestinale sont dotés de structure villositaire leur conférant une grande capacité d'absorption. Une fois le sommet de la villosité atteint, les entérocytes sont éliminés par exfoliation et desquamation tous les 3-4 jours. Adapté de [82].

Le fer provenant de la diète se trouve sous deux formes : le fer hémique de la viande et le fer non hémique des végétaux et des produits laitiers [83]. L'obstacle majeur à l'absorption du fer de la diète est qu'il se trouve majoritairement sous la forme  $Fe^{3+}$ , une forme qui est insoluble en milieu aqueux au pH physiologique. Ainsi, l'absorption intestinale du fer s'effectue en trois étapes : 1- Réduction du fer et passage à travers la membrane de l'entérocyte, 2- Utilisation et stockage du fer, 3- Export du fer vers la circulation.

#### 4.1.1 Réduction du fer et passage dans l'entérocyte

Au niveau de la lumière intestinale, le fer non héminique  $\text{Fe}^{3+}$  doit être réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par les ferriréductases (Figure 8). La cytochrome *b* Duodénale (Dcytb) est la première ferriréductase apicale à être décrite comme étant une protéine héminique, qui utilise l'ascorbate pour faciliter la ferriréduction [84]. Cependant, l'élimination de la Dcytb dans un modèle murin n'a pas démontré un phénotype de déficience en fer, suggérant que celle-ci n'est pas essentielle à l'absorption intestinale du fer, chez la souris, et qu'il existerait probablement une autre ferriréductase [85].

Une fois réduit, le  $\text{Fe}^{2+}$  est transporté à travers la membrane cellulaire de l'entérocyte via le DMT1, membre de la famille des protéines associées à la résistance naturelle du macrophage (Nramp) (famille de protéines membranaires qui facilite l'absorption cellulaire d'ions métalliques divalents couplée à l'entrée de protons). La DMT1 est un symporteur à protons qui requiert un pH faible pour un transport efficace [86]. Une mutation spontanée unique au niveau du gène de la DMT1, chez des souris et des rats, cause des dysfonctions significatives au niveau de l'absorption intestinale, suggérant l'importance de cette protéine dans le transport intestinal du fer [87, 88].

Un second mécanisme, permettant également l'absorption du fer non héminique, ferait intervenir un complexe mucines-intégrines-mobilferrine. Ce modèle, proposé par un seul groupe, décrit que le  $\text{Fe}^{3+}$  se lie premièrement à l'intégrine  $\beta 3$  située à la surface des cellules intestinales, pour ensuite être transféré à une protéine chaperonne appelée mobilferrine [89-93]. Dans le cytoplasme, le complexe protéique intégrine-mobilferrine se combine à la flavine monooxygénase et à la  $\beta 2$ -microglobuline pour former la paraferriatine. La paraferriatine possède une activité ferriréductase permettant la conversion du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . Cette voie serait retrouvée seulement au niveau des entérocytes de l'intestin, et son importance au niveau de l'absorption intestinale n'a pas été clairement établi [92, 93].

Une autre source de fer dans la diète provient du fer héminique. L'hème résulte du bris de l'hémoglobine et de la myoglobine retrouvée dans la viande. Le transport du fer héminique semble se faire via la protéine transporteuse d'hème (HCP1), exprimée à de hauts niveaux dans le duodénum [78, 94]. Suite à la liaison de l'hème à l'HCP1, à la surface cellulaire, le

complexe est internalisé par endocytose. Le métabolisme intracellulaire de l'hème reste encore peu compris, mais il est suggéré que les vésicules endosomales migrent jusqu'au réticulum endoplasmique où le fer est libéré de l'hème par l'hème oxygénase 1 (HO1).

#### 4.1.2. Utilisation et stockage du fer dans la cellule

Le fer libéré de l'hème ou importé de l'entérocyte par la DMT1, se rajoute au LIP. Le caractère moléculaire du LIP reste éluusif, mais il peut être composé de chélateur à faible poids moléculaire ou de protéines chaperonnes qui lient et transportent le fer [95]. Après capture, le fer peut soit être utilisé par les protéines de l'entérocyte comme cofacteur inorganique ou être dirigé vers la ferritine. En effet, si les réserves corporelles en fer sont suffisantes, le fer est dirigé vers la ferritine où il sera perdu lors de la desquamation entérocytaire qui a lieu tous les 3-4 jours [82]. Autrement, le fer est exporté vers la circulation.

#### 4.1.3. Export du fer vers la circulation

La ferroportine 1 (FPN), aussi appelée IREG1 (iron regulated gene 1) ou MTP1 (metal transporter protein 1), est responsable de l'export basolatéral du fer [96]. Cette protéine est exprimée au niveau des microvillosités du petit intestin et sur la surface basolatérale des cellules épithéliales polarisées. Cette protéine a également été détectée dans les hépatocytes et dans les macrophages [97]. Dans un modèle murin, la déficience globale en FPN est létale pour l'embryon car elle est critique pour le transfert materno-embryonnaire du fer [98]. De plus, la déficience sévère en fer, engendrée par l'inactivation sélective de la FPN dans l'intestin, a été corrigée par l'administration parentérale de fer à des souris. Ces études démontrent le rôle essentiel de cette molécule en termes d'export du fer. La FPN reste jusqu'à maintenant, la seule molécule capable d'exporter le fer [99].

L'export cellulaire du fer requiert l'association d'une activité ferroxidase. Au niveau de l'intestin, l'hephaestine, un homologue de la ceruloplasmine, semble mener cette activité. Le site précis de l'activité de la ferroxidase est encore incertain, mais le  $\text{Fe}^{2+}$  doit être oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  afin de se lier à Tf plasmatique [100-102].

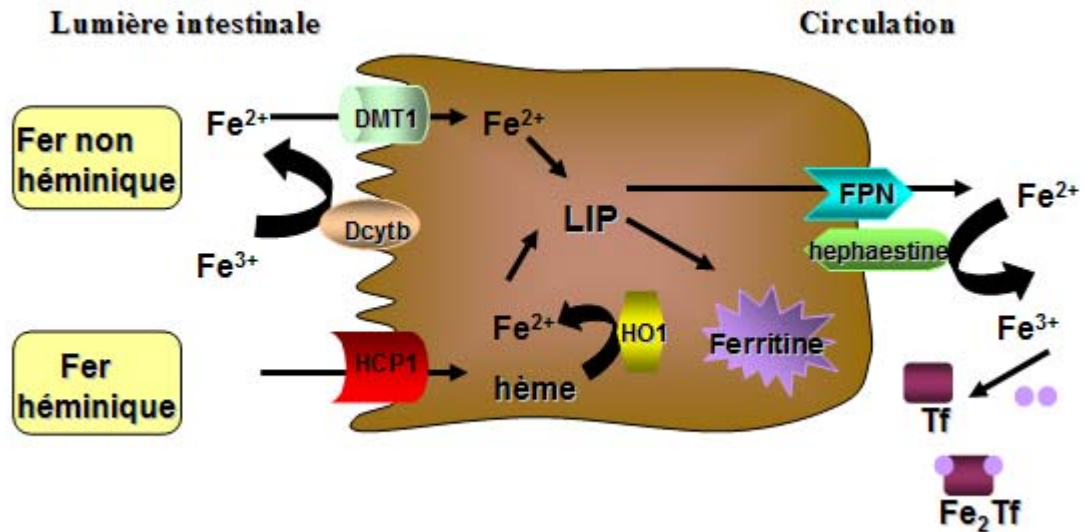


Figure 8. Absorption intestinale du fer. Le fer non héminique est réduit de  $\text{Fe}^{3+}$  à  $\text{Fe}^{2+}$  par la ferriréductase Dcytb et est transporté à l'intérieur de l'entérocyte via le transporteur DMT1. Le fer héminique traverse la membrane cellulaire par l'HCP1 et est réduit par l'HO1 à l'intérieur de la cellule. Une fois dans la cellule, le  $\text{Fe}^{2+}$  des deux sources rejoint le LIP, est stocké sous forme de ferritine ou est exporté vers la circulation. L'export du fer vers la circulation s'effectue par la FPN, qui est associée à l'hephaestine et oxide le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ . Deux atomes de  $\text{Fe}^{3+}$  se lient à la Tf, permettant ainsi la circulation du fer dans le sang.

#### 4.2 Distribution corporelle du fer

Chez l'adulte, le contenu total en fer de l'organisme est de 3 à 4 g. De façon quotidienne, l'adulte absorbe 1-2 mg de fer de la diète afin de compenser pour les pertes (par exfoliation des entérocytes sénescents dans le tube digestif, desquamation de la peau, menstruations chez les femmes, et autres pertes) [103] (Figure 9). La majorité du fer (60-70%) participe à l'érythropoïèse, dans la moelle osseuse, pour former l'hémoglobine des globules rouges du sang [104, 105]. En fin de vie, les globules rouges sénescents sont phagocytés par les macrophages. Le fer libéré par l'hémoglobine est relâché dans la circulation et recyclé dans la moelle osseuse pour l'érythropoïèse. Environ 20-30% du fer corporel est stocké par la ferritine dans le foie et les macrophages. Le reste du fer est majoritairement localisé dans la myoglobine des muscles, les cytochromes et les groupements soufre-fer [1].

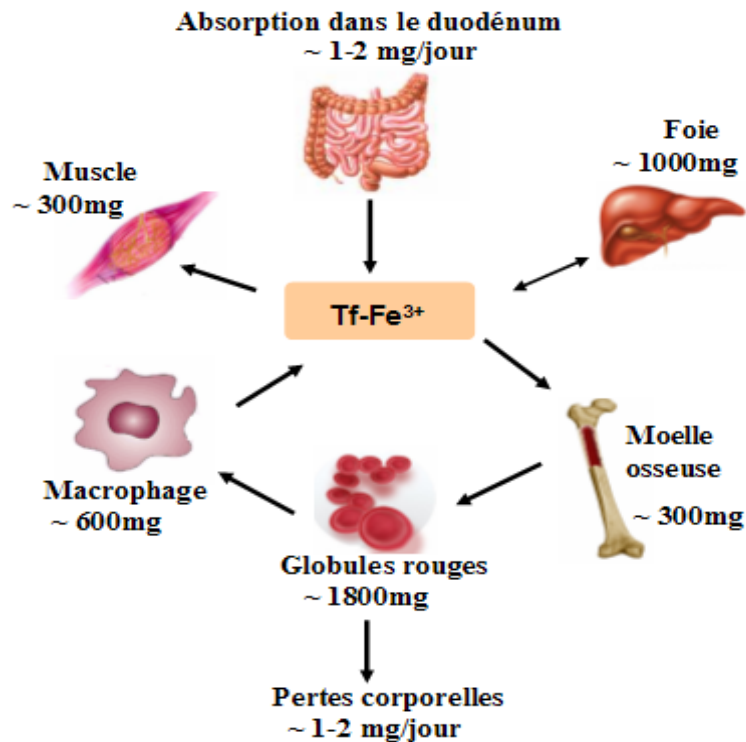


Figure 9. Distribution corporelle du fer chez l'adulte. Les valeurs en fer de divers organes et tissus d'individus normaux sont spécifiées. Adapté de [1, 36].

#### 4.3 Régulation systémique du fer

Les échanges de fer, se faisant entre les différents compartiments, sont finement régulés et sont dépendant des besoins corporels en fer. Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer la manière selon laquelle l'absorption intestinale est régulée [106]. Le premier modèle est celui de la programmation par les cryptes du petit intestin. Ce modèle propose que les cellules de la crypte agissent comme senseur des niveaux corporels de fer via les entérocytes de la villosité intestinale. Le second modèle propose que l'hepcidine, une hormone peptidique en circulation, soit influencée par les divers régulateurs du fer (contenu total en fer, l'hypoxie, l'activité érythropoïétique et l'inflammation) et interagit avec les entérocytes de la villosité duodénale pour réguler les taux d'absorption.

#### 4.3.1 Modèle de programmation par les cellules de la crypte

Ce modèle propose que les cellules de la crypte, du petit intestin, capturent du fer de la circulation, via la voie TfR-Tf [107, 108]. Ainsi, les niveaux intracellulaires de fer, des cellules de la crypte, correspondent à la quantité de fer présent dans l'organisme. En effet, dans des conditions normales, la captation de fer par le complexe Tf-TfR est relativement proportionnelle à la quantité de fer dans le plasma [109, 110]. Le mécanisme de programmation fait en sorte que les cellules de la crypte exprimeront des niveaux appropriés de transporteurs lorsque l'entérocyte migrera vers la zone d'absorption du duodénum (villosités) [111, 112]. De cette manière, les cellules de la crypte seront programmées à une absorption adéquate après leur maturation en entérocyte. Ceci laisse sous-entendre que si les niveaux corporels en fer sont faibles, les cellules de la crypte agiront comme senseur, et exprimeront davantage de transporteurs du fer, comme la DMT1, sur les entérocytes en développement de la villosité duodénale.

#### 4.3.2 Régulateurs de l'absorption intestinale

Dans le corps, les pertes de fer ne sont pas régulées et c'est pourquoi l'absorption du fer par le duodénum joue un rôle critique en terme d'homéostasie [113]. Il existe plusieurs facteurs capables d'influencer l'absorption intestinale du fer. Toutefois, les deux facteurs prédominants sont le contenu total de fer de l'organisme (représenté majoritairement par le fer du foie et des macrophages réticulo-endothélial) et le fer nécessaire à l'érythropoïèse. Comme vu précédemment, la majorité du fer présent dans l'organisme se retrouve au niveau des globules rouges. Dans la moelle osseuse, le fer est utilisé pour le développement des érythrocytes et pour l'incorporation dans l'hémoglobine. Ainsi, lorsque l'érythropoïèse est stimulée, dans des situations telles l'hémorragie ou l'hypoxie, le fer est extrait du plasma et la libération du fer par les macrophages est augmentée. Si le recyclage par le système réticulo-endothélial n'est pas suffisant pour répondre à l'érythropoïèse, alors l'absorption intestinale sera aussi augmentée. De la même manière, le corps semble avoir un niveau optimal de fer et lorsque le contenu en fer diminue, l'absorption intestinale augmente [114].

L'inflammation est un autre régulateur important du métabolisme du fer. La réponse de l'organisme face à l'inflammation est de minimiser les quantités de fer pour les pathogènes bactériens invasifs. Pour ce faire, la libération du fer par le foie et les macrophages ainsi que l'absorption intestinale sont diminués. Dans certains syndromes inflammatoires, infectieux, et cancéreux, cette diminution de la quantité de fer est associée à l'anémie de l'inflammation ou l'anémie chronique inflammatoire [115].

#### 4.3.3 L'hepcidine

L'hepcidine est synthétisée et sécrétée majoritairement par les hépatocytes, mais a été retrouvé à de moindres niveaux dans l'estomac, l'intestin, les poumons, les reins, le colon et le cœur [116, 117]. Le gène de l'hepcidine (HAMP) code pour une protéine précurseur de 84 acides aminés, qui est ensuite clivée pour générer un peptide mature de 25 acides aminés, très structuré par la présence de 8 cystéines formant 4 ponts disulfure [118]. Outre son rôle dans le métabolisme du fer, l'hepcidine est aussi un peptide anti-bactérien [119].

Le premier lien entre l'hepcidine et le métabolisme du fer a été démontré par le fait que malgré la présence normale de hauts niveaux d'hepcidine dans le foie, son expression est augmentée dans des modèles de souris avec surcharge du fer [116]. Peu après, un autre groupe a montré que l'inactivation du gène de l'hepcidine, chez la souris, mène à un phénotype de surcharge du fer [120]. Des études subséquentes, ont montrées que la surexpression de HAMP, chez des souris transgéniques, cause une anémie. Ceci était causée par une interruption de l'absorption intestinale et par la rétention du fer dans les macrophages [121]. L'hepcidine est probablement donc le "store regulator" contrôlant la sortie du fer des entérocytes duodénaux et des macrophages.

#### 4.3.4 Contrôle de l'homéostasie du fer par l'hepcidine

Chacun des régulateurs de l'absorption intestinale, mentionnés plus haut, influence aussi l'expression de l'hepcidine par le foie. Une fois exprimée, l'hepcidine se lie directement à la FPN, cause son internalisation et sa dégradation [122, 123]. Ainsi, au niveau de l'entérocyte ceci entraîne une diminution de l'export basolatéral de fer et par conséquent, une diminution de l'absorption intestinale de fer. Au niveau du macrophage réticulo-

endothélial et des hépatocytes, l'hepcidine engendre également une diminution de la sortie du fer et donc, une augmentation du stockage de fer [124].

L'expression de l'hepcidine est diminuée en réponse à des stimuli qui augmentent la libération de fer (lors de déficience en fer, hypoxie et érythropoïèse), et augmente dans des conditions où l'export de fer est inhibé (augmentation de fer dans le sérum, inflammation) [116, 121, 125].

Lors d'inflammation, l'expression de l'hepcidine est considérablement augmentée et ce, indépendamment des contenus en fer ou de l'activité érythropoïétique [127, 128]. La cytokine interleukine 6 (IL-6) est un important inducteur de la synthèse de l'hepcidine lors d'inflammation aiguë [128, 129]. Ainsi, dans certains cas d'inflammation chronique, l'induction de l'hepcidine par l'IL-6 réduit la quantité de fer disponible pour la moelle osseuse ce qui contribue à l'anémie de l'inflammation [130, 131].

Lorsque la production d'érythrocytes n'est pas adéquate, comme dans les cas d'hypoxie ou d'anémie, la réponse homéostatique est de produire plus de globules rouges. Dans ce cas, l'expression d'hepcidine diminue ce qui permet d'augmenter l'absorption intestinale du fer et l'export du fer par les macrophages et les hépatocytes.

Comme il a été vu dans cette section, le métabolisme systémique est finement régulé et l'hepcidine joue un rôle prépondérant en termes de régulation. Des perturbations des niveaux corporels de fer peuvent éventuellement mener à divers états pathologiques, notamment à des désordres de surcharge du fer.

## **5. Désordres de surcharge du fer**

Les anomalies du métabolisme du fer conduisent à divers états pathologiques, notamment à des désordres qui sont dus à une augmentation de l'absorption intestinale du fer, menant éventuellement à une surcharge du fer. Il existe différentes maladies de surcharge du fer, celles qui sont liées à des mutations du gène *HFE*, et celles qui sont causées par d'autres mutations.



### 5.1 Désordre de surcharge du fer lié au gène *HFE*

L'hémochromatose héréditaire de type 1 est la forme héréditaire la plus répandue dans la population caucasienne [132]. Ce désordre est causé par des mutations du gène *HFE* et est transmis sur un mode autosomique récessif. Les patients souffrant de cette maladie ont une absorption intestinale augmentée du fer et une accumulation de fer dans plusieurs tissus [133].

#### 5.1.1 La protéine HFE

Le gène *HFE* a été identifié sur le chromosome humain 6p en 1996 par le groupe de Feder et al. [134]. Le produit du gène *HFE* est une glycoprotéine transmembranaire de 343 acides aminés qui fait partie des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH de classe 1) [135]. Les six premiers exons du gène *HFE* codent pour les six domaines différents de la protéine : un peptide signal, trois domaines extracellulaires (les boucles  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), une région transmembranaire et une courte région intracellulaire (Figure 10 a et b) [134]. Le domaine  $\alpha 3$  de la protéine HFE s'associe par un pont disulfure à la  $\beta 2$ -microglobuline, interaction indispensable à la migration de la molécule à la surface cellulaire [136]. Malgré son homologie structurale avec les molécules du CMH de classe 1, HFE ne lie pas de peptide dû à sa niche peptidique trop étroite et n'a aucune fonction immunologique connue [135].

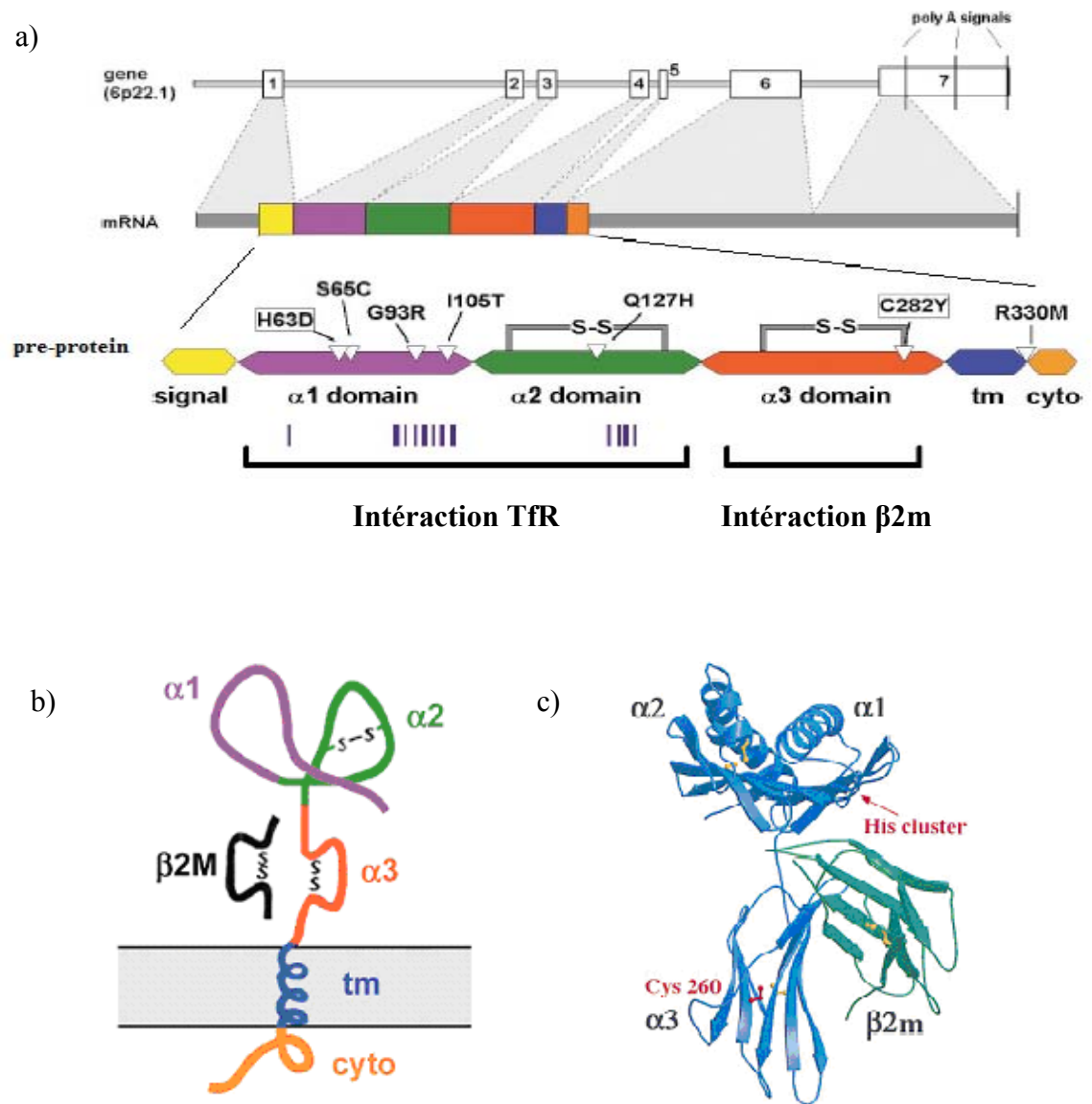


Figure 10. a) Le gène *HFE*. Le gène *HFE* est constitué de sept exons, qui permettent d'obtenir l'ARNm. Chacun des six premiers exons code pour un domaine distinct de la protéine *HFE*. La position des mutations *HFE* est également indiquée b) La protéine *HFE*. La protéine est exprimée à la surface cellulaire en association avec la  $\beta 2$ -microglobuline. Les trois domaines extracellulaires sont appelés  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  [137]. c) Structure de cristal de la protéine *HFE* montrant la mutation C282Y dans le domaine  $\alpha 3$  et la mutation H63D dans le domaine  $\alpha 1$  [135].

Plusieurs études ont démontrées que la protéine HFE est impliquée dans la régulation de la capture du fer. Des études *in vitro*, où *HFE* est transfecté à des cellules HeLa et HEK293, ont démontrées que l'expression d'*HFE* diminue les niveaux de fer cellulaire [138]. De plus, de nombreuses évidences prouvent que HFE diminue les niveaux intracellulaires de fer : une diminution des taux de ferritine, une augmentation du TfR, une augmentation de la liaison IRP/IRE et une diminution de la capture du fer médiée par la Tf [139-143]. En effet, Gross et al ont démontrés que des cellules en culture, qui expriment la protéine HFE, ont des niveaux augmentés de TfR et une diminution de la ferritine; ceci est caractéristique d'une cellule qui a de faibles niveaux intracellulaires de fer (qui est aussi engendré par une augmentation de l'interaction IRP/IRE étant donné les faibles niveaux de fer). Bien que les niveaux de TfR soient augmentés, Corsi et al ont démontrés que HFE diminue spécifiquement le captage du fer de la Tf. Ces études ont été déterminantes pour comprendre le rôle de la protéine HFE.

Les mécanismes moléculaires par lesquels la protéine HFE diminue le fer intracellulaire restent controversés. Des premières études ont montrées que la protéine HFE se lie au TfR et réduit ainsi son affinité pour le complexe Fe<sub>2</sub>-Tf [144]. Au pH de la surface cellulaire (pH~7.4), HFE et TfR forme un complexe de très forte affinité, alors qu'à un pH acide, correspondant au pH des vésicules intracellulaires, il y a peu ou absence totale de liaison entre HFE et TfR. Ceci suggère que la protéine HFE se dissocie du TfR dans les endosomes acidifiés [145]. Des études biochimiques ont montrées que la protéine HFE et Fe<sub>2</sub>-Tf peuvent se lier simultanément au TfR pour former un complexe à trois molécules, constitué de la protéine HFE et du Fe<sub>2</sub>-Tf lié à un TfR homodimère (Figure 11) [50, 135]. Des études ultérieures indiquent que le mécanisme d'inhibition par HFE n'est pas dû à une diminution de l'affinité du TfR pour Fe<sub>2</sub>-Tf, mais plutôt à une compétition entre le Fe<sub>2</sub>-Tf et HFE pour le site de liaison au TfR [139, 144, 146]. Ceci indique que HFE et Fe<sub>2</sub>-Tf ont des sites de liaison qui se chevauchent [147]. Une autre étude, où la protéine HFE est surexprimée dans des cellules HeLa, suggère que HFE diminue le nombre de sites de liaison pour Fe<sub>2</sub>-Tf et affecte le taux d'endocytose du TfR [148, 149]. À l'opposé, un autre groupe a démontré que la surexpression de HFE dans les cellules HeLa n'avait aucun impact sur le taux d'endocytose du TfR [143]. Ce groupe propose plutôt que la protéine HFE diminue l'acquisition cellulaire du fer par la Tf à l'intérieur des vésicules endocytées.

Ceci peut être dû à une diminution de la libération du fer par la Tf, par un changement du pH dans l'endosome ou à une inhibition du transporteur responsable de l'export du fer vers l'extérieur de l'endosome. Bien que le mécanisme d'HFE ne soit pas encore clair, l'unanimité est qu'elle engendre un phénotype de déficience en fer.

La protéine HFE est exprimée de manière ubiquitaire [134]. En effet, l'ARNm de la protéine HFE a été retrouvé à de faibles niveaux dans la rate, l'ovaire, le cerveau, la prostate, le colon, le pancréas, le placenta, le coeur, le muscle squelettique, les poumons, les reins, les cellules de Kupffer, les monocytes, les granulocytes et les macrophages tissulaires [150-152]. L'expression de la protéine est beaucoup plus importante dans le petit intestin et dans le foie [134, 153]. Dans le petit intestin, la protéine HFE est hautement exprimée dans les cellules de la crypte duodénale, lui suggérant un rôle dans la modulation de l'absorption intestinale [153, 154].

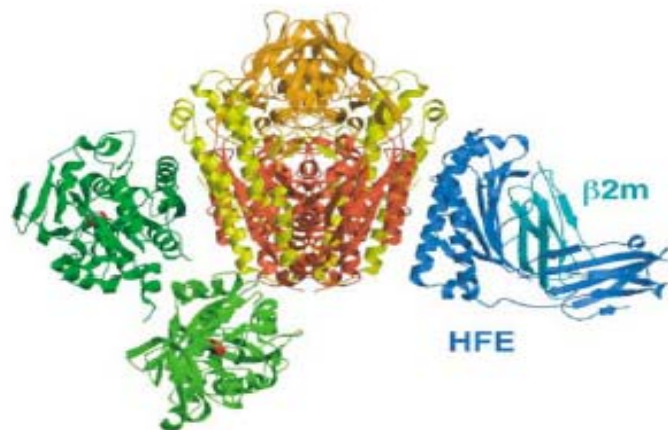


Figure 11. Structure de cristal du complexe TfR-HFE. Illustré, le TfR homodimère avec une molécule HFE (en bleu) et une molécule Fe<sub>2</sub>-Tf (en vert) [50].

### 5.1.2 Mutations *HFE*

Il existe différentes mutations connues pouvant mener à l'hémochromatose héréditaire de type 1 (HH) (Figure 10a). La majorité des patients souffrant d'HH dite classique, possède

un simple changement de base (G→A) sur l'exon 4 menant à la substitution d'une cystéine par une tyrosine sur l'acide aminé 282 [155]. La mutation C282Y est retrouvée en majorité chez les sujets de type caucasiens, d'ancêtres européens, avec une fréquence des porteurs comprise entre 10 et 15% [156, 157]. Au Québec, la mutation C282Y est retrouvée chez 8.6% de la population [158]. Dans 83% des cas, les patients atteints d'HH classique sont porteurs de la mutation C282Y à l'état homozygote [134, 157, 159]. Toutefois, ce ne sont pas tous les patients homozygotes pour la mutation C282Y qui développeront des signes cliniques de l'HH. Cette observation vient appuyer le rôle d'autres mutations du gène *HFE* ou de mutations dans d'autres gènes du métabolisme du fer comme éléments déterminant dans le développement de l'HH [157, 160].

Une mutation plus commune que la C282Y, dans la population générale, est une substitution d'une histidine par un aspartate à la position 63 de l'acide l'aminé. La mutation H63D est retrouvée chez environ 15 à 40% des caucasiens, mais n'est pas associée à un risque élevé de surcharge de fer [161, 162]. Dans la population québécoise, 31.1% de la population sont hétérozygotes pour H63D et 2.4% sont homozygotes [158]. La mutation H63D, à l'état hétérozygote ou homozygote, peut mener à de faibles augmentations des niveaux de fer, mais rarement à un désordre de surcharge de fer [163]. Un fait important est que la mutation H63D et la mutation C282Y n'ont jamais été retrouvées sur un même allèle. En effet, compte tenu de l'absence de recombinaison génétique dans cette région, chacune des mutations est exclusive [134]. Ainsi, il a été démontré que la mutation H63D mène, dans quelques cas, à l'HH lorsqu'elle est liée à la mutation C282Y à l'état hétérozygote composite [164]. Cependant, le risque de surcharge du fer à l'état hétérozygote composite est nettement inférieur à celui de l'homozygocité C282Y. Au Québec, cet état est retrouvé chez 1.7% de la population.

Une autre mutation du gène *HFE* entraîne la substitution d'une sérine par une cystéine en position 65 [165]. Certaines études suggèrent que la mutation S65C, à l'état hétérozygote composite avec la mutation C282Y ou H63D, pourrait être faiblement liée au développement de surcharge du fer. Cette mutation est retrouvée chez environ 1 à 5% de la population caucasienne [165-167]. De plus, les mutations G93R, I105T, Q127H et R330M

semblent être présentes à l'état hétérozygote composite avec C282Y dans certains cas d'HH [168].

### 5.1.3 Effets des mutations *HFE* sur l'interaction HFE-TfR

La mutation C282Y empêche la formation du pont disulfure entre la  $\beta$ 2-microglobuline et le domaine  $\alpha$ 3 et par conséquent, empêche l'expression de la protéine HFE à la surface cellulaire (Figure 10c) [136, 169]. Il a été démontré, en culture cellulaire, que la protéine HFE mutante est retenue à l'intérieur du réticulum endoplasmique et des compartiments du Golgi et par conséquent, son processus de maturation est retardé et elle subit une dégradation accélérée [169]. Ainsi, comme il a été vu précédemment, dans des états non pathologiques, la protéine HFE forme un complexe avec le TfR et engendre un phénotype de déficience en fer. Toutefois, lorsque la mutation C282Y est présente, l'association entre la protéine HFE avec le TfR ne se fait pas et par conséquent, la protéine ne peut plus jouer son rôle [144]. D'un autre côté, la protéine HFE mutée pour H63D est exprimée à la surface cellulaire, et est capable de former un complexe avec le TfR [144]. Cependant, son affinité pour le TfR est moindre que pour la protéine HFE sauvage [135].

Des souris déficientes en HFE et en  $\beta$ 2-microglobuline montrent un phénotype de surcharge du fer similaire à celui observé dans l'HH, confirmant ainsi que la mutation C282Y engendre une diminution de la fonction d'HFE [170, 171].

### 5.1.4 Effets des mutations *HFE* sur l'absorption intestinale

Le modèle de programmation de la crypte a été longtemps adopté pour expliquer l'augmentation de l'absorption intestinale chez les individus souffrant d'HH [60]. Il a été clairement démontré qu'il existe de hauts niveaux d'HFE au niveau basolatéral des cellules de la crypte intestinale et une absence de transporteur apical DMT1 chez celles-ci. Ainsi, comme il a été vu, les patients atteints d'HH ont des niveaux d'HFE fonctionnel plus bas que les individus non atteints. Ceci étant-dit, cette déficience en HFE, contribuerait alors à

des niveaux de LIP supérieur dans les cellules de la crypte duodénale. Par conséquent, lorsqu'une cellule précurseur, d'un individu avec HH, se différencierait, le LIP initial sera relativement élevé. Après différenciation, le LIP élevé contribuera, via l'activité IRE/IRP, à une augmentation de l'expression de transporteur basolatéraux FPN dans les entérocytes matures. Par la suite, l'augmentation de l'efflux cellulaire par la FPN, diminuera à son tour le LIP, ce qui augmentera les niveaux de DMT1 (via l'activité IRE/IRP) au pôle apical de l'entérocyte. Si l'activité de la FPN surpasse celle de la DMT1 et que la capture de fer par la DMT1 est équilibrée par son export, alors le LIP restera bas. Ce modèle expliquerait pourquoi les patients avec HH ont de hauts niveaux de DMT1 et de bas niveaux de ferritine [172-174]. Ce modèle a cependant été remis en question depuis la découverte de l'hepcidine et la reconnaissance de son rôle dans l'homéostasie du fer [175].

En effet, il existerait un lien entre l'hepcidine et l'HH. En premier lieu, chez la souris déficiente pour le gène *HFE*, il a été démontré que les niveaux d'expression hépatique de l'hepcidine n'étaient pas en relation avec les niveaux de fer hépatique [176]. De plus, chez l'homme, une baisse de l'expression de l'ARNm de l'hepcidine a été retrouvée dans des biopsies de foie de patients hémochromatosiques [177, 178]. Une autre étude a démontré, qu'il était possible de corriger le phénotype de surcharge de fer en faisant exprimer de façon constitutive le gène de l'hepcidine chez des souris déficientes en HFE, et présentant de faibles niveaux d'expression de l'hepcidine [179]. Suite à ces études, il a été conclu que la protéine HFE assurerait probablement la réception et la transmission d'un signal reflétant le stock en fer de l'organisme aux sites hépatocytaires de synthèse de l'hepcidine. Ainsi, en cas de mutations d'HFE, le signal ne se ferait pas de manière efficace, résultant en une synthèse insuffisante d'hepcidine ce qui empêcherait l'inhibition de l'absorption intestinale par l'entérocyte [180].

#### 5.1.5 Hémochromatose héréditaire de type 1

À l'état précoce, les patients avec HH de type 1 restent souvent asymptomatiques, mais à long terme, la surcharge en fer peut mener à des symptômes tel que la fatigue, l'arthralgie et la perte de libido [181]. L'accumulation de fer notamment au niveau du foie, du coeur et du pancréas se fait graduellement et les dommages apparaissent généralement entre 40 et 50 ans [182]. L'HH peut éventuellement entraîner des cardiomyopathies, du diabète, de

l'hypogonadisme, de l'ostéarthrose, la pigmentation de la peau (bronzé), cirrhose du foie et carcinome hépatique. Le diagnostic de l'HH se fait par des tests biochimiques tel que les enzymes du foie, la saturation de la Tf et les niveaux de ferritine. La phlébotomie reste encore le meilleur traitement pour traiter l'HH [183]. Les patients subissent des saignées de 500 mL chaque semaine jusqu'à ce que les concentrations de ferritine du sérum soient diminuées.

## 5.2 Désordres de surcharge du fer non liés au gène *HFE*

Autre que l'HH de type 1, il existe plusieurs désordres de surcharge du fer. Ceux-ci sont brièvement énumérés dans le Tableau I. Les désordres de surcharge de fer mènent à l'accumulation de fer dans plusieurs organes et sont associés à un haut risque de développer un cancer, en particulier les carcinomes hépatiques.



Tableau I. Classification des Hémochromatoses [182]

Types d'hémochromatose	Gène muté ou cause
<b>Hémochromatoses primaires (héréditaires)</b>	
Hémochromatose héréditaire de type 1	HFE
Hémochromatose juvénile type 2a	Hemojuvénile (HJV)
Hémochromatose juvénile type 2b	Hepcidine (HAMP)
Hémochromatose de type 3	Récepteur de la Transferrine 2 (TfR2)
Hémochromatose de type 4	Ferroportin (FPN)
Hémochromatose de type 5	Ferritine
Acéruplasminémie	Céruplasmine
Atransferrinémie	Transferrine (Tf)
Hémochromatose néonatale	Non connue
Surcharge en fer africaine	Non connue
<b>Hémochromatose Secondaire</b>	
Thalassémie, anémie sidéroblastique	Défaut dans l'érythropoïèse qui engendre une hyperabsorption du fer
Apport excessif en fer (orale, transfusions)	Hypertransfusion liée à des maladies qui requiert des transfusions chroniques
Maladies chroniques du foie	Hépatite B et C, cirrhose liée à l'alcool
Porphyrie cutanée tardive	Défaut dans la synthèse de l'hème

## 6. Implications du fer dans la néoplasie

La majorité des données actuelles soutiennent le fait qu'il existe un rôle entre le fer et le développement de cancers. Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de la carcinogenèse par le fer : il pourrait produire des ROS, affecter le système immunitaire ou servir de nutriment pour les cellules cancéreuses. De plus, l'utilisation de chélateurs pour inhiber la croissance tumorale est une stratégie de plus en plus investiguée.

### 6.1 Les mécanismes liés à la carcinogenèse du fer

Le fer pourrait être lié au cancer via plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la production de radicaux libres, via les réactions de Fenton Haber-Weiss, pourrait contribuer à la carcinogenèse. Comme il a été vu précédemment, les ROS peuvent s'attaquer aux lipides, aux macromolécules et à l'ADN. Certaines études suggèrent même que les ROS, produits par le fer, pourraient cibler spécifiquement certains gènes suppresseurs de tumeur [184]. De plus, il a été proposé que le fer peut induire des voies de signalisation précoces qui peuvent modifier l'activité de plusieurs facteurs de transcription, tel que l'activator protein 1 (AP-1) et le nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) [185]. Étant donné que des sites de liaison d'AP-1 et NF- $\kappa$ B se retrouvent sur les promoteurs de plusieurs gènes, comme l'IL-6, l'activation de ces facteurs de transcription pourrait augmenter l'expression de cette cytokine. Il est connu que l'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui peut avoir des pouvoirs mitogéniques (prolifération cellulaire) et fibrogénique (impliqué dans la synthèse de la matrice extracellulaire) [186]. Ainsi, la surexpression de l'IL-6 par traitement au fer pourrait mener à une inflammation chronique et au développement de cancer [187].

Le fer pourrait également affecter le système immunitaire. Il a été démontré que l'augmentation du fer corporel pourrait favoriser le développement d'infections virales [188, 189]. Le fer semble également modifier l'activité des cytokines et la prolifération des cellules immunitaires et par conséquent, la surveillance immunitaire [190]. La perte de régulation de la balance immunitaire, causée par le fer, pourrait permettre la croissance des cellules cancéreuses [191, 192].

Une autre explication fortement appuyée est que le fer sert de nutriment pour la croissance des cellules cancéreuses. Comme il a déjà été discuté, le fer se lie à une enzyme critique à la prolifération cellulaire : la ribonucléotide réductase (RR). Cette enzyme catalyse la réduction des ribonucléotides en déoxyribonucléotides, étape limitante pour la synthèse des nucléotides et par conséquent, essentielle à la synthèse de l'ADN et à la prolifération cellulaire [193]. Ainsi, il est connu que les cellules cancéreuses ont des niveaux de TfR supérieur à leur surface cellulaire comparativement aux cellules normales [194]. Les cellules cancéreuses captent également le fer plus rapidement via la Tf que les cellules normales [195-198]. Ceci a été démontré cliniquement par des cellules tumorales captant du  $^{67}\text{Ga}$  liée à la Tf et exprimant des niveaux élevés de TfR [199, 200]. Des expériences sur des modèles murins suggèrent qu'une diète sans fer permet de réduire significativement la croissance tumorale [201, 202]. Ces observations reflètent les besoins accrus en fer, des cellules cancéreuses, afin de maintenir leurs hauts niveaux de prolifération. De plus, des anticorps capables d'inhiber la capture de fer, en empêchant la liaison de la Tf au TfR, peuvent arrêter la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* [203, 204].

## 6.2 La ferritine comme marqueur tumoral

Une relation semble exister entre la ferritine et le cancer. En effet, malgré aucune augmentation dans les niveaux de fer corporel, les taux de ferritine du sérum de patients souffrant de divers cancers sont augmentés [205-207]. Il a été proposé que la ferritine soit un marqueur clinique du stade tumoral et un prédicteur de la survie. Notamment, dans le cancer rénal, il a été démontré que les niveaux de ferritine corrélaient avec le stade de la tumeur [208, 209]. De plus, les niveaux cytosoliques de ferritine des tissus cancéreux étaient significativement plus élevés que dans les tissus normaux [210]. La ferritine est également beaucoup plus élevée dans les neuroblastomes de stade III et IV et non dans les stades I et II [207, 211, 212]. Ceci a été utilisé comme un indicateur de pronostique; de hauts niveaux indiquant un faible pronostique et de bas niveaux indiquant un pronostique meilleur. Des tissus du cancer du sein ont montrés 6 fois plus de ferritine que les tissus bénins ou les tissus normaux [213]. Une étude a rapporté que 41% des femmes, avec cancer du sein préopératoire, avaient de hauts niveaux de ferritine [205].

### 6.3 Chélation du fer comme thérapie

Étant donnée les observations ci-haut, la chélation du fer est une approche sensée pour freiner la croissance tumorale. Le chélateur présentement utilisé pour traiter les désordres de surcharge du fer est la desferrioxamine (DFO) [214]. Ce chélateur a montré des propriétés anti-prolifératives contre plusieurs cancers, notamment la leucémie, les carcinomes hépatiques et mammaires et les neublastomes *in vitro*, *in vivo* et aussi dans les essais cliniques [215-220]. La DFO agit par déplétion du LIP qui est nécessaire à l'activité enzymatique de la l'enzyme RR [221]. Toutefois, l'efficacité de la DFO est limitée dû à sa faible capacité à traverser les membranes cellulaires et à lier le fer du LIP [222]. En effet, elle n'a pas été efficace dans un modèle murin de leucémie et de carcinome cervical et dans des essais cliniques de cancer de la prostate [223-225]. Les limites de la DFO ont encouragées le développement de d'autres chélateurs plus efficaces. Un groupe de ligand investigués sont ceux de la classe des PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone). Ces agents ont montré une plus grande capacité de chélation que la DFO [226]. En effet, les PIH ont montré une efficacité cytotoxique comparable à celle de la bleomycine et de la cis-platine, agents chimiothérapeutiques communément utilisés [227].

Comme il a été présenté, le fer est sans aucun doute lié au cancer. Plusieurs cancers ont été associés avec de haut niveaux de fer dont les carcinomes hépatiques, cancer du colon, du sein, des reins, des poumons les neuroblastomes et les mélanomes [221, 228-232]. Notamment, il a été suggéré qu'une fréquence allélique élevée de l'allèle C282Y pourrait promouvoir le développement du cancer du sein chez les femmes. Outre le cancer du sein, peu d'études ont été effectuées sur l'implication du fer dans les cancers gynécologiques, notamment dans un cancer fort agressif comme le cancer épithélial de l'ovaire (EOC).

## 7. Cancer épithélial de l’ovaire

### 7.1 Généralités sur le cancer épithélial de l’ovaire

Chez les femmes, le cancer épithélial de l’ovaire (EOC) est le cinquième cancer le plus mortel et représente le cancer gynécologique le plus léthal [233]. Le EOC est responsable de plus de mortalité que le cancer de l’endomètre et le cancer cervical [234]. Le pronostique de ce cancer est faible avec une survie sur 5 ans de 30 à 40% [235]. Étant généralement asymptomatique, 70% des femmes sont diagnostiquées à des stades déjà avancés de la maladie.

#### 7.1.1 Classification des tumeurs ovariennes

Parmi les nombreuses tumeurs du cancer de l’ovaire, 85 à 90% sont de type épithélial et sont classées selon différents critères [236]. Tout d’abord, selon l’organisation mondiale de la santé (OMS), les tumeurs sont divisées en 3 classes majeures : bénins (BOV), à faible potentiel de malignité ou borderline (LMP) et les tumeurs invasives (TOV) [237]. Histologiquement, les tumeurs BOV ne démontrent aucune stratification et ne présentent pas de cellules atypiques. Les tumeurs LMP possèdent une prolifération épithéliale avec stratification et cytologie atypique sans invasion du stroma (Figure 12a et b). À l’opposé, les tumeurs TOV possèdent un index mitotique élevé, une atypie cellulaire et une invasion du stroma (Figure 12c et d) [238, 239]. Parmi les tumeurs ovariennes, on distingue divers types histopathologiques : séreux, mucineux, endométrioïde, cellules claires, tumeurs de Brenner, cellules mixtes, carcinomes indifférenciés et autres [240]. Parmi les divers types histopathologiques du EOC, les tumeurs séreuses sont les plus fréquentes et le pronostique de ces patientes est plus faible que celles avec tumeurs mucineuses ou endométrioïdes [241]. De plus, le EOC est classé selon le degré de différenciation de la tumeur : les tumeurs LMP (ou de grade B ou 0) sont légèrement différentes des tumeurs bénignes, alors que les tumeurs de grade 1 (G1) sont bien différenciées, de grade 2 (G2) modérément différenciées et de grade 3 (G3) faiblement différenciées [242]. Par la suite, quatre stades sont utilisés pour définir le volume et le degré d’invasion de la tumeur. Les tumeurs de stade I sont limitées aux ovaires, les tumeurs de stade II se sont propagées au-delà des

ovaires, mais sont encore limitées au bassin, les tumeurs de stade III se sont propagées à l'extérieur du bassin vers la cavité abdominale et les tumeurs de stade IV présentent des métastases lointaines [240, 243, 244].

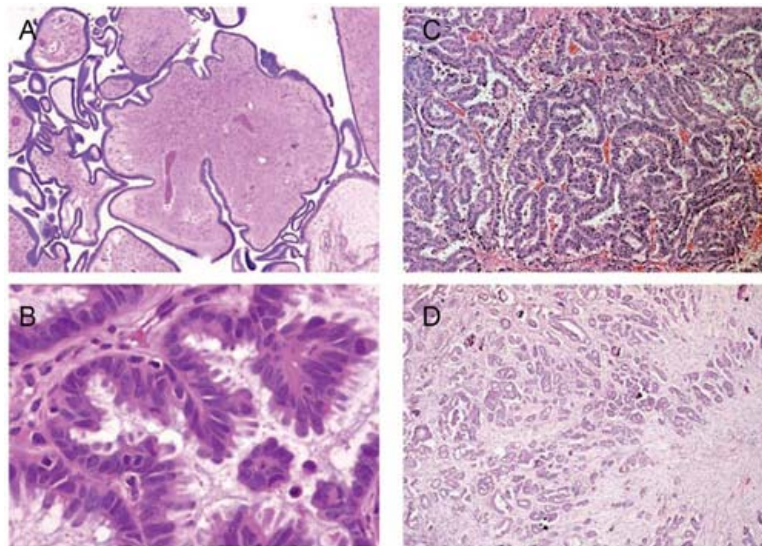


Figure 12. Histologie de tumeurs ovariennes de type papillaire séreuses. a) Tumeur à faible potentiel de malignité (LMP) à faible grossissement et b) LMP à fort grossissement. c) Carcinome invasif (TOV) de haut grade à faible grossissement et D à fort grossissement [245].

Environ 20% des tumeurs malignes sont des LMP [242]. De plus, les patientes avec tumeurs LMP séreuses ont une meilleure survie que les patientes avec TOV séreuses. En effet, les patientes, avec tumeurs LMP séreuses de bas stade, ont une survie sur 5 ans entre 90 et 95% et de 55 à 70% pour les patientes de stade III comparativement à 30-40% pour les patientes avec TOV séreuses de G3 [246].

### 7.1.2 Détection du cancer épithélial de l'ovaire

La détection précoce du cancer de l'ovaire est limitée par l'absence de symptômes cliniques spécifiques et par le manque de tests de détection précis. La glycoprotéine CA125 (Cancer Antigen 125) du sérum est le biomarqueur le mieux caractérisé pour le EOC [247]. La libération ou la sécrétion de CA125 semble être directement liée à la voie de signalisation du récepteur de croissance épithélial [248]. Trois études récentes [249-251], ont démontré qu'il y avait réduction des niveaux de CA125 durant et après une première chimiothérapie. De plus, les niveaux de CA125, après un premier traitement, semblent être prédictifs de la survie des patientes [252]. Un autre groupe suggère que le CA125 n'est pas un marqueur pronostique pour les cancers de l'ovaire de stade précoce, mais plutôt pour les stades avancés [253]. Ce marqueur, lorsqu'il est utilisé, n'est pas suffisamment sensible et spécifique pour le dépistage du cancer de l'ovaire [254]. En effet, il a été rapporté que les taux de CA125 du sérum sont élevés chez 80% des patientes avec EOC, mais également dans plusieurs maladies bénignes gynécologiques et non gynécologiques [255-258]. Ainsi, ce marqueur n'est pas un marqueur optimal unique pour le dépistage du cancer de l'ovaire, mais il est plutôt utilisé pour le suivi post-opératoire, suivi des réponses à la chimiothérapie, aux rechutes et à la progression de la maladie [259]. L'identification de nouveaux biomarqueurs est nécessaire, afin de pouvoir diagnostiquer le cancer de l'ovaire avant qu'il ne se manifeste cliniquement.

### 7.1.3 Traitements du cancer épithélial de l'ovaire

La chirurgie est généralement le traitement initial pour les femmes avec cancer de l'ovaire. Une évaluation chirurgicale permet de stratifier les patientes en deux catégories : les patientes à bas risque et les patientes à haut risque. Pour les patientes à bas risques désirant préserver leur fertilité, une salpingo-oorectomie unilatérale sans chimiothérapie est une option. Les patientes à haut risque (à stade précoce ou avancé de la maladie) nécessitent, quant à elles, une cytoréduction suivi d'un traitement combiné avec carboplatine et paclitaxel [260]. Quoiqu'il soit bien connu que l'EOC est modérément sensible à chimiothérapie, ce qui le différencie de la plupart des tumeurs solides est la haute corrélation entre la cytoréduction du volume tumoral et une survie prolongée. Des

procédures telles qu'une chirurgie radicale pelvienne, une résection de l'intestin et une chirurgie agressive du haut de l'abdomen, sont communément nécessaires à une cytoréduction optimale. À noter qu'une cytoréduction optimale a été défini comme étant un diamètre tumoral résiduel entre 0 et 3 cm [261, 262]. Malgré une thérapie de première ligne agressive, avec chirurgie primaire et chimiothérapie, la majorité des femmes avec EOC avancé développent une récurrence de la maladie [263]. Pour les patientes à haut risque de développer un cancer de l'ovaire (par exemple avec antécédent familiaux BRCA1 et BRCA2) la salpingo-oorectomie bilatérale prophylactique réduit significativement l'incidence de cette maladie.

L'activité thérapeutique de la cisplatine ou carboplatine est médiée par la formation d'une espèce réactive, par hydrolyse de l'agent, lors de son entrée dans la cellule. Cette espèce réactive réagit avec l'ADN, l'ARN et les protéines, mais ses effets cytotoxiques semblent majoritairement dû à son intercalation dans l'ADN [264]. Paclitaxel, ou plus communément connu sous le nom de Taxol, est le premier membre de la famille des taxanes à être utilisé comme agent chimiothérapeutique [265]. Les taxanes exercent leur effet cytotoxique par arrêt de la mitose, via une stabilisation des microtubules, ce qui résulte en une apoptose cellulaire. L'hypothèse qui est à la source de l'utilisation de la chimiothérapie combinée, est que les cellules tumorales résistantes à un des agents seront sensibles au second agent qui possède un mécanisme d'action différent.

### 7.2 Implication du fer dans le cancer épithélial de l'ovaire

Rares sont les études qui ont tentées de faire un lien entre le EOC et le métabolisme du fer. En 1997, un groupe a tenté de mesurer les niveaux de ferritine chez des patientes avec EOC en stade préopératoire [266]. Leurs résultats ont montrés que les patientes avec EOC avaient des niveaux de ferritine significativement plus élevés que les patientes du groupe contrôle. De plus, leurs résultats suggèrent que les niveaux de ferritine sont en lien avec les différents stades de la maladie.

Comme il a été mentionné précédemment, les chélateurs de fer ont été utilisés pour limiter la croissance de plusieurs cancers. Toutefois, rares sont les études qui ont spécifiquement étudiées le traitement du cancer de l'ovaire par les chélateurs de fer. Ainsi dit, le groupe de



Brard et al. a tenté d'étudier l'effet anti-prolifératif du chélateur de fer desferoxamine (DFO), sur des lignées du cancer de l'ovaire humaines CaOV-3 et de rat NUTU-19 [267]. Leurs résultats démontrent que la DFO inhibe la prolifération de ces deux lignées du cancer de l'ovaire de manière dose dépendante et induit l'apoptose. En effet, la DFO a réussi à inhiber la synthèse de l'ADN à plus de 90% à une concentration de 200 $\mu$ M pour les cellules CaOV-3 et à 50 $\mu$ M pour les cellules NUTU-19.

Également, récemment, des études ont tenté de démontrer qu'un milieu riche en fer favoriserait la transformation des kystes endométrioïdes en cancer de l'ovaire, notamment en carcinomes à cellules claires ou endométrioïdes [268]. Ces études ont montrées que la concentration de fer libre dans les kystes endométrioïdes est significativement plus élevées que dans les kystes non endométrioïdes. Des résultats similaires ont été retrouvés histologiquement entre les kystes endométrioïdes et non endométrioïdes. La conclusion de cette étude suggère que les hauts niveaux de fer libre, dans les kystes endométrioïdes, sont fortement associés à un stress oxydatif élevé et à des mutations fréquentes dans l'ADN. Ceci pourrait être responsable d'une transformation maligne.

Ainsi, à ce jour, aucune étude n'a réussi à établir un lien entre les anomalies du métabolisme du fer et l'EOC. Nous avons donc choisi d'étudier l'EOC et les désordres de surcharge du fer, en particulier l'HH de type 1.

## **II. OBJECTIFS ET BUTS SPÉCIFIQUES**

## II. OBJECTIFS ET BUTS SPÉCIFIQUES

*Le fer est un nutriment indispensable pour la division cellulaire et ce, incluant les cellules cancéreuses*

**Hypothèse :** Étant donnée l'influence de la protéine HFE dans la cellule, des mutations du gène *HFE* pourraient favoriser la prolifération et la progression des cellules cancéreuses épithéliales de l'ovaire.

**Objectif :** Comprendre le rôle des mutations *HFE* dans la progression tumorale. Afin d'atteindre cet objectif, les buts spécifiques suivants sont proposés :

### **But spécifique 1 :**

- a) Étudier la fréquence allélique des mutations *HFE* chez des patientes avec tumeurs ovariennes bénignes, limites (borderline) et malignes.
- b) Étudier l'impact des mutations *HFE* sur la survie des patientes avec cancer épithélial de l'ovaire.

### **But spécifique 2 :**

Étudier l'influence des mutations *HFE* sur les cellules cancéreuses :

- a) Générer des lignées cellulaires du cancer épithélial de l'ovaire exprimant la protéine HFE sauvage (non mutée) ou la protéine mutée (mutation C282Y).
- b) Étudier l'impact des mutations *HFE* sur la prolifération des cellules cancéreuses.

### **But spécifique 3 :**

Étudier l'influence du fer corporel, dû aux mutations *HFE*, sur la croissance tumorale :

- a) Générer un modèle de souris double mutante *HfeRag1*<sup>-/-</sup>
- b) Étudier si la déficience de la protéine HFE chez l'hôte, contrairement aux mutations dans les cellules cancéreuses, influence la croissance d'une lignée cellulaire du cancer de l'ovaire.

### **III. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### **Échantillons et données sur les patientes**

Les échantillons d'ADN de 722 patientes ont été obtenus de la banque de tissus et de données du Réseau de recherche sur le cancer des fonds de la recherche en Santé du Québec (FRSQ). Le sang des patientes a été prélevé suite à une chirurgie effectuée dans la Division de Gynécologie et Oncologie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHUM et un consentement écrit a été obtenu des patientes avant le prélèvement des échantillons. Brièvement, l'ADN a été extrait des échantillons de sang par la méthode phénol-chloroforme et a été dilué pour obtenir une concentration de 100 ng/ $\mu$ L. Les données cliniques ont été obtenues du Système d'Archivage des Données en Oncologie (SARDO), incluant l'âge au diagnostic, la date de décès ou de dernière visite, le grade, le stade et l'histopathologie de la tumeur. L'histopathologie, le grade et le stade de la tumeur ont été déterminés par un pathologiste selon les critères de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO).

Le groupe contrôle inclue les patientes possédant d'autres pathologies gynécologiques non cancéreuses : kyste aux trompes, kyste folliculaire, kyste endométriosique, endométriose, saignements, grossesse ectopique, hydrosalpinx et inflammation, hématosalpinx, salpingite et ovarite, léiomyome à l'utérus ou au myomètre, polype endocervical, hyperplasie glandulaire ou complexe de l'endomètre, fibrome utérin, lésion du col, masse pelvienne ou mésonéphrome bénin (ligament large). Les patientes avec antécédents familiaux n'ont pas été considérées dans le groupe contrôle. Les tumeurs ovariennes se divisent en tumeur de type bénin (BOV), borderline (LMP) ou invasive (TOV). Parmi les différentes histologies, on retrouve les tumeurs de type séreux, mucineux, endométrioïde, à cellules claires et autres (transitionnelles, métastatiques, mucipares ou indifférenciées). L'âge moyen ainsi que les intervalles d'âge sont détaillées dans le Tableau II.

Tableau II. Description des patientes à l'étude

Groupes	Nombre de patientes (%)							
	Total n=722	Contrôle n=79	Tumeur ovarienne				Cancer Endomètre n=92	Autres Cancers n=36
			Antécédents familiaux n=13	Bénin n=147	Borderline n=102	Invasive n=253		
<b>Âge moyen</b>	56	56	57	56	56	56	57	57
<b>Intervalle (âge)</b>	14-91	21-67	37-57	23-91	14-80	27-89	14-83	31-82
≤ 40 ans	63(8.7)	11(13.9)	2 (15.4)	15 (10.2)	20 (19.6)	10 (4.0)	2(2.2)	4(11.1)
41-50 ans	179(25)	33(41.8)	7(53.8)	39 (26.5)	34 (33.3)	41 (16.2)	10(10.9)	15(41.7)
51-60 ans	222 (30.7)	28(35.4)	4(30.8)	42 (28.6)	21(20.6)	73 (28.9)	26(28.3)	9(25.0)
≥ 60 ans	258 (35.7)	7(8.9)	0(0)	51 (34.7)	27(26.5)	129 (51.0)	54(58.7)	8(22.2)
<b>Histologie tumeurs ovariennes</b>								
Séreux	292 (58.2)	---	---	63 (42.9)	49(48.0)	180 (71.0)	---	---
Mucineux	91 (18.1)	---	---	35 (23.8)	50(49.0)	6 (2.4)	---	---
Endométrioïde	30 (6.0)	---	---	0(0)	1(1.0)	29 (11.5)	---	---
Cellules claires	19 (3.8)	---	---	0 (0)	0(0)	19 (7.5)	---	---
<b>Autres</b>	69 (13.7)	---	---	49 (33.3)	2(2.0)	18 (7.1)	---	---

### Génotypage des mutations *HFE*

Afin de déterminer le génotype de la lignée cellulaire TOV-112D et celui de 300 patientes, la méthode de réaction en chaîne de la polymérase et polymorphisme des fragments de restriction (PCR-RFLP) a été utilisée. L'amplification par PCR a été effectuée dans l'appareil Hybaid (Hybaid Limited Middlesex, UK). Brièvement, 13.5µL d'H<sub>2</sub>O stérile est ajouté suivit de 2µL de tampon 10X (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 15 mM MgCl<sub>2</sub> et 500 mM KCl) (PCR kit ; Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) et de 1.6µL (2.5mM) de chaque dNTP. Par la suite, 0.3µL des amorces *hC282Y-F* 5'-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3' et *hC282Y-R* 5'-TACCTCCTCAGGCACTCCTC-3' (35pM/µL) ou *hH63D-F* 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3' et *hH63D-R* 5'-GCCACATCT GGCTTGAAATT-3' ont été ajoutés au mélange (Alpha DNA, Montréal, Canada). Pour finir, 2µL de Taq DNA Polymérase (Amersham Pharmacia Biotech) a été rajouté au mélange pour un volume total de 20µL (10µL du mélange réactionnel et 10µL d'ADN génomique (100ng/µL)). Le programme de PCR utilisé pour l'amplification de la région incluant la mutation C282Y : 3 minutes à 94°C, (30 secondes à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 66°C, 1 minute à 72°C) x 33 cycles et 5 minutes d'extension à 72°C. Le programme utilisé pour amplifier la région contenant la mutation H63D : 5 minutes à 94°C, (30 secondes à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 66°C, 30 secondes à 72°C) x 35 cycles et 10 minutes d'extension à 72°C. Les produits de PCR ont tous été vérifiés sur gel d'agarose 2% (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

Les produits de PCR ont été digérés par deux enzymes de restriction différentes. Les fragments incluant la région H63D ont été digérés par l'enzyme Mbo I (Invitrogen) suivant le protocole suivant : 7µL d'H<sub>2</sub>O stérile, 2µL de tampon react 2 et 1µL de l'enzyme Mbo I. Pour ce qui des fragments incluant la région C282Y, ils ont été digérés par l'enzyme Rsa I (Invitrogen) de la manière suivante : 7µL d'H<sub>2</sub>O stérile, 2µL de tampon react 1 et 1µL de l'enzyme Rsa I. Le volume de réaction total est de 20 µL, soit 10 µL du mélange enzymatique et 10 µL de la solution contenant soit les fragments amplifiés pour H63D ou C282Y. La digestion s'est fait à 37°C pour 1 heure. Les produits de digestion ont été visualisés sur gel d'acrylamide 30% (Amersham Pharmacia Biotech).

Le reste des patientes (422) ont été génotypées par la méthode de RT-PCR au département de biochimie du Centre Hospitalier de l'université de Montréal (Hôpital St-Luc).

### **Mesures des paramètres du fer des patientes**

Les échantillons de sang provenant des patientes ont été centrifugés de manière à obtenir le sérum. Ce sérum a ensuite été envoyé au laboratoire de biochimie du CHUM (Hôpital Notre-Dame) afin d'analyser les différents paramètres du fer : les niveaux de fer du sérum, la saturation de la transferrine, la transferrine et la ferritine.

### **Génération des plasmides exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub>**

Le plasmide pUHD-HFE<sub>wt</sub> et pUHD-HFE<sub>C282Y</sub> ont été obtenus du laboratoire du Dr. Kostas Pantopoulos situé à l'Institut de Recherche Lady Davis de l'Hôpital Général Juive de Montréal [269]. Tel que décrit par Wang et al, les inserts de 1 kb codant pour la protéine HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> et contenant à leur extrémité C-terminale l'épitope hémagglutinine (HA), ont été introduits aux sites *Bam*H1/*Bam*H1 du plasmide pUHD 10-3. Étant donnée la présence, dans ce plasmide, d'un promoteur hCMV inductible à la tétracycline, nous avons décidé d'exciser les inserts HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> du plasmide pUHD 10-3 pour les introduire dans le plasmide pCDNA 3.1 (+) (Invitrogen) (Figure 13). Les constructions avec les orientations correctes ont été identifiées par digestion enzymatique par EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) et séquencées pour confirmer la présence de la mutation (voir amorces décrites ici-bas dans la section mesure de l'expression de HFE dans les clones stables).



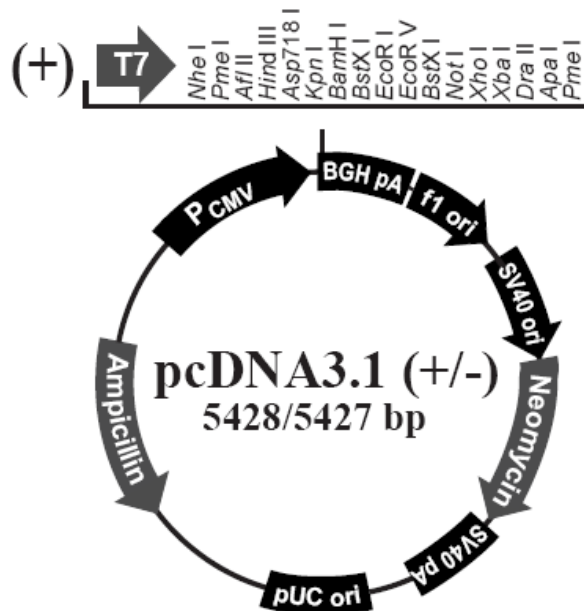


Figure 13. Plasmide pCDNA 3.1+

### Lignées cellulaires de l'EOC

Les lignées cellulaires utilisées dans les expériences *in vitro* et *in vivo* sont dérivées d'un carcinome endométrioïde de grade 3 (TOV-112D) et d'un carcinome à cellules claires de grade 3 (TOV-21G). Il faut spécifier que la lignée TOV-112D, homozygote pour la mutation C282Y, a été utilisée pour les études *in vitro* afin d'évaluer l'influence des mutations HFE sur les cellules cancéreuses. En effet, il a été question de restaurer la fonction de la protéine HFE dans cette lignée. Pour ce qui est de la lignée TOV-21G, elle a été génotypée de type sauvage, pour la mutation C282Y, et a été utilisée pour observer l'influence des niveaux de fer dans les études *in vivo*. Les cellules ont été mises en culture dans un milieu OSE (Wisent, Qc, Canada) auquel ont été ajoutés du sérum fœtal bovin (FBS) 10%, 2.5µg/ml d'amphotéricine B et 50µg/ml de gentamycine. Les cellules ont été incubées dans 5% de CO<sub>2</sub> et 5% d'O<sub>2</sub>.

## **Transfections**

Un jour avant la transfection,  $0.5 \times 10^6$  cellules TOV-112D ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits, dans un milieu OSE sans antibiotiques, de manière à avoir une confluence de 70-80% le jour de la transfection. Le protocole a été suivi selon les indications du manufacturier (Invitrogen). Brièvement, rincer les cellules avec du PBS. Ajouter 2 $\mu$ g d'ADN plasmidique à du milieu OSE non supplémenté d'antibiotiques ou de FBS pour obtenir un volume total de 250 $\mu$ L nécessaire pour chaque puit. Dans une eppendorf distincte, ajouter 6  $\mu$ L de Lipofectamine (Invitrogen) à du milieu OSE non supplémenté d'antibiotiques ou de FBS pour obtenir un volume total de 250 $\mu$ L nécessaire pour chaque puit. Combiner le mélange contenant l'ADN au mélange contenant la lipofectamine (volume totale de 500 $\mu$ L). Ajouter le mélange de 500 $\mu$ L à chacun des puits et compléter avec du milieu non supplémenté. 5 heures suivant la transfection, ajouter 200  $\mu$ L de FBS à chacun des puits. Des transfections transitoires ont été effectuées 24 heures et 48 heures après la transfection afin de mesurer l'efficacité de transfection des cellules TOV-112D. Pour ce faire, les cellules ont été cotransfectées avec 2 $\mu$ g du vecteur GFP (Invitrogen) et la fluorescence a été analysée par cytométrie de flux et visualisée grâce au microscope Nikon Eclips TE300 (Nikon Inc., Germany).

Pour ce qui est de la génération des clones stables exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub>, ou exprimant le vecteur vide, 800 $\mu$ g/mL de l'agent de sélection G418 (Gibco/BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) ont été ajoutés 48 heures après la transfection. L'expression de HFE dans les clones stables a été confirmée par PCR, qRT-PCR et Western-Blot.

## **Mesure de l'expression de HFE dans les clones stables par PCR et qRT-PCR**

L'ARN total a été extrait avec du Trizol (Invitrogen). L'ARN a été extrait directement des clones stables. La qualité de l'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

La synthèse du cDNA a été effectuée par transcription inverse (RT) grâce au kit Omniscript RT (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) en utilisant des amorces aléatoires (random

primers) et l'inhibiteur de la RNase (Invitrogen). Les niveaux d'ARNm des clones HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> ainsi que la  $\beta$ -actine ont été mesurés par RT-PCR dans un système de détection d'ADN en temps réel Rotor Gene 3000 (Montreal Biotech Inc., Kirkland, Qc, Canada) en utilisant le QuantiTect SYBR+Green I PCR Kit (Qiagen). Brièvement, le SYBR Green a été ajouté à 3 $\mu$ L de cDNA et 10 $\mu$ M de chaque amorce pour un volume total de 15 $\mu$ L. Les expériences ont été faites en triplicata et des dilutions en série (1 :10) avec des produits de PCR ont été effectuées pour générer une courbe standard ayant une excellente efficacité (90-96%). Toutes les amorces ont été conçues grâce au logiciel Primer3. Les amorces suivantes ont été utilisées *h* $\beta$ -actine-F 5'-CTGAACCCCAAGGCCAAC-3', *h* $\beta$ -actine-R 5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3', *h*HFE-F 5'-CAATGGATGCCAAGGAGTTC-3' et *h*HFE-R 5'-AGGCACCAGTCGAGGCTG-3'. Les niveaux d'expression ont été normalisés par le gène de contrôle interne  $\beta$ -actine. Le contrôle utilisé est l'ADNc provenant des cellules TOV-112D transfectées avec le vecteur pCDNA3.1+ vide.

La présence de l'ADNc de HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> dans les clones stables a également été vérifiée par PCR régulière suivi d'une électrophorèse sur gel 1% en utilisant les mêmes amorces que pour la qRT-PCR et les mêmes conditions décrites plus haut pour le génotypage de *HFE*. De plus, L'ADNc a également été envoyé au département de séquençage du CHUM (Hôpital Notre-Dame) afin de vérifier la présence de la mutation (amorces identiques à celles utilisées pour la qRT-PCR).

### **Western Blot**

Les clones stables ont été lysés avec 1M Tris-HCl pH 7.4, 100 $\mu$ L Triton X-100 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases 25X et les concentrations de protéine ont été obtenues grâce au BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Le lysat cellulaire contenant les protéines a été bouilli pendant 5 minutes dans du tampon de chargement SDS 2X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 200mM dithiothreitol (DTT), 4% SDS, 0.2 de bleu de bromophenol et 20% glycérol). Des montants équivalents de protéines ont été chargés de manière à effectuer une électrophorèse de polyacrylamide du sulfate dodécylrique de sodium (SDS-PAGE) et à être transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C super, Amersham). Les blots ont été bloqués par incubation d'une heure avec une solution de 5% de lait dans du PBS

contenant 0.1% de Tween 20 (PBS-T). Ensuite ils ont été incubés à 4°C toute la nuit avec les anticorps primaires suivant : anti-HA de souris (1 :1000) (Roche Diagnostics, Laval, Canada), anti- $\beta$ actine de souris (Abcam, Cambridge, UK) (1 :2500), anti-TfR de souris (Zymed Laboratories, San Francisco, USA) (1 :500). Après 3 lavages de 15 minutes chacun avec du PBS-T, les blots ont été incubés pendant 1 heure avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris marqué à la peroxidase (Amersham) (1 :3000). Les anticorps secondaires couplés à la peroxidase ont été détectés avec la solution ECL (Amersham).

### **Traitement des cellules TOV-112D avec DFO et FAC**

Pour le traitement avec la desferrioxamine (DFO), les cellules TOV-112D (non transfectées) ont étéensemencées de manière à obtenir une confluence de 40-50% le lendemain. 24 heures après l'ensemencement, le milieu a été changé pour un milieu OSE dépourvu de sérum et les cellules ont été incubées 24 heures. Ensuite, les pétris ont été lavés pour ensuite ajouter un milieu complet. La DFO (Mayne Pharma, Montréal, Canada) (200 $\mu$ M) a été ajoutée aux cellules et elles ont été incubées 48 heures. Pour le traitement avec le citrate d'ammonium ferrique (FAC), les cellules TOV-112D ont étéensemencées dans un milieu complet de manière à obtenir une confluence de 40-50% le lendemain et 24 heures après l'ensemencement, 20 $\mu$ M de FAC (Fisher Scientific Lt., Montréal, Canada) a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 24 heures. Les cellules traitées avec DFO et FAC ont été utilisées comme contrôle. Les détails expliquant le choix de ces deux agents comme contrôle se retrouvent à la page 73.

### **Marquage de surface du CD71 (TfR) et Analyse de cytométrie en flux (FACS)**

Brièvement, les cellules ont été lavées et resuspendues dans 2 mL d'une solution de PBS contenant 0.1% BSA et 0.1% NaAz, de manière à avoir 10<sup>6</sup> cellules par tube. Après centrifugation et décantation, chaque tube a été incubé avec 25 $\mu$ L de la solution de blocage (2.5mL de PBS-BSA-NaAz et 500 $\mu$ L de IgG humaine (1mg/mL)) pendant 10 minutes à 4°C, rincer et centrifuger. Incuber les cellules avec l'anticorps primaire CD71-FITC (Invitrogen) (4 $\mu$ L pour 10<sup>6</sup> cellules) sur glace pendant 1 heure. Après avoir rincé et décanté, resuspendre les cellules dans 250 $\mu$ L de PBS-BSA-NaAz et fixer avec 250 $\mu$ L de Paraformaldehyde 4%. Les niveaux de TfR ont été analysés par FACS grâce au Coulter

Epics XL-MCL. Les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ont été utilisées pour comparer les niveaux de TfR. Les cellules traitées avec DFO et FAC ont été utilisées comme contrôle, ainsi que les cellules transfectées avec le vecteur vide.

### **Étude de Prolifération des clones stables**

Un test utilisant le MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a été utilisé pour mesurer la prolifération des clones stables. Le test MTT est un test colorimétrique mesurant la réduction du MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) en formazan qui est directement proportionnelle au nombre de cellules viables. Dans ce test, 5 plaques de 6 puits ont été générées au début de l'expérience et ont servi à évaluer la prolifération des clones à chaque jour. Brièvement, 24 heures avant le jour 1 de l'expérience,  $10^4$  cellules de clones stables de TOV-112D ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. Le jour 1 de l'expérience correspondait à 24 heures après l'ensemencement, jour 2 à 48 heures, jour 3 à 72 heures, jour 4 à 96 heures et le jour 5 à 120 heures. Ainsi, à chaque jour, 0.2 mg/mL de MTT a été ajouté au milieu de culture et les cellules ont été ensuite incubées à 37°C pendant 4 heures. Le formazan résultant de la réaction a été dilué avec de l'isopropanol acidifié (0.04N HCl) et la densité optique a été mesurée à 570 nm avec une longueur d'onde référence de 655 nm à l'aide du lecteur de microplaques Bio-Rad Modèle 3550. À la fin de l'acquisition des données, la prolifération a été calculée en soustrayant la valeur du bruit de fond du MTT (lecture obtenue avec milieu de culture seul+MTT) à toutes les valeurs. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

### **Génération des souris HfeRag1-/-**

Toutes les procédures ont été effectuées en accord avec les lignes directrices sur les soins des animaux du Conseil Canadien et ont également été approuvées par le comité Institutionnel de la Protection des Animaux (CIPA) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Les souris Hfe-/- ont été décrites précédemment [270, 271]. Ces souris, qui étaient initialement d'origine 129/SvEvTac, ont été croisées avec la souche C57BL/6 (B6) pendant 10 générations. Les souris Rag1-/- de souche B6 ont été achetées des Laboratoires Jackson (Bar harbor, ME). Toutes les souris ont été gardées dans des

conditions stériles spécifiques (exempt d'organismes pathogènes). Les souris *Hfe*<sup>-/-</sup> ont été croisées avec les souris *Rag1*<sup>-/-</sup> pour donner une génération F1 hétérozygote pour les 2 gènes. Les générations subséquentes ont été effectuées pour obtenir des souris double-mutante et le génotypage a permis de sélectionner les souris *HfeRag1*<sup>-/-</sup>. Les amorces utilisées pour le génotypage sont décrites dans le Tableau III et les PCR ont été effectuées selon le programme suivant : 5 minutes à 94°C, (30 secondes à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C, 1 minute à 72°C) x 33 cycles et 2 minutes d'extension à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'électrophorèse et les longueurs des fragments attendus étaient les suivantes : *HFE*<sup>+/+</sup> (485 pb), *HFE*<sup>-/-</sup> (190 pb), *HFE*<sup>+/-</sup> (485 pb et 190 pb), *Rag1*<sup>+/+</sup> (474 pb), *Rag1*<sup>-/-</sup> (530 pb) et *Rag1*<sup>+/-</sup> (530 pb et 474 pb).

Tableau III. Amorces utilisées pour génotypage du gène *HFE* et *Rag1* des souris

Amorces	Séquences
<i>mHFEWt-F</i>	5'-AGTTGGGAGTGGTGTCCGA-3'
<i>mHFEWt-R</i>	5'-TGGCTACAGTGTGAGAGGC-3'
<i>mHFENeo-R</i>	5'-CTAGCTTCGGCCGTGACG-3'
<i>mRag1-F</i>	5'-TGGATGTGGAATGTGTGCGAG-3'
<i>mRag1-R</i>	5'-GAGGTTCCGCTACGACTCTG-3'
<i>mRag1-Neo</i>	5'-CCGGACAAGTTTTTCATCGT-3'

### Croissance *in vivo* dans les souris *HfeRag1*<sup>-/-</sup>

Les femelles *HfeRag1*<sup>-/-</sup> et les souris *Rag1*<sup>-/-</sup> âgées d'environ 45 jours ont été utilisées pour comparer la croissance tumorale *in vivo*. Les souris *Rag1*<sup>-/-</sup> ont été utilisées pour les raisons suivantes : ce sont des souris immunodéficientes et celles-ci sont de souche B6 ce qui a permis de faire le croisement avec les souris *HFE*<sup>-/-</sup> qui sont, elles aussi, de souche B6. De plus, les souris *HFE*<sup>-/-</sup> sont un modèle d'HH qui a été étudié et validé précédemment dans notre laboratoire [270, 271]. Chaque souris a été injectée de manière sous-cutanée (s.c.), dans le flanc gauche sous légère anesthésie, avec 10<sup>6</sup> cellules TOV-21G suspendues dans 100µL de PBS et auxquelles 100µL de Matrigel (Becton-Dickinson, Bedford, MA) a été ajouté. Les souris ont été maintenues dans des conditions stériles avec accès non limité

à de l'eau et de la nourriture. Les souris ont mis 12 jours avant de développer des tumeurs pouvant mesurables et ont été sacrifiées 47 jours après l'injection, soit avant que la masse tumorale atteigne le point limite établi par le CIPA. Les tumeurs ont été mesurées 3 fois par semaine et le volume tumoral en  $\text{mm}^3$  a été estimé avec la formule  $V=L \times l \times h$  (largeur, longueur, hauteur). Au total, 7 souris ont été utilisées pour le groupe expérimental Rag<sup>-/-</sup> et 9 souris pour le groupe HfeRag1<sup>-/-</sup>. Des souris contrôles non injectées ont également été utilisées soit 6 souris pour le groupe Rag1<sup>-/-</sup> et 9 souris pour le groupe HfeRag1<sup>-/-</sup>. Cette expérience préliminaire a été effectuée qu'une seule fois.

### **Mesure du fer dans le sérum (SI) des souris HfeRag1<sup>-/-</sup>**

Au jour du sacrifice, le sang a été prélevé des souris Rag1<sup>-/-</sup> et HfeRag1<sup>-/-</sup> et centrifugé afin d'obtenir le sérum. Le fer du sérum a ensuite été mesuré par une méthode colorimétrique avec le système Kodak Ektachem DT60 (Johnson & Johnson, Ortho-Clinical Diagnostics, Mississauga, ON, Canada)

### **Analyses statistiques**

Les fréquences génotypiques et alléliques pour les mutations *HFE* ont été obtenues en utilisant le chi carré, test exact de Fisher nous donnant un *p* corrigé tenant compte des petits effectifs. Le logiciel qui a été utilisé pour obtenir ces résultats est Statview (SAS Institute, Cary, NC, USA). La significativité des mutations *HFE* à pouvoir prédire la survie des patientes avec EOC a été obtenue en effectuant des courbes de survie Kaplan-Meier couplées à un test log-rank. Une analyse multi-variée de Cox a également permis d'obtenir un facteur de puissance (Wald) et un risque relatif de manière à vérifier si la mutation C282Y est un marqueur puissant quant à la survie des patientes. Un test de corrélation de Spearman a été utilisé pour estimer la corrélation entre les différents paramètres de fer et le grade de la tumeur. Ce dernier test nous a permis d'obtenir le coefficient de corrélation (*r*) et une valeur de *p* reflétant la significativité de la corrélation. Les courbes Kaplan-Meier, l'analyse de Cox ainsi que les analyses de corrélations ont été effectuées grâce au logiciel SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Les données obtenues par les expériences *in vitro* et *in vivo* ont été analysées par le Student's *t* test (unpaired, two-tailed). Dans tous les cas, des

valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées significatives. Toutes les expériences *in vitro* ont été répétées 3 fois, à l'exception de l'étude *in vivo* qui a été effectuée qu'une seule fois.



## **IV. RÉSULTATS**

## IV. RÉSULTATS

### 1. Études chez les patientes avec cancer épithélial de l'ovaire

#### 1.1 Fréquence des mutations H63D et C282Y des patientes à l'étude

Un total de 722 patientes ont été génotypées de manière à étudier la fréquence génotypique et allélique des mutations H63D et C282Y (Tableau II). Cette population regroupe des patientes présentant diverses pathologies de l'ovaire ; tumeurs bénignes, borderlines ou invasives et également des patientes présentant d'autres pathologies gynécologiques non cancéreuses (population contrôle), des patientes avec antécédents familiaux, cancer de l'endomètre et autres. Ainsi, lorsque l'ensemble de ces patientes est comparé à la population néonatale québécoise [158], les fréquences génotypiques et alléliques sont semblables ( $p = 0.25$  pour les mutations H63D et  $p = 0.29$  pour les mutations C282Y) (Tableau IV). Ceci suggère que les patientes à l'étude sont représentatives de la population québécoise quant aux fréquences des mutations *HFE*. Toutefois, ces fréquences alléliques sont différentes lorsque les patientes sont regroupées dans des groupes distincts (Tableau V). En effet, la fréquence allélique des mutations C282Y est de 1.3% pour le groupe contrôle comparativement à 5.9% pour les patientes avec tumeur ovarienne invasive (TOV) et également à 5.9% pour les patientes avec tumeur borderline (LMP). Ainsi, la fréquence de l'allèle Y est significativement plus élevée pour les groupes avec tumeurs (soit LMP, TOV ou LMP+TOV) versus une population de patiente sans tumeur cancéreuse ( $p = 0.02$ ). Une différence significative est également notable lorsque la fréquence allélique des mutations C282Y des patientes avec tumeurs (TOV, LMP ou TOV+LMP) est comparée à celle des patientes avec cancer de l'endomètre, autre cancer gynécologique. Cette fréquence est de 5.9% pour les patientes avec tumeur versus 2.2% pour les patientes avec cancer de l'endomètre ( $p = 0.04$ ). Il est à noter qu'aucune différence significative n'a été retrouvée pour les fréquences alléliques des mutations H63D ( $p > 0.05$ ). Spécifions que pour cette étude, les patientes avec tumeurs bénignes n'ont pas été incluses car nous voulions étudier les tumeurs ovariennes (limites et invasives) et seules les patientes ayant une pathologie gynécologique ont été considérées (expliquant un  $n = 526$  dans le Tableau V). Les patientes ayant d'autres cancers tels que le cancer du colon,

gastrointestinal ou de la peau n'ont pas été considérées pour les études présentées dans ce mémoire.

Tableau IV. Génotype et fréquence allélique de la population néonatale québécoise et des patientes à l'étude

	Mutation C282Y						Mutation H63D						
	<i>n</i>	Génotype			Allèle		<i>n</i>	Génotype			Allèle		CH <sup>a</sup>
		WT/WT	WT/Y	Y/Y	WT	Y		WT/WT	WT/D	D/D	WT	D	
<b>Néonataux<sup>b</sup></b>	881	805 (91.4) <sup>c</sup>	76 (8.6)	0 (0.0)	1686 (95.6)	76 (4.4)	870	578 (66.4)	271 (31.1)	21 (2.4)	1427 (82.0)	313 (18.0)	15 (1.7)
<b>Patientes à l'étude</b>	722	657 (91.0)	63 (8.7)	2 (0.3)	1377 (95.4)	67 (4.6)	722	504 (69.8)	198 (27.4)	20 (2.8)	1206 (83.5)	238 (16.5)	10 (1.4)

<sup>a</sup> Composite hétérozygote (WT/Y) (WT/D)

<sup>b</sup> Données obtenues de [158]

<sup>c</sup> Les chiffres entre parenthèses sont en pourcentage

Tableau V. Génotype et fréquence allélique des mutations H63D et C282Y des différentes pathologies de l’ovaire.

Allèles/Génotypes	Population contrôle <i>n</i> : 79	LMP <i>n</i> : 102	TOV <i>n</i> : 253	Cancer endomètre <i>n</i> : 92
<b>Allèles</b>				
Y	2/158 (1.3) <sup>a</sup>	12/204 (5.9)	30/506 (5.9)	4/184 (2.2) <sup>b</sup>
D	23/158 (14.6)	31/204 (15.2)	85/506(16.8)	33/184 (17.9)
<b>Génotypes</b>				
<b>Mutation C282Y</b>				
WT/WT	77/79 (97.4)	90/102 (88.0)	225/253 (88.9)	88/92 (95.7)
WT/Y	2/79 (2.5)	12/102 (11.8)	26/253 (10.3)	4/92 (4.3)
Y/Y	0/79 (0.0)	0/102 (0.0)	2/253 (0.8)	0/92 (0.0)
<b>Mutation H63D</b>				
WT/WT	59/79 (74.7)	72/102 (70.6)	175/253 (69.0)	61/92 (66.3)
WT/D	17/79 (21.5)	29/102 (28.4)	71/253 (28.0)	29/92 (31.5)
D/D	3/79 (3.8)	1/102 (1.0)	7/253 (2.8)	2/92 (2.2)

<sup>a</sup> : différence significative entre population contrôle vs LMP et TOV ( $p = 0.02$ )

<sup>b</sup> : différence significative entre cancer endomètre vs LMP et TOV ( $p = 0.04$ )

## 1.2 Les patientes avec mutations C282Y ont un pronostique plus faible

Des courbes de survie Kaplan-Meier ont été générées afin de déterminer s'il existait une association entre la survie des patientes avec cancer épithélial de l'ovaire et les mutations *HFE*. Les patientes qui ont permis de générer ces courbes de survie sont celles avec tumeur ovarienne (G0-G3) et histopathologie de type séreux. En effet, ce dernier type histologique prédomine chez les patientes avec tumeurs ovariennes. Le nombre de patientes utilisé pour cette étude est distribué comme suit : G0 (n=47), G1 (n=6), G2 (n=31) et G3 (n=123).

En premier lieu, les mutations H63D ne semble pas influencer la survie des patientes (Figure 14 a-c). En effet, que ce soit toutes les tumeurs (G0-G3, n= 180), les tumeurs invasives (G1-G3, n= 140) ou seulement les tumeurs de G3 (n= 108), il n'y a pas de différence significative entre la survie des patientes sans mutations et avec mutations H63D ( $p > 0.05$ ). Toutefois, il y a une forte association entre les mutations C282Y et le pronostique des patientes. Cette association est évidente pour l'ensemble des tumeurs ((G0-G3, n=156)  $p = 0.01$ ), les tumeurs invasives (TOV G1-G3, n= 120)  $p = 0.01$ ) et les tumeurs TOV de G3 (n= 101) ( $p = 0.005$ ) (Figure 14 d-f). De plus, afin de vérifier si le grade ou l'âge influence la survie des patientes, une analyse de Cox a été effectuée (Tableau VI). Cette analyse démontre que la mutation C282Y est un marqueur de survie plus important que le grade de la tumeur ou l'âge des patientes. Ceci est démontré par un facteur de puissance de 10.11 pour la mutation comparativement à 0.141 et 0.627 pour le grade et l'âge respectivement ( $p = 0.001$ ). Cet analyse permet également d'obtenir un risque relatif de 3.1, suggérant que les patientes avec mutation C282Y ont 3 fois plus de chance d'avoir une faible survie ( $p=0.001$ ).

Figure 14. Survie des patients avec mutations *HFE* et cancer épithélial de l'ovaire. Représentation graphique Kaplan-Meier : Aucune association entre la survie et les mutations H63D a) toutes les tumeurs analysées (G0-G3) ( $p = 0.5$ ) b) les tumeurs invasives (G1-G3) ( $p = 0.5$ ) et c) les tumeurs de G3 seulement ( $p = 0.2$ ). Prognostique faible des patientes avec mutations C282Y : d) toutes les tumeurs (G0-G3) ( $p = 0.01$ ), e) les tumeurs invasives (G1-G3) ( $p = 0.01$ ) et f) tumeurs de G3 seulement ( $p = 0.005$ ). Les patientes avec un suivi moindre que 18 mois n'ont pas été considérées pour cette analyse. Le test de Log-Rank a été utilisé pour vérifier la significativité des différences en survie.

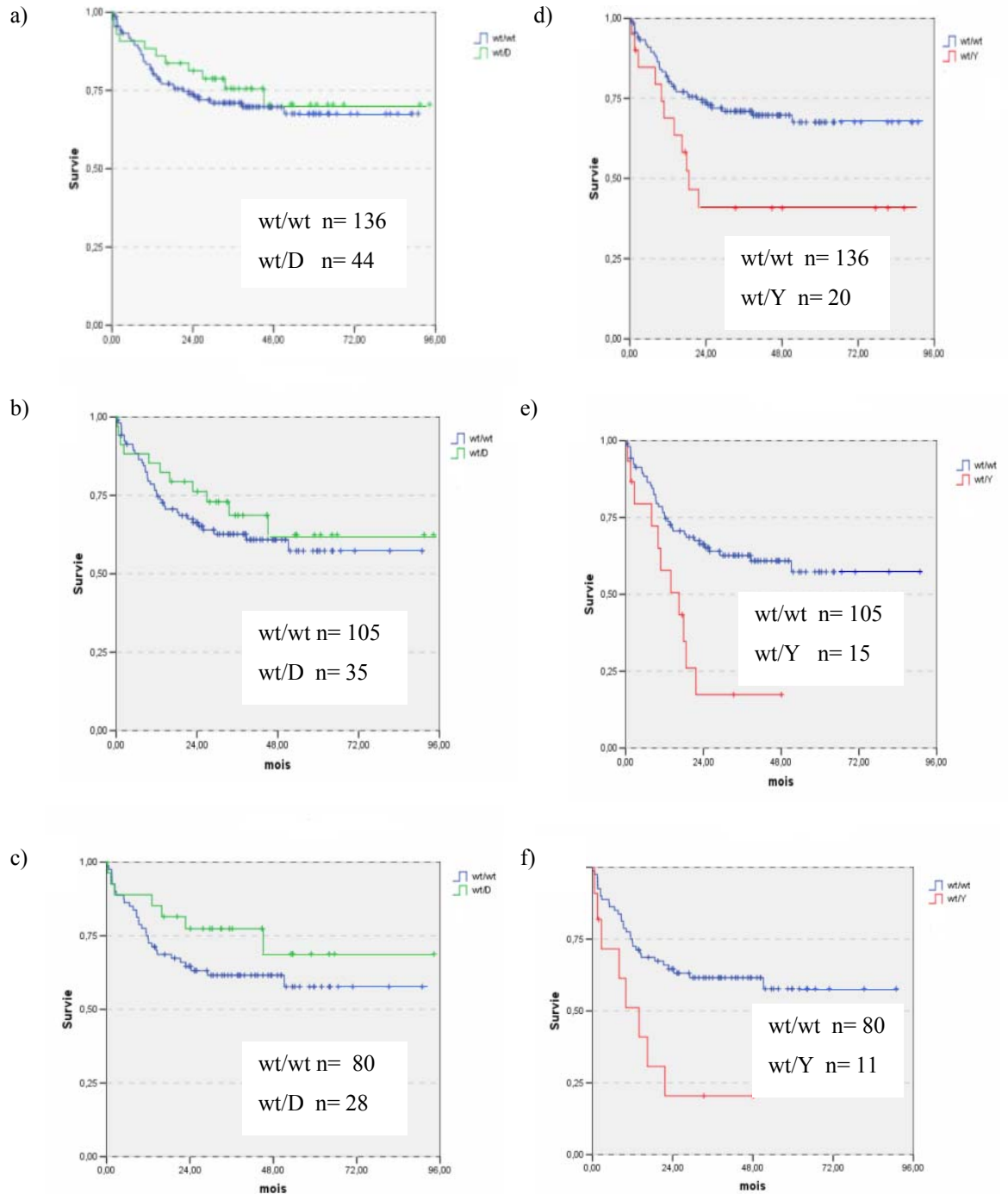


Tableau VI. Analyse multi-variée : Étude du risque relatif

Variables	Facteur de puissance (Wald)	Risque relatif	Significativité	IC, 95%
Mutation C282Y	10.113	3.1	0.001	[1.55-6.25]
Grade	0.141	1.1	0.707	[0.65-1.90]
Âge	0.627	1.0	0.429	[0.98-1.04]

### 1.3 Les paramètres de fer sont en corrélation avec le grade de la tumeur

De manière à voir si les paramètres sanguins du fer sont en lien avec le grade de la tumeur, les niveaux de fer, de ferritine, de transferrine et de saturation de la transferrine du sérum ont été mesurés chez 206 patientes G0 (n= 40), G1 (n= 16), G2 (n= 36), G3 (n= 114). Cette étude vise à étudier spécifiquement la relation qu'il existe entre les paramètres sanguins du fer et le grade de la tumeur et par conséquent, nous ne nous sommes pas attardés à vérifier la relation qu'il existait entre les patientes avec mutations HFE et le grade de la tumeur.

Suite à la récolte des paramètres de fer, un test de Kolmogorov-Smirnov a été effectué pour vérifier la normalité des données et un test de Spearman pour évaluer l'homogénéité des variances. Étant donné qu'une des variables étudiée (ferritine du sérum) ne rencontrait pas les critères d'homogénéité des variances, les études de corrélation ont été effectuées par un test de corrélation non paramétrique : corrélation de Spearman. Ce dernier test permet l'obtention d'un coefficient de corrélation et une valeur de  $p$  qui nous permet de vérifier la significativité de la corrélation. Quand la valeur du coefficient de corrélation est négative, cela signifie que lorsque la variable X augmente la variable Y diminue et vice versa. Ainsi, la Figure 15 illustre graphiquement les corrélations entre les différents paramètres du fer et le grade de la tumeur. Ces graphiques démontrent que plus le grade de la tumeur est élevé plus les niveaux de fer du sérum ( $r = -0.197$ ) et de saturation de la transferrine ( $r = -0.199$ ) sont significativement faibles ( $p= 0.005$  et  $0.004$  respectivement). De plus, plus le grade est élevé plus les niveaux de ferritine du sérum sont significativement plus élevés ( $r = 0.445$  et  $p= 0.00001$ ). Ces résultats suggèrent que la ferritine du sérum pourrait être un marqueur tumoral intéressant pour évaluer le pronostique des patientes.



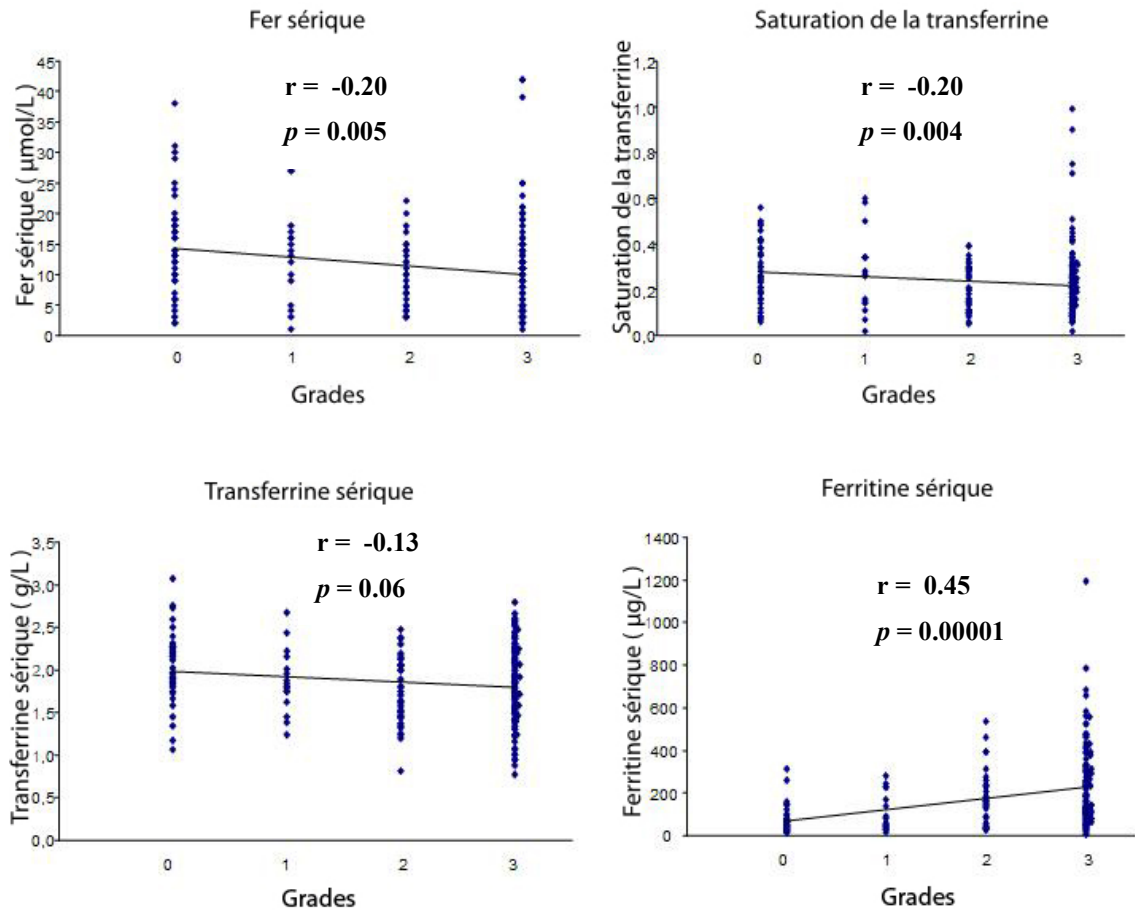


Figure 15. Corrélation entre les grades de tumeurs ovariennes (G0-G3) et les paramètres de fer (n= 206). Le test statistique utilisé pour cette analyse est le test de corrélation de Spearman et par conséquent, le symbole r représente le coefficient de corrélation de Spearman. a) Corrélation négative significative entre le fer du sérum et les grades de tumeur. b) Corrélation négative significative entre la saturation de la transferrine et le grade de la tumeur. c) Corrélation négative non significative entre la transferrine du sérum et le grade de la tumeur. d) Corrélation positive significative entre la ferritine du sérum et le grade de la tumeur.

## 2. Influence des mutations *HFE* sur les cellules cancéreuses

### 2.1 Génération de clones exprimant la protéine $HFE_{wt}$ et $HFE_{C282Y}$

Afin de vérifier si le fer favorise la croissance des cellules cancéreuses de l’ovaire, un modèle *in vitro* a été généré. Celui-ci consiste à construire des lignées cellulaires exprimant les protéines  $HFE_{wt}$  et  $HFE_{C282Y}$ . Ainsi, la lignée cellulaire TOV-112D, homozygote pour la mutation C282Y, a été transfecté afin de générer des clones stables capable d’exprimer la protéine  $HFE_{wt}$  et la protéine mutée  $HFE_{C282Y}$  (Figure 16). La lignée TOV-112D, étant mutée pour C282Y, n’exprimerait fort probablement pas la protéine HFE à la surface cellulaire. En effet, bien que l’expression de l’ARNm d’HFE ait été détectée dans cette lignée, des études précédentes ont démontrées que cette protéine serait exprimée dans le mauvais compartiment cellulaire et que par conséquent, l’expression ne se ferait pas à la surface de la cellule [136, 169]. Ainsi, la génération de ces clones permettra de tester la croissance tumorale des cellules  $HFE_{wt}$  et  $HFE_{C282Y}$ .

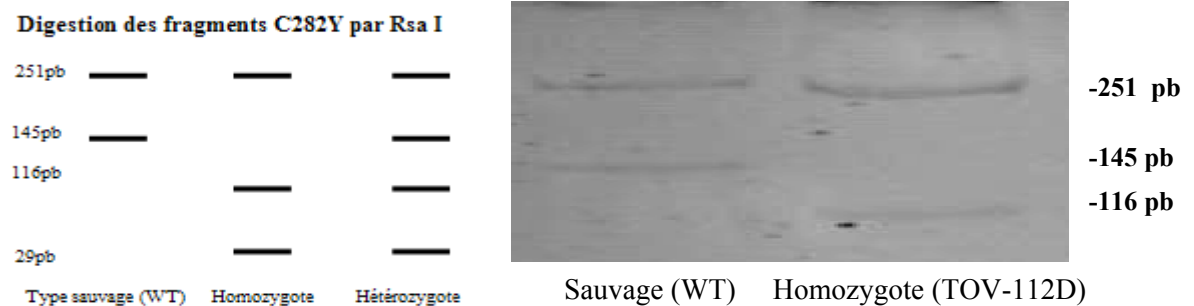


Figure 16. Génotype de la lignée du cancer épithélial de l’ovaire TOV-112D. Une digestion enzymatique par Rsa I indique clairement que la lignée TOV-112D est homozygote pour la mutation C282Y (bandes à 251pb et 116bp).

Des transfections transitoires des cellules TOV-112D ont d'abord été effectuées, pour mesurer l'efficacité de transfection, en co-transfectant les vecteurs HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> avec un vecteur GFP (Figure 17). Comme démontré par FACS et microscopie, ces cellules ont une bonne capacité de transfection avec un taux d'efficacité d'environ 70%. Ceci a permis de procéder aux transfections stables des cellules TOV-112D avec les vecteurs pcDNA 3.1 HFE<sub>wt</sub> et pcDNA 3.1 HFE<sub>C282Y</sub>.

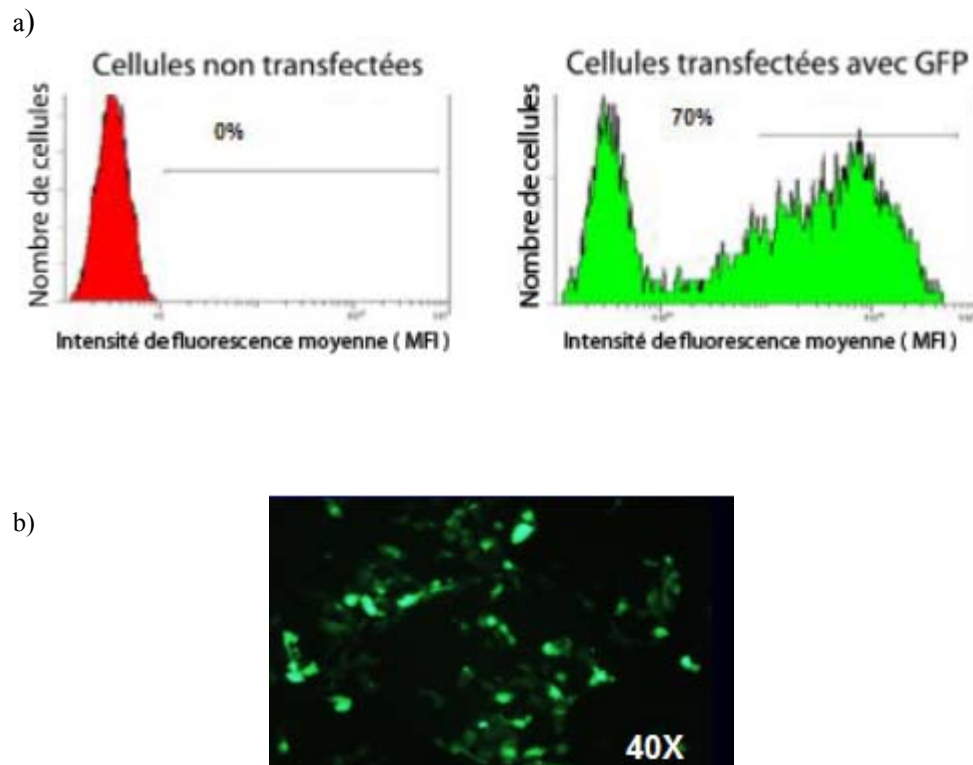


Figure 17. a) Efficacité de transfection des cellules TOV-112D en co-transfectant un vecteur GFP. Analyse par FACS montrant la fluorescence émise par le GFP. La MFI (intensité moyenne de fluorescence) a été utilisé pour mesurer le changement dans l'intensité de fluorescence dans la population de cellules TOV-112D transfectées au GFP. Les cellules TOV-112D transfectées ont une efficacité de transfection d'environ 70%. b) Cellules TOV-112D en microscopie montrant la fluorescence verte émise par le GFP.

Après avoir générés des clones stables dans les cellules TOV-112D, l'expression d'HFE a été vérifiée chez différents clones exprimant HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> (Figure 18). L'amplification du gène *HFE* par PCR régulière permet d'observer la présence de celui-ci dans les clones transfectés soit avec le pcDNA HFE<sub>C282Y</sub> (CY) ou le pcDNA HFE<sub>wt</sub> (Wt), et son absence dans les clones transfectés avec le pcDNA vide (E) (Figure 18a). Les niveaux d'expression des clones ont également été vérifiés par qRT-PCR (Figure 18b). On observe notamment une expression plus élevée pour le clone CY1 et le clone Wt2. L'expression de la protéine HFE Wt ou mutée a aussi été vérifiée par Western Blot (Figure 18c). Le profil de migration des protéines est semblable à celui qui a été décrit précédemment [269]; la protéine HFE<sub>wt</sub> migre à 45 et 48 kDa représentant respectivement des polypeptides partiellement et totalement glycosylés, alors que la bande de 48kDa est absente de la protéine HFE<sub>C282Y</sub> qui migre à 45 kDa et à une bande plus rapide de 42 kDa. La présence de la mutation et l'intégrité du vecteur ont également été vérifiées par séquençage (Figure 19).

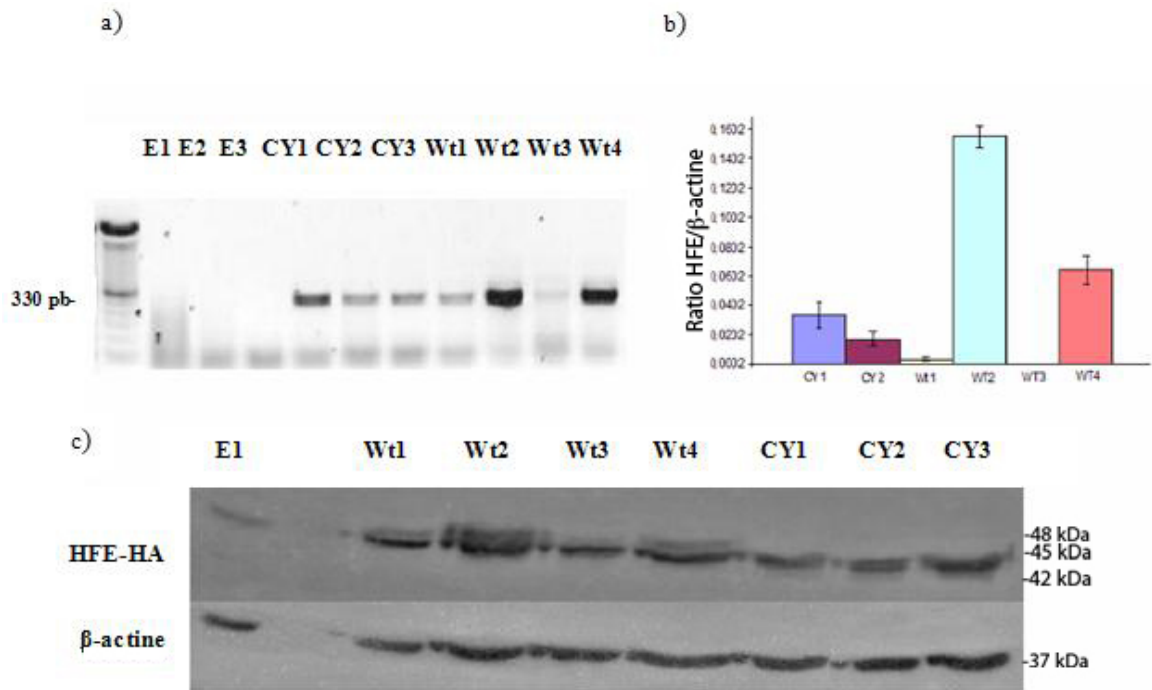


Figure 18. Expression de HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> dans les clones TOV-112D. a) Amplification du gène HFE par PCR dans les clones transfectés avec le vecteur vide (E), le vecteur HFE<sub>C282Y</sub> (CY) et le vecteur HFE<sub>wt</sub>. b) Expression de l'ARNm par RT-PCR dans les clones HFE<sub>C282Y</sub> et HFE<sub>wt</sub>. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne  $\pm$  SD. c) Expression des protéines HFE<sub>C282Y</sub> et HFE<sub>wt</sub> par Western Blot. La protéine HFE<sub>wt</sub> migre en deux bandes de 45 et 48 kDa et la protéine HFE<sub>C282Y</sub> migrant à 45 et 42 kDa.

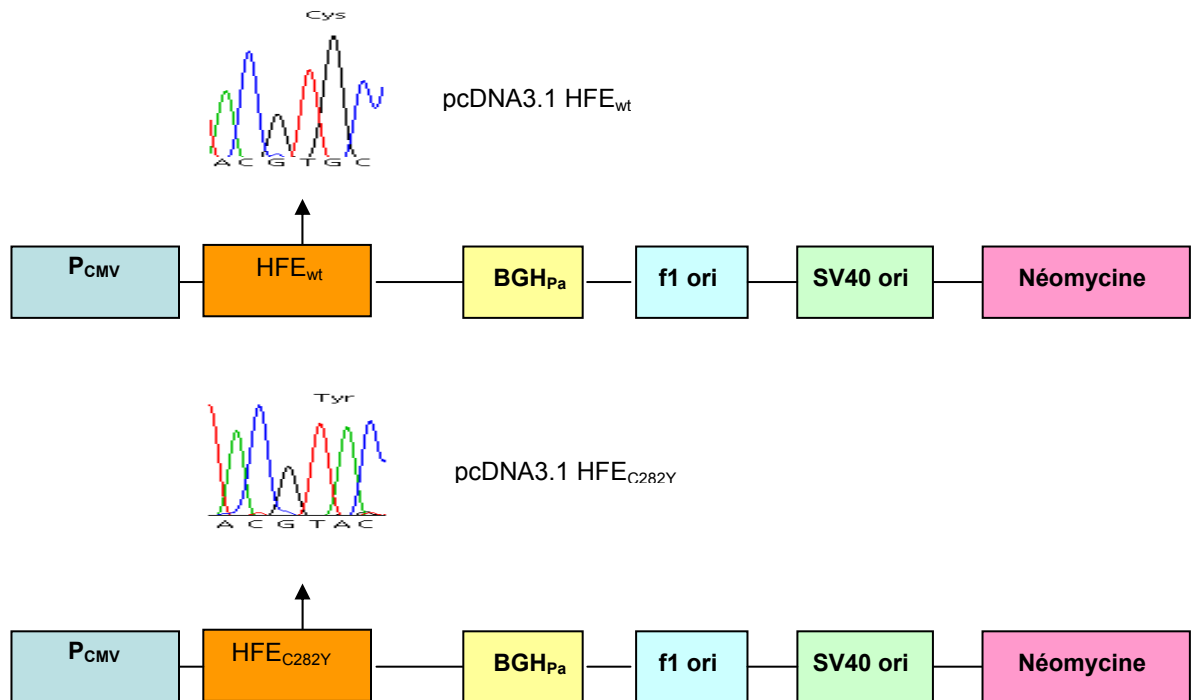


Figure 19. Séquençage des clones HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub>. La substitution G→A cause le changement d'une cystéine pour une tyrosine pour le clone muté pcDNA3.1 HFE<sub>C282Y</sub>. P<sub>CMV</sub> : promoteur CMV, BGH<sub>pa</sub> : Bovine growth hormone polyadenylation sequence, f1 ori : origine de répliation de l'ADN, SV40 ori : origine de répliation avec promoteur SV40, et le gène de résistance à néomycine.

## 2.2 Phénotype des clones exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub>

### 2.2.1 Les clones ont des niveaux de TfR totaux semblables

Afin de vérifier si les clones générés possèdent un phénotype caractéristique, un paramètre impliqué dans le métabolisme du fer a été observé. En effet, les niveaux totaux de TfR (à la surface cellulaire et intracellulaire) ont été mesurés par Western Blot dans les clones HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> (Figure 20). Un anticorps anti-TfR a été utilisé pour détecter ces niveaux dans le lysat des cellules TOV-112D transfectées. En toute évidence, aucune différence significative n'a été observée entre les divers clones (étude de densitométrie des bandes également effectuée, données non présentées). Ceci suggère que la protéine HFE<sub>wt</sub> ne module pas les niveaux totaux de TfR dans notre modèle, bien que le contraire a été démontré dans d'autres études (voir discussion).

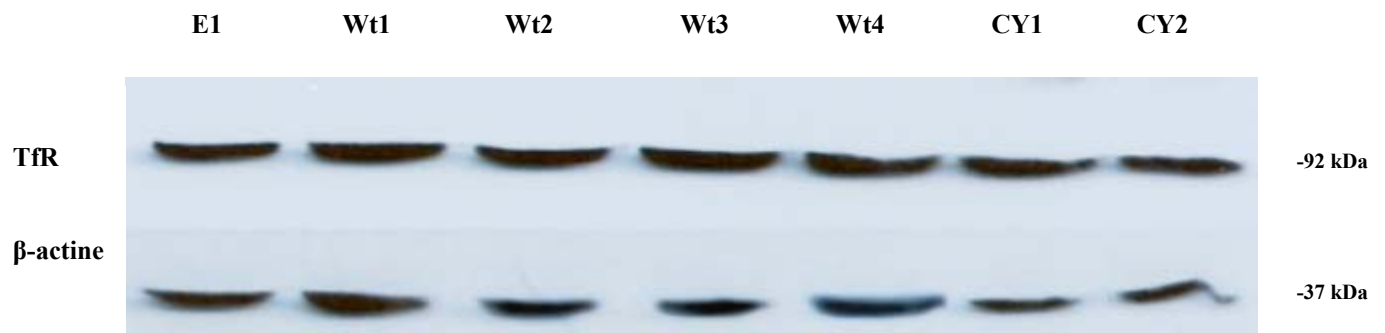


Figure 20. Western Blot de l'expression totale du TfR dans les clones TOV-112D HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> et le vecteur vide.

### **2.2.2 La protéine HFE<sub>wt</sub> augmente le nombre de TfR à la surface cellulaire**

En utilisant un anticorps anti-CD71 (anti-TfR), il a été possible de mesurer par cytométrie en flux (FACS) les niveaux de TfR à la surface cellulaire des différents clones. Il a déjà été décrit que la desferrioxamine (DFO), un agent chélateur de fer, augmente le nombre de TfR à la surface cellulaire [272]. En effet, dans un milieu pauvre en fer, la cellule augmente le nombre de TfR à sa surface de manière à capter plus de fer pour combler sa déficience. À l'opposé, le citrate d'ammonium ferrique (FAC), un sel de fer, diminue le nombre de TfR à la surface cellulaire. En effet, en donnant de grosses quantités de fer à la cellule, celle-ci n'a pas besoin de capter davantage de fer, et par conséquent il y a moins de TfR à la surface cellulaire. Ainsi, la DFO et le FAC ont été utilisés comme contrôle, sur des cellules TOV-112D non transfectées, afin de vérifier le phénotype des clones. La figure 21a montre des niveaux de TfR semblables pour le clone exprimant HFE<sub>wt</sub> et son contrôle DFO et ces derniers sont significativement plus élevés ( $p < 0.05$ ) que le clone exprimant HFE<sub>C282Y</sub>. Ceci étant dit, le clone exprimant HFE<sub>wt</sub>, agit de la même manière que les cellules exposées au DFO, suggérant un phénotype de déficience en fer. Dans la figure 21b, les niveaux de TfR des trois clones transfectés sont comparés entre eux. Cette figure montre que le clone HFE<sub>wt</sub> a des niveaux de TfR plus élevés que les clones transfectés avec le vecteur vide et HFE<sub>C282Y</sub>. Cette dernière figure, suggère qu'en restaurant la protéine HFE<sub>wt</sub> dans les cellules TOV-112D, celle-ci agit comme une cellule déficiente en fer. La figure 21c permet d'apprécier les différences entre les intensités moyennes de fluorescence (MFI), une MFI élevée suggérant un plus grand nombre de cellule exprimant le TfR. Une différence significative existe entre le clone exprimant HFE<sub>wt</sub> et les clones exprimant le vecteur vide, HFE<sub>C282Y</sub> et les cellules traitées au FAC ( $p < 0.05$ ). L'ensemble de ces résultats démontre qu'en transfectant HFE<sub>wt</sub> dans les cellules TOV-112D, il a été possible de modifier un paramètre du métabolisme du fer, suggérant un phénotype de déficience en fer.



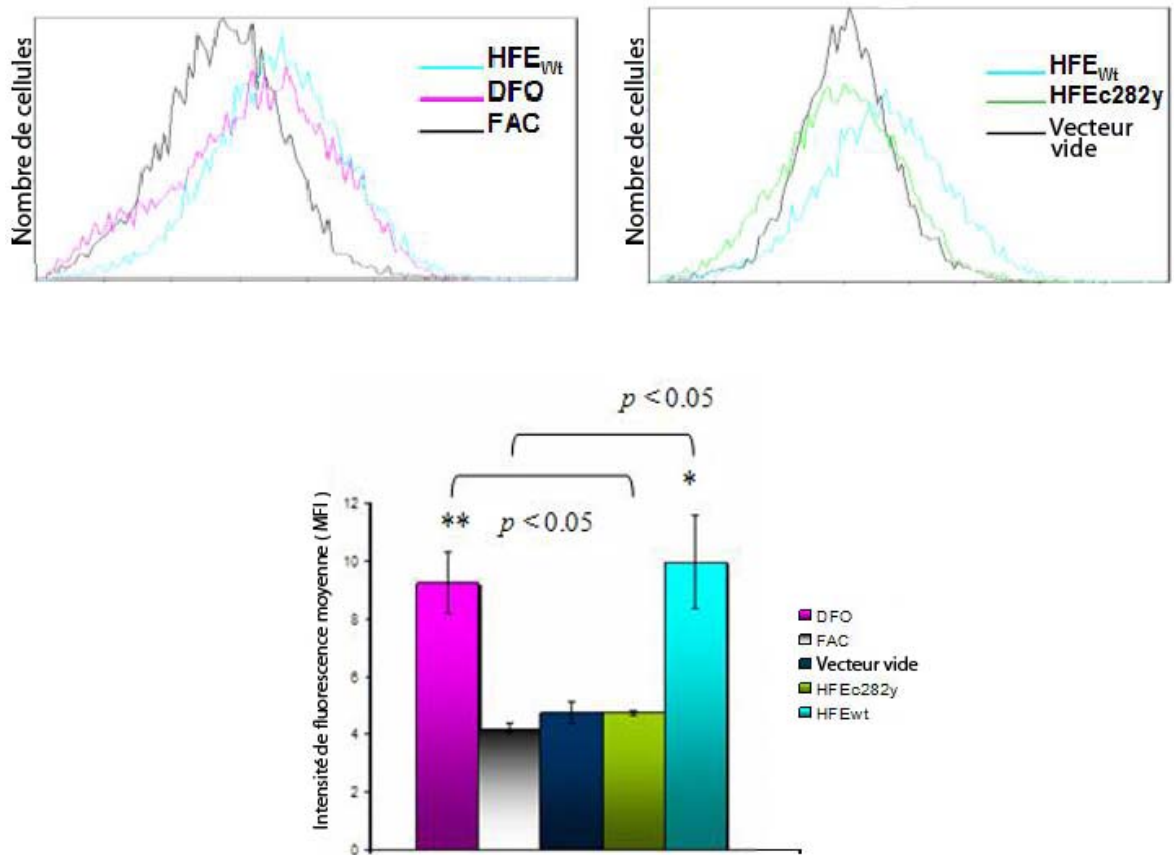


Figure 21. Analyse des niveaux de TfR à la surface cellulaire des clones par FACS. a) Comparaison entre les clones exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub>, les cellules traitées au DFO (desferrioxamine) et avec FAC (citrate d'ammonium ferrique). Les niveaux de TfR sont similaires pour le clone exprimant HFE<sub>wt</sub> et le contrôle cellules TOV-112D traitées avec DFO. Le nombre de TfR est significativement plus élevé pour le clone HFE<sub>wt</sub> comparativement aux cellules traitées avec FAC. b) Comparaison des niveaux de TfR des clones exprimant HFE<sub>wt</sub> versus les clones HFE<sub>C282Y</sub> et le vecteur vide. c) Représentation graphique de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) obtenue par FACS représentant les différents clones et les contrôles (DFO et FACS). Les résultats sont présentés comme étant la moyenne  $\pm$  SD et un test t de Student a été effectué pour analyser la significativité des comparaisons. Niveaux de TfR significativement plus élevé \* $p < 0.05$  pour le clone HFE<sub>wt</sub> ainsi que son contrôle DFO \*\*  $p < 0.05$ , comparativement au vecteur vide, HFE<sub>C282Y</sub> et au contrôle FAC. Les expériences de FACS ont été répétées trois fois pour trois clones HFE<sub>wt</sub> et deux clones HFE<sub>C282Y</sub>. Seule une expérience représentative est montrée dans cette figure.

### 2.3 HFE<sub>wt</sub> ne change pas la prolifération des cellules TOV-112D *in vitro*

Puisque les clones HFE<sub>wt</sub> semblent avoir un phénotype de déficience en fer, la prolifération *in vitro* de ces cellules a été testée. La croissance des clones stables a été observée sur une période de 5 jours dans un milieu OSE complet. Aucune différence significative n'a été observée entre les clones stables exprimant HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> et le vecteur vide ( $p > 0.05$ ) (Figure 22). Ceci suggère que restaurer HFE<sub>wt</sub> *in vitro* ne semble pas influencer la prolifération des cellules cancéreuses de l'ovaire TOV-112D.

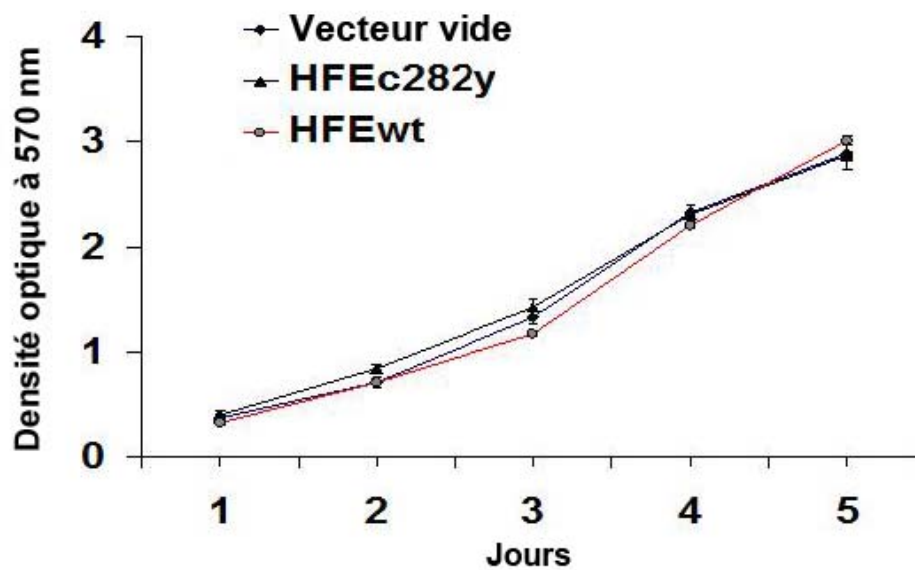


Figure 22. Prolifération *in vitro* des clones stables HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub>. Croissance des cellules TOV-112D sur une période de 5 jours mesurée par la méthode MTT. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne  $\pm$  SD, et un test t de Student a été effectué pour analyser la significativité des comparaisons. Cette expérience a été faite en triplicata et a été effectuée avec les 3 clones HFE<sub>wt</sub> et les 2 clones HFE<sub>C282Y</sub>. La densité optique reflète les taux de prolifération.

### 3. Influence du fer corporel dû aux mutations HFE

#### 3.1 Les tumeurs des souris HfeRag1<sup>-/-</sup> ont une tendance à croître plus rapidement

De manière à répondre à la seconde hypothèse, soit que le fer corporel, dû aux mutations *HFE*, influencerait la croissance tumorale, un modèle *in vivo* a été utilisé. Des souris doubles mutantes HfeRag1<sup>-/-</sup> ont été générées afin de créer un modèle murin en surcharge de fer (Figure 23). Ce modèle a été utilisé précédemment dans le laboratoire et il a été démontré que ces souris sont en surcharge de fer, notamment au niveau du foie [271].

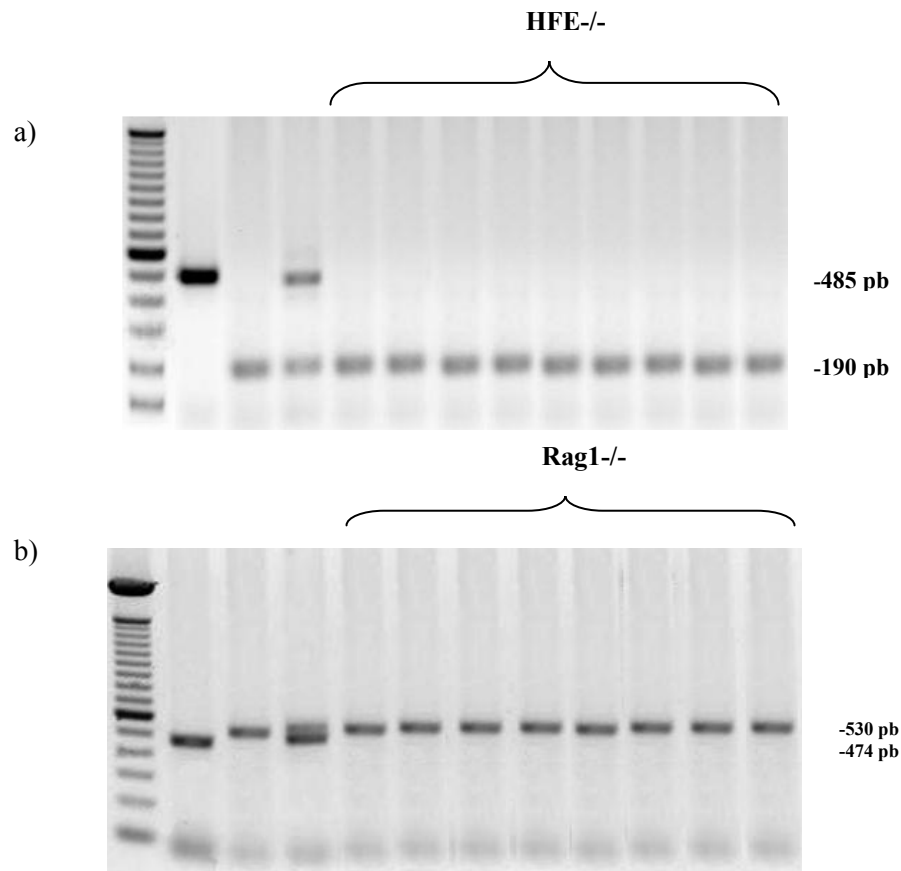


Figure 23. Génotypage des souris HfeRag1<sup>-/-</sup> générées pour les expériences *in vivo*. a) Génotypage des souris pour le gène *HFE*. Les trois premières colonnes représentent respectivement les contrôles HFE<sup>+/+</sup> (485 pb), HFE<sup>-/-</sup> (190 pb) et HFE<sup>+/-</sup> (485 pb et 190 pb). Les 9 colonnes suivantes démontrent que les souris sont homozygotes pour HFE. b) Génotypage des souris pour le gène *Rag1*. Les trois premières colonnes servant de contrôle : Rag1<sup>+/+</sup> (474 pb), Rag1<sup>-/-</sup> (530 pb) et Rag1<sup>+/-</sup> (530 pb et 474 pb). Les 9 colonnes adjacentes montrent que les souris sont déficientes pour le gène *Rag1*. Les 9 souris destinées aux expériences de croissance tumorale et comme contrôle (non illustrées) ont été génotypées HfeRag1<sup>-/-</sup>.

Une fois le modèle murin généré, la lignée TOV-21G du cancer épithélial de l'ovaire a été injectée s.c. aux souris HfeRag1<sup>-/-</sup>. La taille de la tumeur a pu être mesurée environ 12 jours après l'injection. La Figure 24 montre l'évolution de la croissance tumorale jusqu'au jour du sacrifice des souris. Au cours de l'évolution de la tumeur, des différences significatives ont été observées quant au volume de la tumeur. En effet, aux jours 36, 38 et au jour 48, au sacrifice, les volumes tumoraux étaient significativement plus élevés pour les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> ( $p = 0.03$  et  $0.05$  respectivement). Pour ce qui est des autres jours de mesure, quoique non significatif, les mesures montrent une tendance à être supérieure pour les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> ( $p$  entre  $0.06$  et  $0.1$  aux jours 40 à 46). Ceci suggère que la surcharge en fer des souris doubles mutantes aurait un rôle dans la croissance plus rapide des tumeurs chez les souris HfeRag1<sup>-/-</sup>.

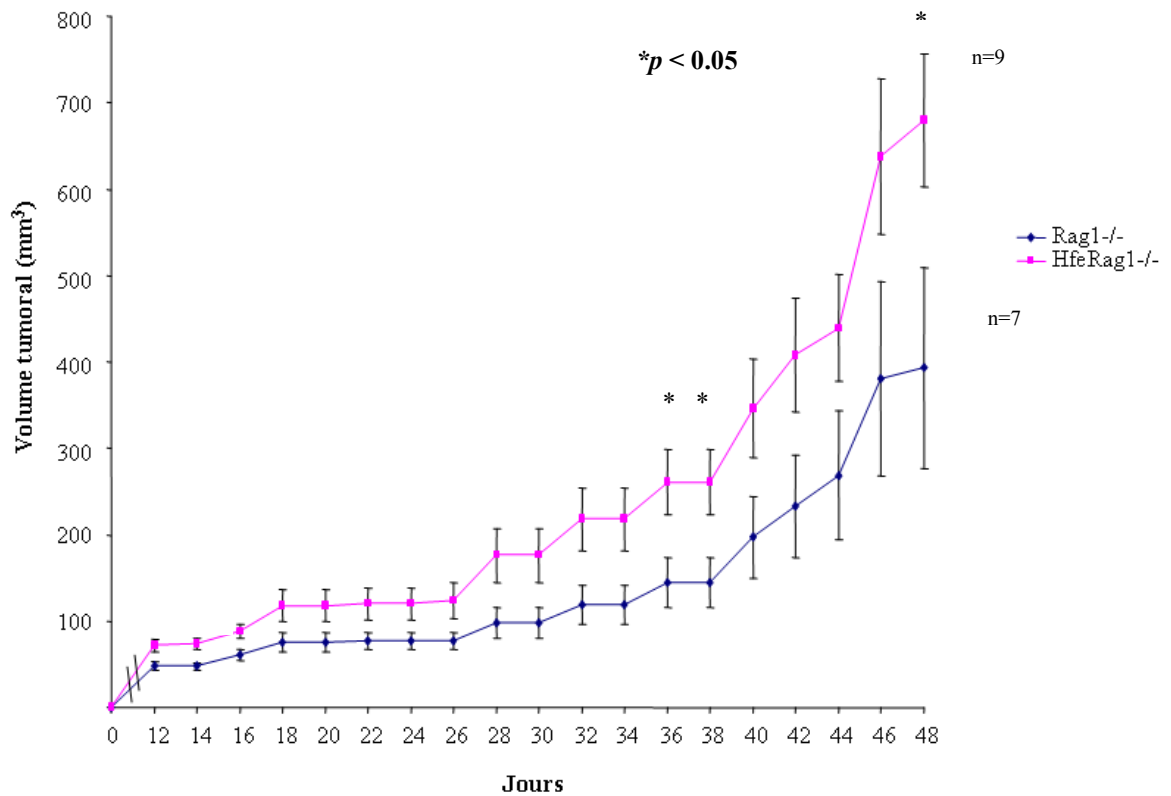


Figure 24. Croissance tumorale des souris HfeRag1<sup>-/-</sup> et Rag1<sup>-/-</sup>. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne  $\pm$  SE, et un test t de Student a été effectué pour analyser la significativité des comparaisons. Les souris ont été injectées au jour 0 et ont mis 12 jours avant de développer des tumeurs mesurables. Le jour 12 du graphique représente le premier jour de mesure. Les souris ont été sacrifiées au jour 48. Ce graphique montre une tendance à une croissance tumorale plus rapide pour les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> au jour 36, 38 et 48 (*p* < 0.05). Cette expérience préliminaire a été effectuée qu'une seule fois.

### **3.2 Les souris avec tumeur ont de faibles niveaux de fer comparativement aux souris contrôles.**

Afin d'explorer si la présence d'une tumeur affectait les paramètres du fer, les souris Rag1<sup>-/-</sup> et HfeRag1<sup>-/-</sup> ont été analysés quant au niveau de fer dans le sérum (Figure 25). Tout d'abord, il existe une différence significative entre les niveaux de fer des souris Rag1<sup>-/-</sup> et les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> avant et après l'injection des cellules cancéreuses (Avant : fer sérique de 20±2 µM versus 40±7µM,  $p = 0.00001$  ; Après : fer sérique de 14±4µM versus 27±6µM,  $p = 0.0004$ ). Cette observation vient confirmer que les souris doubles mutantes sont bien en surcharge de fer. Ensuite, une différence significative existe entre les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> porteuses de tumeur et les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> contrôles non injectées (fer sérique de 40±7µM versus 27±6µM,  $p = 0.001$ ). Également, les souris Rag1<sup>-/-</sup> contrôle comparativement aux souris Rag1<sup>-/-</sup> avec tumeur ont des niveaux de fer sérique significativement plus faibles ( $p=0.006$ ). Ceci suggère que les souris porteuses de tumeur sont en déficience de fer ou en anémie. Cette condition est caractéristique de plusieurs patients atteints de cancer.

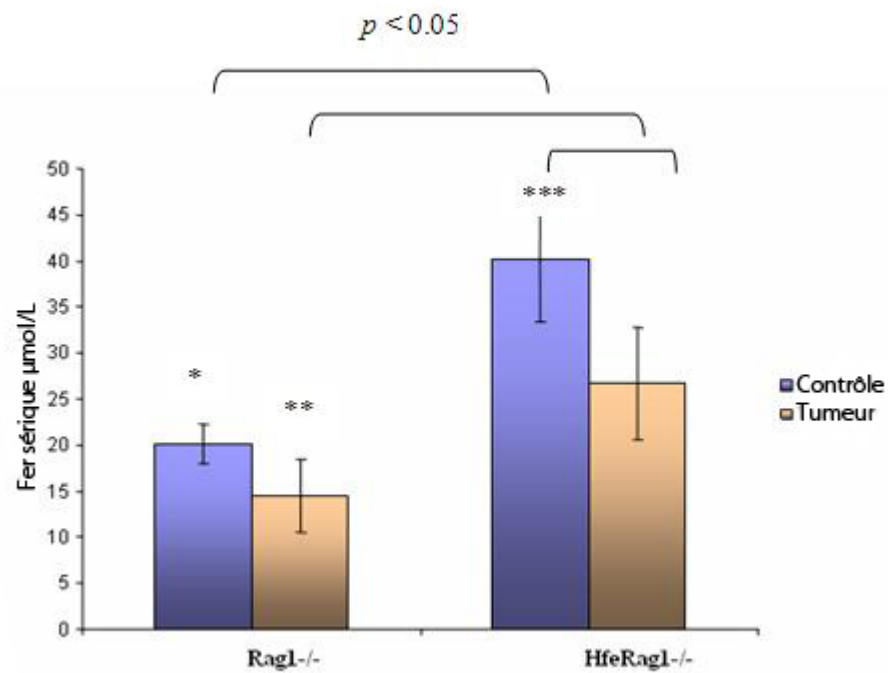


Figure 25. Niveaux du fer dans le sérum des Rag1<sup>-/-</sup> (n=7) et HfeRag1<sup>-/-</sup> (n=9). Les résultats sont présentés comme étant la moyenne  $\pm$  SD, et un test t de Student a été effectué pour analyser la significativité des comparaisons. Les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> démontrent des niveaux significativement plus élevés de fer sérique comparativement à leur contrôle Rag1<sup>-/-</sup> ( $p < 0.05^*$  et  $p < 0.05^{**}$ ). De plus, les souris avec tumeurs Rag1<sup>-/-</sup> ou HfeRag1<sup>-/-</sup> ont des niveaux de fer sérique significativement plus faibles que leur contrôle respectif ( $p < 0.05^{***}$ ).

## V. DISCUSSION



## V. DISCUSSION

Dans cette étude nous avons pu observer la prévalence des mutations *HFE* dans une population québécoise de la région de Montréal dans la province de Québec (patientes admises à l'Hôpital Notre-Dame). Grâce aux résultats du génotypage, nous avons pu comparer la fréquence allélique et génotypique des mutations *HFE* avec celles retrouvées dans la population néonatale québécoise [158] (Tableau IV). Comme il a été démontré, de par une fréquence génotypique et allélique semblable ( $p > 0.05$ ), la population à l'étude est représentative de la population québécoise quant aux mutations *HFE*. Toutefois, lorsque ces patientes sont divisées en sous groupes, selon les pathologies qu'elles ont développées, des différences significatives sont observées. En effet, nos résultats démontrent pour la première fois une fréquence allélique de la mutation C282Y plus élevée chez les patientes avec tumeur ovarienne cancéreuse (LMP+TOV= 5.9%) comparativement à la population contrôle (1.3%), suggérant que ces patientes ont un risque plus élevé de développer un EOC (Tableau V). Autre fait intéressant, la fréquence allélique des mutations C282Y est plus élevée chez les patientes avec tumeur ovarienne cancéreuse (5.9%) comparativement aux patientes avec cancer de l'endomètre (2.2%). En sachant que le EOC est responsable de plus de mortalité par année que le cancer de l'endomètre [234], et par conséquent, que le cancer de l'ovaire est sans aucun doute plus agressif, une fréquence allélique plus élevée de la mutation C282Y, chez les patientes avec EOC, suggère un lien possible entre les mutations *HFE* et l'agressivité du EOC chez ces patientes. L'ensemble de ces résultats suggèrent que des altérations du métabolisme du fer, chez les patientes avec mutations C282Y, pourraient promouvoir le développement de l'EOC et également augmenter l'agressivité de cette maladie. En effet, il est important de mentionner que la prévalence de la mutation C282Y est non négligeable dans la population québécoise (Tableau IV prévalence :  $76/881 = 8.6\%$ ) et que celle-ci peut être la cause d'importantes altérations du métabolisme du fer [273, 274]. Dans ce sens, l'effet procarcinogène pouvant être associé aux mutations C282Y pourrait considérablement influencer le risque ou le pronostic d'un cancer.

De plus, il serait également intéressant de noter que selon le Tableau II, la grande majorité des patientes avec LMP ou TOV se retrouvent dans une tranche d'âge où elles sont fort

probablement ménopausées (environ 80% des patientes avec TOV ont au-dessus de 50 ans). Ainsi, bien qu'il faudrait effectuer une étude plus détaillée analysant les différentes tranches d'âge et la présence des mutations *HFE*, nous pouvons presque affirmer que les patientes, chez lesquelles une fréquence allélique des mutations C282Y élevées a été observé, sont probablement ménopausées. Ceci étant dit, un lien fort intéressant peut être noté puisque chez les femmes ménopausées l'arrêt des menstruations met fin à la perte de quantités importantes de fer et par conséquent, l'accumulation de fer peut être davantage prononcée chez celles-ci. Également, il a été reporté que les cancers estrogènes-dépendants, tel que le cancer du sein ou le EOC, sont associés à un stress oxydatif endogène important produit par des métabolites de l'estrogène de tissus cibles [275, 276]. Par conséquent, des accumulations de fer liées aux mutations *HFE* pourraient aggraver ce stress oxydatif chez ces patientes. À ce jour, notre étude est la première à démontrer une association entre la fréquence allélique des mutations C282Y et le EOC. Toutefois, une étude a démontré une prévalence élevée de la mutation C282Y dans un autre cancer estrogène-dépendant soit le cancer du sein [277].

En plus de démontrer qu'il existe une association entre une fréquence allélique élevée des mutations C282Y et le EOC, notre étude a démontré que ces patientes ont un pronostique plus faible. En effet, les résultats de survie démontrent clairement que les patientes avec mutations C282Y ont un pronostique plus faible que les patientes sans mutations et ce, peu importe le grade de la tumeur (G0-G3). Les patientes avec mutations C282Y et tumeur de G3 ont un taux de survie d'environ 20%, après 2 ans, comparativement à 60% pour les patientes sans mutations. De plus, selon l'analyse de Cox, le décès de ces patientes ne semble pas être dû à l'âge de celles-ci puisque la mutation semble être un marqueur significativement plus important. En ajout, cette analyse a également démontrée que la mutation C282Y est un marqueur plus fort que le grade de la tumeur et l'âge des patientes (Facteur de puissance de 10.11, 0.141 et 0.627 respectivement). La présente étude est la première a démontrée un lien entre la présence de mutation C282Y et une survie significativement faible chez les patientes avec tumeur ovarienne. Une étude a réussi à montrer que des niveaux élevés de fer augmentaient le risque d'avoir un cancer chez les femmes et les hommes [278]. De plus, une étude au Denmark a démontré qu'il y avait une diminution de la fréquence des hétérozygotes pour la mutation C282Y avec l'âge,

suggérant que les porteurs de cette mutation ont un taux de survie plus faible [279]. Ces deux dernières études ne favorisent aucunement une survie élevée chez les patientes avec mutations C282Y renforçant davantage la présente étude, qui démontre pour la première fois un lien possible entre une faible survie et la présence de mutations C282Y chez les patientes avec EOC.

Un autre fait intéressant de notre étude est la relation qui existe entre le grade de la tumeur et les différents paramètres du fer. En effet, les patientes avec grade avancé du cancer de l'ovaire ont des niveaux significativement faibles de fer dans le sérum et significativement élevés de ferritine. Ces symptômes concordent avec ceux retrouvés dans l'anémie des maladies chroniques (ACD) ou l'anémie causée par un cancer. En effet, cette anémie est caractérisée par des hauts niveaux de ferritine dans le sérum et de faibles niveaux de fer dans le sérum [280]. Une étude comparant 95 patientes saines à 91 patientes avec EOC a réussi à démontrer des niveaux de fer du sérum significativement bas (93.4 µg/dL versus 49.3 µg/dL,  $p < 0.001$ ) et des niveaux de ferritine dans le sérum significativement hauts (56 ng/mL versus 320.4 ng/mL,  $p < 0.001$ ) chez les patientes avec EOC de stade III et IV, comparativement aux patientes de stade I et II et à des patientes saines [281]. En bref, l'ACD lié au cancer est le résultat de l'activation de systèmes immuns et inflammatoires menant à la libération excessive de plusieurs cytokines. À son tour, cette surproduction de cytokines cause des anomalies du métabolisme du fer et empêche une utilisation adéquate du fer [282]. Par exemple, l'IFN- $\gamma$ , qui est surproduit, stimule la transcription de la ferritine et augmente la captation du fer par les cellules en stimulant l'expression du transporteur de fer DMT-1, et diminue la sortie du fer en inhibant la ferroportine [283]. Par conséquent, ces événements ont pour effet d'accumuler le fer à l'intérieur de la cellule, en grande partie dans les macrophages, et de diminuer les niveaux de fer dans le sérum. Nous pourrions supposer que la baisse des niveaux de fer dans le sérum, en présence d'une malignité, est due au fait que les cellules tumorales utilisent (stock) le fer pour leur croissance et que par conséquent, les niveaux de fer circulant diminuent. Ceci expliquerait les niveaux élevés de ferritine dans le sérum retrouvés chez les patientes avec EOC de grade avancé.

Plusieurs autres études sont parvenues à démontrer que les niveaux de ferritine sont élevés chez les patientes avec EOC, dont un groupe qui a observé une hyperferritinémie chez 94%

des cas avec cancer de l'ovaire et démontrant que le cancer de l'ovaire et le cancer de l'utérus sont les malignités montrant les plus hauts niveaux de ferritine [284, 285]. De plus, une étude a également réussi à établir un lien entre les niveaux de ferritine des patientes avec EOC et le stade de la maladie [266]. Aussi, des études ont tentées d'utiliser la ferritine comme marqueur tumoral en combinaison avec d'autres marqueurs tels que tels que le TPA (tissue polypeptide antigen) et le CA-125 (cancer antigen 125) [286, 287]. Ces études ont trouvées que les niveaux de ces marqueurs étaient élevés dans les stades avancés de la maladie. Suite à ces résultats, il est à se demander quel est le rôle biologique joué par la ferritine dans les cellules tumorales. En fait ce rôle n'est pas encore complètement compris, bien que différentes études suggèrent que la ferritine intracellulaire est un marqueur fiable de la prolifération cellulaire [288]. Ainsi, maintes études ont confirmées l'expression de la ferritine dans le EOC et ont trouvées une haute corrélation entre une concentration élevée de la ferritine et des niveaux élevés de prolifération (correspondant à des stades avancés de la maladie). Par conséquent, des hauts niveaux de ferritine sont liés à un faible pronostic. Dans ce même ordre d'idées, un groupe a réussi à montrer, par Northern Blot, des niveaux d'ARNm de la ferritine significativement plus élevés dans des échantillons de tumeurs métastatiques du EOC comparativement aux échantillons avec tumeur primaire de l'ovaire [289]. Collectivement, ces résultats suggèrent que la ferritine devrait être utilisée comme marqueur tumoral, seul ou en combinaison avec d'autres marqueurs, de manière à évaluer le stade de la maladie (agressivité) et également pour permettre d'effectuer un diagnostic précoce chez les patientes à haut risque de développer un EOC.

Les résultats obtenus grâce aux données cliniques, ont soulevés les questions suivantes quant au rôle des mutations C282Y dans le EOC : pourquoi les patientes avec une fréquence élevée de l'allèle Y ont un risque plus élevées de développer un cancer de l'ovaire ? Pourquoi ces patientes ont-elles un pronostic plus faible ? Pourquoi ces patientes ont des niveaux faibles de fer dans le sérum et des niveaux élevés de ferritine ? Nous avons retenus deux hypothèses intéressantes, soit que le fer en excès permet une croissance plus rapide des cellules cancéreuses ou encore que le fer corporel, dû aux mutations *HFE* influence la croissance tumorale. Pour vérifier notre première hypothèse, nous avons générés des lignées stables du EOC qui étaient initialement déficientes pour la protéine HFE (homozygote pour la mutation C282Y) et nous avons tentés de restaurer sa

fonction en transfectant avec le vecteur HFE<sub>wt</sub>. Nous avons choisi la lignée TOV-112D car elle était homozygote pour la mutation C282Y (protéine HFE non fonctionnelle) et par conséquent, elle s'avérait un modèle intéressant pour étudier l'effet de la restauration de la protéine HFE<sub>wt</sub>. La Figure 17 ainsi que la Figure 18 démontrent que les clones sélectionnés pour les études *in vitro* et *in vivo* subséquentes expriment bien la protéine HFE<sub>wt</sub> et la protéine HFE<sub>C282Y</sub>. En effet, l'équipe de Dr. Kostas Pantopoulos [269] avait décrit le profil d'expression attendu sur Western Blot pour les protéines HFE<sub>wt</sub> et la protéine HFE<sub>C282Y</sub>. Après avoir générées les lignées stables TOV-112D, nous avons tentés de confirmer si nous avions bel et bien réussi à modifier des paramètres de métabolisme du fer suite à l'expression de la protéine HFE<sub>wt</sub>. Pour ce faire, nous avons évalués les niveaux de TfR totaux par Western Blot et ceux-ci sont demeurés inchangés. Cependant, les niveaux de TfR à la surface cellulaire ont montré des résultats intéressants. En effet, les clones HFE<sub>wt</sub> générés ont montré un nombre significativement plus élevé de TfR à leur surface, suggérant un phénotype de déficience en fer. Dans la Figure 21, on peut observer que le clone transfecté avec la protéine HFE<sub>wt</sub> agit de la même manière que les cellules TOV-112D traitées avec DFO et non comme les cellules traitées avec FAC. Il est à noter que la DFO est un chélateur de fer et qu'elle engendre un phénotype de déficience en fer (augmente le nombre de TfR et diminue les niveaux de ferritine) [221,290]. Le FAC quant à lui, est un donneur de fer aux cellules et il a été démontré qu'il diminuait l'expression du TfR [291]. Nos résultats suggèrent donc que les clones TOV-112D transfectés avec la protéine HFE<sub>wt</sub> ont un phénotype de déficience de fer. L'effet de la protéine Wt et mutante de HFE a été évalué précédemment, dans des cellules de cancer du poumon humain H1299 muni d'un système tet-off, où l'expression de la protéine a été induite par le retrait de la tétracycline dans le milieu des clones stables [269]. Les cellulesensemencées durant 4 jours sans tétracycline ont montrées, par Western Blot, des niveaux de TfR plus élevés pour la protéine HFE<sub>wt</sub> comparativement à la protéine HFE<sub>C282Y</sub>. Lee et al. ont réussi à faire exprimer la protéine HFE<sub>wt</sub> et la protéine HFE<sub>C282Y</sub> dans une lignée neuronale humaine déficiente pour la protéine HFE endogène [292]. Cette étude a également démontré que les cellules transfectées avec la protéine mutée C282Y ont 96% moins d'expression de TfR comparativement aux cellules HFE<sub>wt</sub> et celles transfectées avec le contrôle vecteur vide. Corsi et al. ont démontrés qu'une surexpression de la protéine HFE<sub>wt</sub> dans une lignée cellulaire HeLa se traduit par une augmentation de 3 à 4 fois dans les niveaux d'expression

du TfR [293]. Également, le groupe Chitambar et al. ont montrés que les niveaux de TfR à la surface de cellules lymphoïdes étaient 2 à 3 fois plus élevés dans des cellules de patients génotypés Wt pour la protéine HFE comparativement aux cellules ayant la mutation C282Y [294]. Ainsi, collectivement les résultats obtenus par d'autres groupes semblent concorder avec nos résultats, des niveaux de TfR à la surface cellulaire (Figure 21), et suggèrent que la protéine HFE<sub>wt</sub> engendre un phénotype de déficience de fer pour les cellules TOV-112D. Il faut spécifier que nos résultats de niveaux de TfR totaux (Figure 20) ne semblent toutefois pas correspondre aux résultats obtenus par les autres groupes. Bien que ce soit les mêmes clones qui ont été analysés pour les études analysant les niveaux de TfR totaux et à la surface cellulaire, des différences significatives ont seulement été trouvées en terme de TfR à la surface de la cellule. Il se peut que les différences soient plus notables, dans notre cas, lorsque nous analysons seulement le nombre de TfR à la surface et que les différences soient apparentes en situation de déficience de fer.

Plusieurs études nous laissent croire que la protéine HFE mutée pour C282Y engendre des niveaux de fer supérieur. Effectivement, Chitambar et al, [294] ont utilisés le fer marqué (<sup>59</sup>Fe, isotope radioactif) afin de mesurer la captation du fer dans des cellules lymphoïdes mutées pour C282Y. Leurs résultats ont montrés que les cellules homozygotes pour C282Y avaient une captation du fer supérieure à celle des cellules Wt et que les cellules C282Y internalisaient un nombre supérieur de TfR lié à la Tf ( $p < 0.001$ ). Des résultats similaires ont été trouvés dans des cellules TrVb (cellules déficientes en TfR endogène) où des cellules transfectées avec le TfR et la protéine HFE<sub>wt</sub> ont montrées un faible taux de captation du Fe<sup>2+</sup>[295]. En parallèle, une équipe a également démontrée que la captation du fer et les niveaux de ferritine, en présence de FAC, étaient significativement plus élevés, dans des cellules embryonniques de rein humain HEK-293 transfectées avec la protéine mutée pour C282Y, comparativement aux cellules HFE<sub>wt</sub> [296]. De plus, les études avec les cellules neuronales utilisant la calcéine, une protéine fluorescente qui chélate le fer, ont montrées des niveaux de LIP supérieurs pour les cellules transfectées avec C282Y comparativement aux cellules Wt (0.2 vs 45.7 fluorescence/ $\mu$ g de protéine) [292]. Par conséquent, il serait prévisible que des cellules exprimant la forme mutée HFE<sub>C282Y</sub> aient une captation du fer supérieure.

En supposant que les cellules TOV-112D transfectées avec HFE<sub>C282Y</sub> ont des niveaux de fer supérieurs et en sachant que le fer est nécessaire à la croissance cellulaire, nous avons décidé de tester notre première hypothèse, soit que de hautes concentrations de fer favoriseraient la prolifération rapide des cellules cancéreuses dans le EOC. Pour ce faire, nous avons décidé de comparer la prolifération des cellules exprimant la protéine mutée versus celles des cellules exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub> par la méthode MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium). Nos résultats n'ont démontrés aucune différence significative quant à la prolifération des cellules HFE<sub>wt</sub> versus les cellules HFE<sub>C282Y</sub> ou les cellules contrôles transfectées avec le vecteur vide ( $p > 0.05$ ). Ces résultats suggèrent que l'expression de la protéine HFE<sub>wt</sub> n'a pas d'effet sur la prolifération *in vitro* des cellules TOV-112D. L'absence de différence en terme de prolifération *in vitro* pourrait être dû au fait que nous ayons utilisés un milieu enrichi de FBS à 10%. En effet, le sérum contient de grande quantité de Tf et des différences de prolifération, même si elles seraient minimales, pourraient ne pas avoir été notables dans un tel milieu. Afin d'investiguer davantage cette caractéristique, il serait intéressant d'observer la prolifération des cellules HFE<sub>wt</sub> versus les cellules HFE<sub>C282Y</sub> dans des milieux moins riches en Tf (FBS 5%, 1% ou en absence de sérum). À notre connaissance, aucune étude à ce jour n'a tenté d'étudier l'effet de l'expression des protéines HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> sur la prolifération cellulaire. Des études *in vitro* supplémentaires ainsi que des études *in vivo* sont nécessaires afin d'évaluer l'effet de la restauration de la protéine HFE<sub>wt</sub> sur la croissance des cellules (voir section Perspectives et Conclusion à la page 93). Ainsi, bien que nos études *in vitro* de prolifération n'ont rien révélées, il est fort possible que l'injection de ces cellules dans un modèle *in vivo*, dans lequel on retrouve des niveaux physiologiques de fer, permettrait d'observer un changement en terme de croissance des cellules cancéreuses. Un groupe a démontré que des études *in vitro* n'ont révélées aucune différence quant à la croissance de cellules cancéreuses dans un milieu enrichi de fer, alors qu'*in vivo*, les souris sous diète de fer ont montrées des différences significatives en termes de croissance tumorale [297].

Quoiqu'il en soit, nombreuses sont les études qui ont démontrées qu'il existait un lien entre les niveaux de fer et la prolifération des cellules néoplasiques. Par exemple, en utilisant un modèle de lymphome à cellules B, une équipe a prouvée qu'une inhibition du TfR diminue significativement la prolifération cellulaire et résulte en un arrêt de la phase G1 du cycle

cellulaire [298]. De plus, une équipe a démontré, *in vitro*, l'inhibition de la croissance d'une tumeur hématologique suite à l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-TfR [299]. En ajout, une équipe a montré que dans une lignée stable de mélanome humain réprimant l'expression de la ferritine, la prolifération des cellules *in vitro* et *in vivo* était significativement diminuée [300]. De plus, en ce qui attrait plus spécifiquement au cancer de l'ovaire, une étude a démontré l'effet des chélateurs du fer DFO et DPTA (diéthylentriamine pentaacetic acid) dans une lignée de cancer de l'ovaire humaine CaOV-3 et de rat NUTU-19 [301]. Les résultats de prolifération ont révélés que la DFO réussit à inhiber la prolifération de la lignée CaOV-3 et NUTU-19, alors que la DPTA inhibe les cellules NUTU-19. De plus l'arrêt de la synthèse d'ADN, par la DFO et le DPTA, a été démontré pour les 2 lignées cellulaires de l'ovaire. En bref, les résultats de Brard et al. montrent que les chélateurs de fer engendrent un arrêt de croissance cellulaire, dans un modèle de cancer de l'ovaire, en inhibant la prolifération et en causant l'apoptose.

Afin de vérifier notre seconde hypothèse, soit de vérifier si les niveaux de fer corporel, contrairement aux mutations dans les cellules cancéreuses, influenceraient la croissance d'une lignée cellulaire du cancer de l'ovaire, nous avons tout d'abord générés un modèle de souris double mutantes HfeRag1<sup>-/-</sup> (n=9). Ce modèle a été décrit précédemment dans notre laboratoire [271]. En effet, ces souris démontrent une surcharge de fer importante, notamment au niveau du foie. Par conséquent, celui-ci était un modèle intéressant pour étudier l'effet du fer corporel sur la croissance tumorale. Afin d'effectuer les expériences *in vivo* nous avons optés pour la lignée cellulaire TOV-21G génotypée Wt pour la mutation C282Y. Suite à l'injection des cellules TOV-21G dans le modèle murin HfeRag1<sup>-/-</sup>, nous avons mesurés les paramètres nécessaires au calcul du volume tumoral (longueur, largeur et hauteur de la tumeur). Une fois les données récoltées, nous avons observés des différences significatives en terme de volume tumoral aux jours 36, 38 et au moment du sacrifice au jour 48 ( $p = 0.03$  et  $0.05$  respectivement). De plus, bien qu'elles n'ont pas atteintes la significativité, les valeurs obtenues en terme de volume au courant des autres jours, montrent une tendance à être supérieure ( $p$  entre  $0.06$  et  $0.1$  aux jours 40 à 46) pour les souris HfeRag1<sup>-/-</sup> comparativement aux souris contrôles Rag1<sup>-/-</sup>. Les données obtenues par cette expérience, effectuée qu'une seule fois, sont préliminaires, toutefois ils suggèrent que la surcharge en fer chez ces souris double mutantes aurait un rôle dans la croissance plus



rapide des tumeurs. Il est évident que celles-ci doivent être répétées afin de confirmer ces observations. Également, comme observé dans la Figure 25, les niveaux de fer du sérum étaient significativement plus faibles chez les souris avec tumeur (Rag1<sup>-/-</sup> ou HfeRag1<sup>-/-</sup>). Il serait nécessaire de mesurer les paramètres érythroïdes de ces souris afin de confirmer que celles-ci sont anémiques.

À ce jour, notre laboratoire est le seul à avoir adopté un modèle murin unique, HfeRag1<sup>-/-</sup>, pour étudier l'influence du fer corporel sur la croissance tumorale. Toutefois, d'autres modèles murins ont été utilisés pour évaluer l'influence du fer corporel sur la croissance tumorale. En effet, le groupe de Bergeron et al, ont provoqués une surcharge de fer chez des souris en injectant du fer de manière i.p. (24mg/kg/poids ou 250 mg/kg/poids) et ont observés un nombre de cellules cancéreuses significativement plus élevé chez les souris prétraitées avec du fer [297]. Le taux de croissance tumorale était plus rapide chez les souris appartenant au groupe traité avec fer versus le groupe contrôle ( $p < 0.05$ ). Une seconde étude a démontré que l'injection de cellules CA07-A (adénocarcinome du colon), HE129 (cancer du foie) ou M119 (adénocarcinome du sein), chez des souris immuno-déficientes auxquelles on a administrée une diète déficiente en fer (5mg/kg/poids), engendrait une croissance tumorale significativement plus faible chez le groupe avec déficience en fer comparativement au groupe traité avec diète normale [302]. De plus, l'équipe de Nie et al, ont réussi à démontrer qu'en injectant des cellules du cancer du poumon surexprimant la ferritine mitochondriale (MtFt) chez des souris immuo-déficientes Balb/c, la croissance tumorale était significativement diminué comparativement au groupe contrôle [303]. Les cellules surexprimant la MtFt ont montrées un phénotype de déficience en fer caractérisé par une augmentation du nombre de TfR et une diminution de la ferritine du cytosol (augmentation de l'interaction IRP/IRE). Cette étude a démontré que de hauts niveaux de MtFt peuvent dramatiquement affecter l'homéostasie du fer en redirigeant le fer vers la mitochondrie. Ces résultats suggèrent que la privation de fer dans le cytosol soit la cause de l'inhibiton significative de croissance tumorale.

## **VI. PERSPECTIVES ET CONCLUSION**

## VI. PERSPECTIVES ET CONCLUSION

En ce qui attrait aux résultats démontrant une faible survie des patientes avec EOC et mutations C282Y, il serait possible de vérifier s'il y aurait eu une perte de l'hétérozygotie dans les échantillons de tumeur de ces patientes. En effet, nous pourrions alors différencier si les mutations germinales diffèrent des mutations somatiques chez ces patientes. Ainsi, par perte d'hétérozygotie, ces patientes pourraient être homozygote pour la mutation C282Y et par conséquent, avoir des niveaux de fer corporels encore plus important, expliquant possiblement leur faible taux de survie. De plus, il serait intéressant d'aller mesurer les quantités de fer dans les tumeurs des patientes avec EOC par la méthode d'absorption atomique. De cette manière, nous pourrions comparer les quantités de fer chez les patientes de G0 comparativement aux patientes de G3.

Également, en plus d'avoir évalué les niveaux de fer du sérum, de la saturation de la Tf, de la Tf et de la ferritine dans le sang des patientes avec EOC, il serait intéressant de mesurer les niveaux de lipocaline 2. En effet, la lipocaline 2 est une protéine liant le fer et récemment, il a été observé que la lipocaline 2 est surexprimée dans les cellules métastatiques du cancer du sein [304]. Dans notre cas, nous pourrions supposer que la lipocaline 2 soit surexprimée chez les patientes avec EOC de grade avancé.

De plus, bien que nos études par FACS suggèrent que les clones TOV-112D, exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub>, ont un phénotype de déficience en fer, des études supplémentaires seraient nécessaires de manière à confirmer ces résultats. Parmi celles-ci, nous pourrions évaluer les niveaux de fer du LIP avec la calcéine, un marqueur sensible au fer, des cellules exprimant la protéine HFE<sub>wt</sub> ou mutées pour C282Y. Nous pourrions également, par Western Blot ou ELISA, évaluer les niveaux de ferritine de ces cellules. Ainsi, les données obtenues, par des études phénotypiques supplémentaires, viendraient renforcer nos résultats sur l'étude du nombre de TfR à la surface cellulaire de ces cellules. Nous pourrions également questionner notre système d'expression, celui-ci pouvant empêcher une expression stable de la protéine HFE. Par conséquent, nous pourrions envisager d'utiliser un système tet-off de manière à s'assurer d'obtenir des niveaux stables d'expression. En

effet, ce système a été adopté par le groupe de Wang et al, pour transférer les vecteurs HFE<sub>wt</sub>, HFE<sub>C282Y</sub> et HFE<sub>H63D</sub> dans les cellules du cancer du poumon H1299 [269].

Pour ce qui est des études *in vitro*, des expériences supplémentaires pourraient être effectuées pour comparer le pouvoir métastatique des cellules HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub>. Pour ce faire, des tests évaluant la croissance indépendante de l'ancrage des cellules pourraient être effectués. Le groupe de Tripathi et al, a démontré que les tumeurs métastatiques du cancer de l'ovaire exprimaient de grandes quantités de ferritine comparativement aux tumeurs primaires [289]. Dans ce sens, nous pourrions tester, dans notre modèle, si des niveaux élevés de fer, engendrés par la mutation C282Y, pourraient influencer le pouvoir métastatique des cellules.

De plus, nous pourrions vérifier une hypothèse supplémentaire, soit que l'excès de fer engendré par les mutations C282Y du gène *HFE* pourrait être responsable d'une résistance aux traitements de chimiothérapie. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions traiter les cellules HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> avec différents traitements utilisés contre le EOC, notamment par Taxol ou Cisplatine et vérifier si les cellules HFE<sub>C282Y</sub> montrent une résistance à ces agents. Aussi, nous pourrions tester la croissance de ces cellules dans un milieu traité avec un chélateur de fer (DFO) ou encore dans un milieu déficient en fer (soit diminuer les niveaux de sérum à 1% ou encore utiliser un milieu spécifiquement déficient en fer) et observer leur comportement. En effet, comme il a été mentionné précédemment, le sérum 10% est riche en Tf, et il serait sans doute nécessaire de limiter les quantités de fer dans le milieu de croissance (en diminuant à du sérum 1% par exemple) afin de pouvoir observer des différences en terme de prolifération cellulaire.

*In vivo*, les cellules TOV-112D exprimant HFE<sub>wt</sub> et HFE<sub>C282Y</sub> pourraient être injectées à des souris immuno-déficientes (SCID ou Rag1<sup>-/-</sup>) de manière à observer la croissance tumorale. La résistance aux traitements pourrait également être testée *in vivo* par Taxol, Cisplatine ou encore DFO. Également, il serait intéressant de répéter l'expérience *in vivo* chez les souris HfeRag1<sup>-/-</sup>, afin d'évaluer si les taux de fer corporel influence vraiment la croissance tumorale.

Autre fait intéressant, des études par le groupe de De Souza et al, ont démontrées que la mutation C282Y du gène *HFE* nuirait à la stabilité des CMH-1 (complexe majeur d'histocompatibilité) et ne permettrait pas leur expression à la surface cellulaire [305]. Par conséquent, les cellules affectées par cette mutation (par exemple les cellules tumorales) pourraient empêcher la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules T cytotoxiques responsables de leur destruction. Ces faits pourraient également s'appliquer à notre étude, et servir d'hypothèse supplémentaire pouvant expliquer notamment la survie diminuée des patientes avec EOC et mutations C282Y. Des études visant à comprendre davantage ce processus sont présentement en cours dans notre laboratoire. Parmi ces études, des cellules de mélanome sont transfectées avec les vecteurs *HFE*<sub>wt</sub> et *HFE*<sub>C282Y</sub>, mis en co-culture avec des lymphocytes T, pour ensuite mesurer les niveaux de reconnaissance en quantifiant l'INF- $\gamma$  dans le surnageant par ELISA.

En conclusion, nos résultats ont permis d'observer que les patientes avec tumeur ovarienne possédaient une fréquence allélique significativement plus élevée des mutations C282Y comparativement au groupe contrôle. De plus, les patientes avec mutations C282Y et EOC ont démontrées une survie moindre. En ajout, les niveaux de ferritine se sont avérés significativement plus élevés chez les patientes avec grade avancé du EOC. Collectivement, ces résultats suggèrent que la ferritine semble être un bon marqueur tumoral pour évaluer le grade de la tumeur. De plus, une étude préliminaire dans un modèle de souris en surcharge de fer, *HfeRag1*<sup>-/-</sup>, a permis d'observer une tendance à une croissance tumorale plus rapide, suggérant que le fer corporel influencerait la prolifération des cellules cancéreuses. Des études *in vitro* et *in vivo* supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre davantage le rôle des mutations C282Y dans le EOC. Notamment, des études pour tester si l'excès de fer serait responsable d'une résistance au traitement que les patientes reçoivent ou encore que le fer en excès engendre une toxicité.

## VII. RÉFÉRENCES

## VII. RÉFÉRENCES

1. Papanikolaou, G. and K. Pantopoulos, *Iron metabolism and toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **202**(2): p. 199-211.
2. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(2): p. 289-309.
3. Ponka, P., *Cellular iron metabolism*. Kidney Int Suppl, 1999. **69**: p. S2-11.
4. Furuyama, K., K. Kaneko, and P.D.t. Vargas, *Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis*. Tohoku J Exp Med, 2007. **213**(1): p. 1-16.
5. Galaris, D. and K. Pantopoulos, *Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2008. **45**(1): p. 1-23.
6. Beinert, H., R.H. Holm, and E. Munck, *Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures*. Science, 1997. **277**(5326): p. 653-9.
7. Brzoska, K., S. Meczynska, and M. Kruszewski, *Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond*. Acta Biochim Pol, 2006. **53**(4): p. 685-91.
8. Lill, R. and U. Muhlenhoff, *Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 457-86.
9. Johnson, D.C., et al., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 247-81.
10. Darnell, G. and D.R. Richardson, *The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents III: the effect of the ligands on molecular targets involved in proliferation*. Blood, 1999. **94**(2): p. 781-92.
11. Gao, J., D. Lovejoy, and D.R. Richardson, *Effect of iron chelators with potent anti-proliferative activity on the expression of molecules involved in cell cycle progression and growth*. Redox Rep, 1999. **4**(6): p. 311-2.
12. Li, H. and Z.M. Qian, *Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery*. Med Res Rev, 2002. **22**(3): p. 225-50.
13. Beutler, E., et al., *Molecular characterization of a case of atransferrinemia*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4071-4.
14. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(10): p. 940-59.

15. van Campenhout, A., et al., *Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus*. Free Radic Res, 2003. **37**(10): p. 1069-77.
16. Hayashi, A., et al., *Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology*. Am J Hum Genet, 1993. **53**(1): p. 201-13.
17. 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.
18. Aisen, P. and I. Listowsky, *Iron transport and storage proteins*. Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 357-93.
19. Masson, P.L., J.F. Heremans, and E. Schonke, *Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes*. J Exp Med, 1969. **130**(3): p. 643-58.
20. Lonnerdal, B. and S. Iyer, *Lactoferrin: molecular structure and biological function*. Annu Rev Nutr, 1995. **15**: p. 93-110.
21. Baker, H.M., B.F. Anderson, and E.N. Baker, *Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3579-83.
22. Brock, J.H., *Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant*. Arch Dis Child, 1980. **55**(6): p. 417-21.
23. Sanchez, L., M. Calvo, and J.H. Brock, *Biological role of lactoferrin*. Arch Dis Child, 1992. **67**(5): p. 657-61.
24. Levay, P.F. and M. Viljoen, *Lactoferrin: a general review*. Haematologica, 1995. **80**(3): p. 252-67.
25. Caccavo, D., et al., *Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application*. J Endotoxin Res, 2002. **8**(6): p. 403-17.
26. Orsi, N., *The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives*. Biometals, 2004. **17**(3): p. 189-96.
27. Ganz, T., *Molecular control of iron transport*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(2): p. 394-400.
28. Harrison, P.M. and P. Arosio, *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
29. Theil, E.C., *Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 289-315.



30. Liu, X. and E.C. Theil, *Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry*. *Acc Chem Res*, 2005. **38**(3): p. 167-75.
31. Chasteen, N.D. and P.M. Harrison, *Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage*. *J Struct Biol*, 1999. **126**(3): p. 182-94.
32. Britton, R.S., K.L. Leicester, and B.R. Bacon, *Iron toxicity and chelation therapy*. *Int J Hematol*, 2002. **76**(3): p. 219-28.
33. Ischiropoulos, H. and J.S. Beckman, *Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?* *J Clin Invest*, 2003. **111**(2): p. 163-9.
34. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1012**: p. 1-13.
35. Kim, H.Y., et al., *Identification of a conserved and functional iron-responsive element in the 5'-untranslated region of mammalian mitochondrial aconitase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(39): p. 24226-30.
36. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. *Cell*, 2004. **117**(3): p. 285-97.
37. Wang, J., et al., *Insights on Regulation and Function of the Iron Regulatory Protein 1 (IRP1)*. *Hemoglobin*, 2008. **32**(1): p. 109-15.
38. Muckenthaler, M., N.K. Gray, and M.W. Hentze, *IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F*. *Mol Cell*, 1998. **2**(3): p. 383-8.
39. Hentze, M.W. and L.C. Kuhn, *Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8175-82.
40. Kang, D.K., et al., *Iron regulatory protein 2 as iron sensor. Iron-dependent oxidative modification of cysteine*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(17): p. 14857-64.
41. Yamanaka, K., et al., *Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(4): p. 336-40.
42. Meyron-Holtz, E.G., et al., *Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis*. *Embo J*, 2004. **23**(2): p. 386-95.
43. Galy, B., et al., *Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2)*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2580-9.

44. Cooperman, S.S., et al., *Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1084-91.
45. LaVaute, T., et al., *Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 209-14.
46. Smith, S.R., et al., *Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 283-7.
47. Wang, W., et al., *Excess capacity of the iron regulatory protein system*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24650-9.
48. Gunshin, H., et al., *Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter*. FEBS Lett, 2001. **509**(2): p. 309-16.
49. Schneider, C., et al., *Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9*. J Biol Chem, 1982. **257**(14): p. 8516-22.
50. Cheng, Y., et al., *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex*. Cell, 2004. **116**(4): p. 565-76.
51. Lawrence, C.M., et al., *Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor*. Science, 1999. **286**(5440): p. 779-82.
52. Ponka, P. and C.N. Lok, *The transferrin receptor: role in health and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1111-37.
53. 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.
54. Kawabata, H., et al., *Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2714-9.
55. Hemadi, M., et al., *Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1*. Biochemistry, 2004. **43**(6): p. 1736-45.
56. 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.
57. 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. **281**(39): p. 28494-8.

58. 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.
59. Ohgami, R.S., et al., *Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1264-9.
60. Roy, C.N. and C.A. Enns, *Iron homeostasis: new tales from the crypt*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4020-7.
61. Shaw, G.C., et al., *Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation*. Nature, 2006. **440**(7080): p. 96-100.
62. Grootveld, M., et al., *Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J Biol Chem, 1989. **264**(8): p. 4417-22.
63. Hershko, C., et al., *Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity*. Br J Haematol, 1978. **40**(2): p. 255-63.
64. Hamill, R.L., J.C. Woods, and B.A. Cook, *Congenital atransferrinemia. A case report and review of the literature*. Am J Clin Pathol, 1991. **96**(2): p. 215-8.
65. Simpson, R.J., et al., *Non-transferrin-bound iron species in the serum of hypotransferrinaemic mice*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1156**(1): p. 19-26.
66. Liuzzi, J.P., et al., *Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13612-7.
67. Trinder, D. and E. Morgan, *Mechanisms of ferric citrate uptake by human hepatoma cells*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 1): p. G279-86.
68. Oudit, G.Y., et al., *Role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy*. J Mol Med, 2006. **84**(5): p. 349-64.
69. Oudit, G.Y., et al., *L-type Ca<sup>2+</sup> channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1187-94.
70. Osterloh, K. and P. Aisen, *Pathways in the binding and uptake of ferritin by hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1011**(1): p. 40-5.
71. Gelvan, D., et al., *Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway*. Blood, 1996. **88**(8): p. 3200-7.
72. Smith, A. and W.T. Morgan, *Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1981. **256**(21): p. 10902-9.

73. Morgan, E.H. and E. Baker, *Iron uptake and metabolism by hepatocytes*. Fed Proc, 1986. **45**(12): p. 2810-6.
74. Kozyraki, R., et al., *Megalyn-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12491-6.
75. Kaplan, J., *Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire*. Cell, 2002. **111**(5): p. 603-6.
76. Yang, J., et al., *An iron delivery pathway mediated by a lipocalin*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1045-56.
77. Daniele, B. and L. D'Agostino, *Proliferation and differentiation of the small intestinal epithelium: from Petri dish to bedside*. Ital J Gastroenterol, 1994. **26**(9): p. 459-70.
78. Andrews, N.C. and P.J. Schmidt, *Iron homeostasis*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 69-85.
79. Pothier, P. and J.S. Hugon, *Characterization of isolated villus and crypt cells from the small intestine of the adult mouse*. Cell Tissue Res, 1980. **211**(3): p. 405-18.
80. Levine, D.S. and J.W. Woods, *Immunolocalization of transferrin and transferrin receptor in mouse small intestinal absorptive cells*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(6): p. 851-8.
81. Parmley, R.T., J.C. Barton, and M.E. Conrad, *Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor, and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli*. Br J Haematol, 1985. **60**(1): p. 81-9.
82. Sharp, P. and S.K. Srari, *Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(35): p. 4716-24.
83. Chua, A.C., et al., *The regulation of cellular iron metabolism*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2007. **44**(5-6): p. 413-59.
84. McKie, A.T., et al., *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science, 2001. **291**(5509): p. 1755-9.
85. Gunshin, H., et al., *Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2879-83.
86. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
87. Fleming, M.D., et al., *Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 383-6.

88. 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.
89. Conrad, M.E. and J.N. Umbreit, *A concise review: iron absorption--the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption*. Am J Hematol, 1993. **42**(1): p. 67-73.
90. Conrad, M.E., et al., *Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron*. Blood, 1993. **81**(2): p. 517-21.
91. Conrad, M.E., et al., *A newly identified iron binding protein in duodenal mucosa of rats. Purification and characterization of mobilferrin*. J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 5273-9.
92. Umbreit, J.N., et al., *Iron absorption and cellular transport: the mobilferrin/paraferritin paradigm*. Semin Hematol, 1998. **35**(1): p. 13-26.
93. Umbreit, J.N., et al., *Paraferritin: a protein complex with ferrireductase activity is associated with iron absorption in rats*. Biochemistry, 1996. **35**(20): p. 6460-9.
94. Shayeghi, M., et al., *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell, 2005. **122**(5): p. 789-801.
95. Richardson, D.R., P. Ponka, and D. Vyoral, *Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone: examination of the intermediates involved in iron metabolism*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3477-88.
96. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
97. 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.
98. Donovan, A., et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 191-200.
99. Ganz, T., *Cellular iron: ferroportin is the only way out*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 155-7.
100. 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.
101. Cherukuri, S., et al., *Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption*. Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 309-19.

102. Han, O. and E.Y. Kim, *Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 1000-10.
103. Sayers, M.H., G. English, and C. Finch, *Capacity of the store-regulator in maintaining iron balance*. Am J Hematol, 1994. **47**(3): p. 194-7.
104. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism*. N Engl J Med, 1999. **341**(26): p. 1986-95.
105. Ponka, P., *Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells*. Blood, 1997. **89**(1): p. 1-25.
106. Siah, C.W., et al., *Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders*. Clin Biochem Rev, 2006. **27**(1): p. 5-16.
107. Morgan, E.H. and P.S. Oates, *Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 384-99.
108. Oates, P.S., *The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption*. Pflugers Arch, 2007. **455**(2): p. 201-13.
109. Oates, P.S. and E.H. Morgan, *Ferritin gene expression and transferrin receptor activity in intestine of rats with varying iron stores*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 1): p. G636-46.
110. Oates, P.S., C. Thomas, and E.H. Morgan, *Transferrin receptor activity and localisation in the rat duodenum*. Pflugers Arch, 2000. **440**(1): p. 116-24.
111. Wheby, M.S. and W.H. Crosby, *The Gastrointestinal Tract and Iron Absorption*. Blood, 1963. **22**: p. 416-28.
112. Conrad, M.E., L.R. Weintraub, and W.H. Crosby, *The Role of the Intestine in Iron Kinetics*. J Clin Invest, 1964. **43**: p. 963-74.
113. Bothwell, T.H., *Overview and mechanisms of iron regulation*. Nutr Rev, 1995. **53**(9): p. 237-45.
114. Steele, T.M., D.M. Frazer, and G.J. Anderson, *Systemic regulation of intestinal iron absorption*. IUBMB Life, 2005. **57**(7): p. 499-503.
115. Weiss, G. and L.T. Goodnough, *Anemia of chronic disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 1011-23.
116. 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.

117. Kulaksiz, H., et al., *The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney*. J Endocrinol, 2005. **184**(2): p. 361-70.
118. 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.
119. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
120. 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.
121. Nicolas, G., et al., *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4596-601.
122. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
123. Knutson, M.D., et al., *Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1324-8.
124. Fleming, R.E. and B.R. Bacon, *Orchestration of iron homeostasis*. N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1741-4.
125. Weinstein, D.A., et al., *Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3776-81.
126. Mazur, A., et al., *Dietary iron regulates hepatic hepcidin 1 and 2 mRNAs in mice*. Metabolism, 2003. **52**(10): p. 1229-31.
127. 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.
128. 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.
129. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
130. Rivera, S., et al., *Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2196-9.

131. Rivera, S., et al., *Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1797-802.
132. Cox, J.S. and P. Walter, *A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response*. *Cell*, 1996. **87**(3): p. 391-404.
133. Powell, L.W., C.B. Campbell, and E. Wilson, *Intestinal mucosal uptake of iron and iron retention in idiopathic haemochromatosis as evidence for a mucosal abnormality*. *Gut*, 1970. **11**(9): p. 727-31.
134. 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.
135. Lebron, J.A., et al., *Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor*. *Cell*, 1998. **93**(1): p. 111-23.
136. 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.
137. Fleming, R.E. and W.S. Sly, *Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 663-80.
138. Corsi, B., et al., *Overexpression of the hereditary hemochromatosis protein, HFE, in HeLa cells induces an iron-deficient phenotype*. *FEBS Lett*, 1999. **460**(1): p. 149-52.
139. Gross, C.N., et al., *Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(34): p. 22068-74.
140. Riedel, H.D., et al., *HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3915-21.
141. Roy, C.N., et al., *Increased IRP1 and IRP2 RNA binding activity accompanies a reduction of the labile iron pool in HFE-expressing cells*. *J Cell Physiol*, 2002. **190**(2): p. 218-26.
142. Roy, C.N., et al., *Interactions of the ectodomain of HFE with the transferrin receptor are critical for iron homeostasis in cells*. *FEBS Lett*, 2000. **484**(3): p. 271-4.
143. Roy, C.N., et al., *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 9022-8.



144. 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.
145. Lebron, J.A. and P.J. Bjorkman, *The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis*. J Mol Biol, 1999. **289**(4): p. 1109-18.
146. 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.
147. 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.
148. 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.
149. Schwake, L., et al., *Regulation of transferrin-induced endocytosis by wild-type and C282Y-mutant HFE in transfected HeLa cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(5): p. C973-9.
150. Bastin, J.M., et al., *Kupffer cell staining by an HFE-specific monoclonal antibody: implications for hereditary haemochromatosis*. Br J Haematol, 1998. **103**(4): p. 931-41.
151. Parkkila, S., et al., *Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13198-202.
152. Parkkila, S., et al., *Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes*. Haematologica, 2000. **85**(4): p. 340-5.
153. Parkkila, S., et al., *Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2534-9.
154. Waheed, A., et al., *Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1579-84.
155. Cuthbert, J.A., *Iron, HFE, and hemochromatosis update*. J Investig Med, 1997. **45**(9): p. 518-29.
156. Beckman, L.E., et al., *Ethnic differences in the HFE codon 282 (Cys/Tyr) polymorphism*. Hum Hered, 1997. **47**(5): p. 263-7.

157. Olynyk, J.K., et al., *A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 718-24.
158. Girouard, J., et al., *Prevalence of HFE gene C282Y and H63D mutations in a French-Canadian population of neonates and in referred patients*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(2): p. 185-9.
159. Merryweather-Clarke, A.T., et al., *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. J Med Genet, 1997. **34**(4): p. 275-8.
160. Jouanolle, A.M., et al., *Prevalence of the C282Y mutation in Brittany: penetrance of genetic hemochromatosis?* Ann Genet, 1998. **41**(4): p. 195-8.
161. Bacon, B.R., et al., *Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads*. Gastroenterology, 1999. **116**(1): p. 193-207.
162. Risch, N., *Haemochromatosis, HFE and genetic complexity*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 375-6.
163. Gochee, P.A., et al., *A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation*. Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 646-51.
164. Burke, W., et al., *Contribution of different HFE genotypes to iron overload disease: a pooled analysis*. Genet Med, 2000. **2**(5): p. 271-7.
165. Mura, C., O. Raguenes, 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.
166. Wallace, D.F., et al., *Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y*. J Hepatol, 2002. **36**(4): p. 474-9.
167. Asberg, A., et al., *Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation*. Genet Test, 2002. **6**(1): p. 59-62.
168. Barton, J.C., et al., *Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands*. Blood Cells Mol Dis, 1999. **25**(3-4): p. 147-55.
169. 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.
170. Zhou, X.Y., et al., *HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2492-7.

171. Santos, M., et al., *Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1975-85.
172. Pietrangelo, A., et al., *Duodenal ferritin synthesis in genetic hemochromatosis*. Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 208-17.
173. Fleming, R.E., et al., *Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3143-8.
174. Zoller, H., et al., *Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis*. Lancet, 1999. **353**(9170): p. 2120-3.
175. Waheed, A., et al., *Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3117-22.
176. Ahmad, K.A., et al., *Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 361-6.
177. 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.
178. 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.
179. Nicolas, G., et al., *Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 97-101.
180. Ioannou, G.N. and K.V. Kowdley, *Hepcidin in HFE-associated hemochromatosis: another piece of the "iron" puzzle*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 615-6; discussion 616.
181. Cayley, W.E., Jr., *Haemochromatosis*. Bmj, 2008. **336**(7642): p. 506.
182. Siah, C.W., D. Trinder, and J.K. Olynyk, *Iron overload*. Clin Chim Acta, 2005. **358**(1-2): p. 24-36.
183. Adams, P.C. and J.C. Barton, *Haemochromatosis*. Lancet, 2007. **370**(9602): p. 1855-60.
184. Toyokuni, S., *Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes*. Redox Rep, 2002. **7**(4): p. 189-97.

185. Huang, C., et al., *Role of bioavailable iron in coal dust-induced activation of activator protein-1 and nuclear factor of activated T cells: difference between Pennsylvania and Utah coal dusts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(5): p. 568-74.
186. Dai, J., et al., *Iron-induced interleukin-6 gene expression: possible mediation through the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways*. Toxicology, 2004. **203**(1-3): p. 199-209.
187. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
188. Weinberg, E.D., *Iron withholding: a defense against viral infections*. Biometals, 1996. **9**(4): p. 393-9.
189. Weinberg, E.D., *Microbial pathogens with impaired ability to acquire host iron*. Biometals, 2000. **13**(1): p. 85-9.
190. Weiss, G., *Iron and immunity: a double-edged sword*. Eur J Clin Invest, 2002. **32** Suppl 1: p. 70-8.
191. Walker, E.M., Jr. and S.M. Walker, *Effects of iron overload on the immune system*. Ann Clin Lab Sci, 2000. **30**(4): p. 354-65.
192. Brock, J.H. and V. Mulero, *Cellular and molecular aspects of iron and immune function*. Proc Nutr Soc, 2000. **59**(4): p. 537-40.
193. Jordan, A. and P. Reichard, *Ribonucleotide reductases*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 71-98.
194. Larrick, J.W. and P. Cresswell, *Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation*. J Supramol Struct, 1979. **11**(4): p. 579-86.
195. Lederman, H.M., et al., *Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation*. Blood, 1984. **64**(3): p. 748-53.
196. Richardson, D.R. and E. Baker, *The uptake of iron and transferrin by the human malignant melanoma cell*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1053**(1): p. 1-12.
197. Richardson, D.R. and E. Baker, *The effect of desferrioxamine and ferric ammonium citrate on the uptake of iron by the membrane iron-binding component of human melanoma cells*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1103**(2): p. 275-80.
198. Trinder, D., O. Zak, and P. Aisen, *Transferrin receptor-independent uptake of different transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression*. Hepatology, 1996. **23**(6): p. 1512-20.

199. Chitambar, C.R. and P.A. Seligman, *Effects of different transferrin forms on transferrin receptor expression, iron uptake, and cellular proliferation of human leukemic HL60 cells. Mechanisms responsible for the specific cytotoxicity of transferrin-gallium.* J Clin Invest, 1986. **78**(6): p. 1538-46.
200. Chan, S.M., et al., *Inhibition of gallium-67 uptake in melanoma by an anti-human transferrin receptor monoclonal antibody.* J Nucl Med, 1987. **28**(8): p. 1303-7.
201. Thompson, H.J., et al., *Effect of dietary iron deficiency or excess on the induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea.* Carcinogenesis, 1991. **12**(1): p. 111-4.
202. Wang, F., R.L. Elliott, and J.F. Head, *Inhibitory effect of deferoxamine mesylate and low iron diet on the 13762NF rat mammary adenocarcinoma.* Anticancer Res, 1999. **19**(1A): p. 445-50.
203. Trowbridge, I.S. and F. Lopez, *Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(4): p. 1175-9.
204. Kemp, J.D., et al., *Inhibition of hematopoietic tumor growth by combined treatment with deferoxamine and an IgG monoclonal antibody against the transferrin receptor: evidence for a threshold model of iron deprivation toxicity.* Cancer Res, 1992. **52**(15): p. 4144-8.
205. Marcus, D.M. and N. Zinberg, *Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: results in normal individuals and patients with breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 1975. **55**(4): p. 791-5.
206. Kew, M.C., et al., *Serum and tumour ferritins in primary liver cancer.* Gut, 1978. **19**(4): p. 294-9.
207. Hann, H.W., H.M. Levy, and A.E. Evans, *Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma.* Cancer Res, 1980. **40**(5): p. 1411-3.
208. Miyata, Y., et al., *Predictive values of acute phase reactants, basic fetoprotein, and immunosuppressive acidic protein for staging and survival in renal cell carcinoma.* Urology, 2001. **58**(2): p. 161-4.
209. Ozen, H., et al., *Clinical significance of serum ferritin in patients with renal cell carcinoma.* Urology, 1995. **46**(4): p. 494-8.
210. Partin, A.W., et al., *Serum ferritin as a clinical marker for renal cell carcinoma: influence of tumor volume.* Urology, 1995. **45**(2): p. 211-7.
211. Hann, H.W., et al., *Biologic differences between neuroblastoma stages IV-S and IV. Measurement of serum ferritin and E-rosette inhibition in 30 children.* N Engl J Med, 1981. **305**(8): p. 425-9.

212. Hann, H.L., M.W. Stahlhut, and I. Millman, *Human ferritins present in the sera of nude mice transplanted with human neuroblastoma or hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 1984. **44**(9): p. 3898-901.
213. Rossiello, R., M.V. Carriero, and G.G. Giordano, *Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue*. *J Clin Pathol*, 1984. **37**(1): p. 51-5.
214. Hershko, C., et al., *Iron overload and chelation*. *Hematology*, 2005. **10 Suppl 1**: p. 171-3.
215. Donfrancesco, A., et al., *Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients*. *Cancer Res*, 1990. **50**(16): p. 4929-30.
216. Buss, J.L., F.M. Torti, and S.V. Torti, *The role of iron chelation in cancer therapy*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(12): p. 1021-34.
217. Blatt, J. and S. Stitely, *Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines*. *Cancer Res*, 1987. **47**(7): p. 1749-50.
218. Blatt, J., S.R. Taylor, and S. Stitely, *Mechanism of antineuroblastoma activity of deferoxamine in vitro*. *J Lab Clin Med*, 1988. **112**(4): p. 433-6.
219. Hann, H.W., et al., *Antitumor effect of deferoxamine on human hepatocellular carcinoma growing in athymic nude mice*. *Cancer*, 1992. **70**(8): p. 2051-6.
220. Jiang, X.P., et al., *Induction of apoptosis by iron depletion in the human breast cancer MCF-7 cell line and the 13762NF rat mammary adenocarcinoma in vivo*. *Anticancer Res*, 2002. **22**(5): p. 2685-92.
221. Dayani, P.N., et al., *Desferoxamine (DFO)--mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer*. *J Neurooncol*, 2004. **67**(3): p. 367-77.
222. Lovejoy, D.B. and D.R. Richardson, *Iron chelators as anti-neoplastic agents: current developments and promise of the PIH class of chelators*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(12): p. 1035-49.
223. Blatt, J., et al., *Failure to alter the course of acute myelogenous leukemia in the rat with subcutaneous deferoxamine*. *Leuk Res*, 1991. **15**(5): p. 391-4.
224. Simonart, T., et al., *Iron withdrawal strategies fail to prevent the growth of SiHa-induced tumors in mice*. *Gynecol Oncol*, 2003. **90**(1): p. 91-5.
225. Dreicer, R., et al., *A phase II trial of deferoxamine in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer*. *Cancer Invest*, 1997. **15**(4): p. 311-7.

226. Richardson, D.R., E.H. Tran, and P. Ponka, *The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents*. *Blood*, 1995. **86**(11): p. 4295-306.
227. Richardson, D.R. and K. Milnes, *The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents II: the mechanism of action of ligands derived from salicylaldehyde benzoyl hydrazone and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde benzoyl hydrazone*. *Blood*, 1997. **89**(8): p. 3025-38.
228. Deugnier, Y. and B. Turlin, *Iron and hepatocellular carcinoma*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001. **16**(5): p. 491-4.
229. Parent, M.E., Y. Hua, and J. Siemiatycki, *Occupational risk factors for renal cell carcinoma in Montreal*. *Am J Ind Med*, 2000. **38**(6): p. 609-18.
230. Tossavainen, A., *Estimated risk of lung cancer attributable to occupational exposures in iron and steel foundries*. *IARC Sci Publ*, 1990(104): p. 363-7.
231. Nelson, R.L., *Iron and colorectal cancer risk: human studies*. *Nutr Rev*, 2001. **59**(5): p. 140-8.
232. Suryo Rahmanto, Y., L.L. Dunn, and D.R. Richardson, *The melanoma tumor antigen, melanotransferrin (p97): a 25-year hallmark--from iron metabolism to tumorigenesis*. *Oncogene*, 2007. **26**(42): p. 6113-24.
233. Greenlee, R.T., et al., *Cancer statistics, 2001*. *CA Cancer J Clin*, 2001. **51**(1): p. 15-36.
234. Chan, K.K. and T.J. Selman, *Testing for ovarian cancer*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006. **20**(6): p. 977-83.
235. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 255-88.
236. Stemberger-Papic, S., et al., *Morphometry and digital AgNOR analysis in cytological imprints of benign, borderline and malignant serous ovarian tumours*. *Cytopathology*, 2006. **17**(6): p. 382-9.
237. Ouellet, V., et al., *Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling*. *Oncogene*, 2005. **24**(29): p. 4672-87.
238. Burger, C.W., et al., *The management of borderline epithelial tumors of the ovary*. *Int J Gynecol Cancer*, 2000. **10**(3): p. 181-197.
239. Dietel, M. and S. Hauptmann, *Serous tumors of low malignant potential of the ovary. I. Diagnostic pathology*. *Virchows Arch*, 2000. **436**(5): p. 403-12.

240. Kaku, T., et al., *Histological classification of ovarian cancer*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(1): p. 9-17.
241. Naora, H., *The heterogeneity of epithelial ovarian cancers: reconciling old and new paradigms*. Expert Rev Mol Med, 2007. **9**(13): p. 1-12.
242. Ouellet, V., et al., *Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(3): p. 599-607.
243. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary*. Int J Gynaecol Obstet, 2003. **83 Suppl 1**: p. 135-66.
244. Fader, A.N. and P.G. Rose, *Role of surgery in ovarian carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(20): p. 2873-83.
245. Farley, J., L.L. Ozbun, and M.J. Birrer, *Genomic analysis of epithelial ovarian cancer*. Cell Res, 2008. **18**(5): p. 538-48.
246. Seidman, J.D. and R.J. Kurman, *Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators*. Hum Pathol, 2000. **31**(5): p. 539-57.
247. Bast, R.C., Jr., et al., *CA 125: the past and the future*. Int J Biol Markers, 1998. **13**(4): p. 179-87.
248. O'Brien, T.J., et al., *The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences*. Tumour Biol, 2001. **22**(6): p. 348-66.
249. Markman, M., et al., *Significance of early changes in the serum CA-125 antigen level on overall survival in advanced ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(1): p. 195-8.
250. Riedinger, J.M., et al., *CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study*. Ann Oncol, 2006. **17**(8): p. 1234-8.
251. Riedinger, J.M., et al., *Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian tumour outcome*. Ann Oncol, 2007. **18**(5): p. 881-5.
252. Juretzka, M.M., et al., *CA125 level as a predictor of progression-free survival and overall survival in ovarian cancer patients with surgically defined disease status prior to the initiation of intraperitoneal consolidation therapy*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(1): p. 176-80.



253. Hogdall, E.V., et al., *CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients. From The Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study.* Gynecol Oncol, 2007. **104**(3): p. 508-15.
254. Bast, R.C., Jr., et al., *New tumor markers: CA125 and beyond.* Int J Gynecol Cancer, 2005. **15 Suppl 3**: p. 274-81.
255. Hogdall, C.K., et al., *The role of serum tetranectin, CA 125, and a combined index as tumor markers in women with pelvic tumors.* Gynecol Oncol, 1995. **56**(1): p. 22-8.
256. Zurawski, V.R., Jr., et al., *Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer.* Int J Cancer, 1988. **42**(5): p. 677-80.
257. Jacobs, I. and R.C. Bast, Jr., *The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature.* Hum Reprod, 1989. **4**(1): p. 1-12.
258. Tuxen, M.K., G. Soletormos, and P. Dombernowsky, *Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer.* Cancer Treat Rev, 1995. **21**(3): p. 215-45.
259. Markman, M., *Optimizing primary chemotherapy in ovarian cancer.* Hematol Oncol Clin North Am, 2003. **17**(4): p. 957-68, viii.
260. Matei, D., *Novel agents in ovarian cancer.* Expert Opin Investig Drugs, 2007. **16**(8): p. 1227-39.
261. Hacker, N.F., et al., *Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer.* Obstet Gynecol, 1983. **61**(4): p. 413-20.
262. Vogl, S.E., et al., *Cis-platin based combination chemotherapy for advanced ovarian cancer. High overall response rate with curative potential only in women with small tumor burdens.* Cancer, 1983. **51**(11): p. 2024-30.
263. Morris, M., D.M. Gershenson, and J.T. Wharton, *Secondary cytoreductive surgery in epithelial ovarian cancer: nonresponders to first-line therapy.* Gynecol Oncol, 1989. **33**(1): p. 1-5.
264. Agarwal, R. and S.B. Kaye, *Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(7): p. 502-16.
265. Marupudi, N.I., et al., *Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies.* Expert Opin Drug Saf, 2007. **6**(5): p. 609-21.
266. Pinto, V., et al., *Preoperative evaluation of ferritinemia in primary epithelial ovarian cancer.* Tumori, 1997. **83**(6): p. 927-9.

267. Brard, L., C.O. Granai, and N. Swamy, *Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2006. **100**(1): p. 116-27.
268. Yamaguchi, K., et al., *Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(1): p. 32-40.
269. Wang, J., G. Chen, and K. Pantopoulos, *The haemochromatosis protein HFE induces an apparent iron-deficient phenotype in H1299 cells that is not corrected by co-expression of beta 2-microglobulin*. *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 3): p. 891-9.
270. Constante, M., et al., *Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **291**(2): p. G229-37.
271. Miranda, C.J., et al., *Contributions of beta2-microglobulin-dependent molecules and lymphocytes to iron regulation: insights from HfeRag1(-/-) and beta2mRag1(-/-) double knock-out mice*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2847-9.
272. Richardson, D. and E. Baker, *Two mechanisms of iron uptake from transferrin by melanoma cells. The effect of desferrioxamine and ferric ammonium citrate*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(20): p. 13972-9.
273. Parkkila, S., et al., *Molecular aspects of iron absorption and HFE expression*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(6): p. 1489-96.
274. Trinder, D., et al., *Iron uptake from plasma transferrin by the duodenum is impaired in the Hfe knockout mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(8): p. 5622-6.
275. Wyllie, S. and J.G. Liehr, *Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen*. *Arch Biochem Biophys*, 1997. **346**(2): p. 180-6.
276. Liehr, J.G. and J.S. Jones, *Role of iron in estrogen-induced cancer*. *Curr Med Chem*, 2001. **8**(7): p. 839-49.
277. Kallianpur, A.R., et al., *Increased prevalence of the HFE C282Y hemochromatosis allele in women with breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(2): p. 205-12.
278. Stevens, R.G., et al., *Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death*. *Int J Cancer*, 1994. **56**(3): p. 364-9.
279. Bathum, L., et al., *Association of mutations in the hemochromatosis gene with shorter life expectancy*. *Arch Intern Med*, 2001. **161**(20): p. 2441-4.

280. Bron, D., N. Meuleman, and C. Mascaux, *Biological basis of anemia*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 1-6.
281. Maccio, A., et al., *Hemoglobin levels correlate with interleukin-6 levels in patients with advanced untreated epithelial ovarian cancer: role of inflammation in cancer-related anemia*. Blood, 2005. **106**(1): p. 362-7.
282. Nairz, M. and G. Weiss, *Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: From anemia to hemochromatosis*. Wien Klin Wochenschr, 2006. **118**(15-16): p. 442-62.
283. Wardrop, S.L. and D.R. Richardson, *Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages*. Eur J Biochem, 2000. **267**(22): p. 6586-93.
284. Yuan, C.C., et al., *Hyperferritinemia in ovarian cancer*. J Reprod Med, 1988. **33**(2): p. 193-5.
285. Griaznova, I.M., et al., *[Serum ferritin and trophoblastic globulin in genital tumors in women]*. Vopr Onkol, 1990. **36**(2): p. 181-7.
286. Fukazawa, I., et al., *Serum levels of six tumor markers in patients with benign and malignant gynecological disease*. Arch Gynecol Obstet, 1988. **243**(2): p. 61-8.
287. Inaba, N., et al., *[Diagnosis: tumor marker]*. Gan No Rinsho, 1990. **36**(10): p. 1123-7.
288. Bomford, A.B. and H.N. Munro, *Ferritin gene expression in health and malignancy*. Pathobiology, 1992. **60**(1): p. 10-8.
289. Tripathi, P.K. and S.K. Chatterjee, *Elevated expression of ferritin H-chain mRNA in metastatic ovarian tumor*. Cancer Invest, 1996. **14**(6): p. 518-26.
290. Tong, X., H. Kawabata, and H.P. Koeffler, *Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level*. Br J Haematol, 2002. **116**(2): p. 458-64.
291. Richardson, D.R., *Iron and gallium increase iron uptake from transferrin by human melanoma cells: further examination of the ferric ammonium citrate-activated iron uptake process*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1536**(1): p. 43-54.
292. Lee, S.Y., et al., *Consequences of expressing mutants of the hemochromatosis gene (HFE) into a human neuronal cell line lacking endogenous HFE*. Faseb J, 2007. **21**(2): p. 564-76.

293. Corsi, B., et al., *Overexpression of the hereditary hemochromatosis protein, HFE, in HeLa cells induces an iron-deficient phenotype*. FEBS Lett, 1999. **460**(1): p. 149-52.
294. Chitambar, C.R. and J.P. Wereley, *Iron transport in a lymphoid cell line with the hemochromatosis C282Y mutation*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2734-40.
295. Carlson, H., et al., *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, lowers intracellular iron levels independently of transferrin receptor 1 in TRVb cells*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2564-70.
296. Feeney, G.P. and M. Worwood, *The effects of wild-type and mutant HFE expression upon cellular iron uptake in transfected human embryonic kidney cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1538**(2-3): p. 242-51.
297. Bergeron, R.J., R.R. Streiff, and G.T. Elliott, *Influence of iron on in vivo proliferation and lethality of L1210 cells*. J Nutr, 1985. **115**(3): p. 369-74.
298. 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.
299. Trowbridge, I.S., et al., *Monoclonal antibodies to transferrin receptor and assay of their biological effects*. Methods Enzymol, 1987. **147**: p. 265-79.
300. Baldi, A., et al., *Ferritin contributes to melanoma progression by modulating cell growth and sensitivity to oxidative stress*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3175-83.
301. Brard, L., C.O. Granai, and N. Swamy, *Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(1): p. 116-27.
302. Hann, H.W., M.W. Stahlhut, and B.S. Blumberg, *Iron nutrition and tumor growth: decreased tumor growth in iron-deficient mice*. Cancer Res, 1988. **48**(15): p. 4168-70.
303. Nie, G., et al., *In vivo tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2428-34.
304. Shi, H., et al., *Lipocalin 2 promotes lung metastasis of murine breast cancer cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2008. **27**: p. 83.
305. Macedo, M.F., et al., *Low serum transferrin levels in HFE C282Y homozygous subjects are associated with low CD8(+) T lymphocyte numbers*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(3): p. 319-25.







