

HFE, une nouvelle molécule HLA de classe I, est impliquée dans le métabolisme du fer

La découverte d'un gène candidat pour l'hémochromatose en 1996, rapportée en son temps dans *médecine/sciences* [1], à 4,5 mégabases de HLA-A en position télomérique sur le bras court du chromosome 6, a mis un point d'orgue à 20 années de cartographies génétique et physique de la bande chromosomique 6p21.3, elle a également mis en lumière la famille des protéines apparentées aux molécules HLA de classe I, peu connue des non-spécialistes de la région du CMH.

Le gène HFE et l'hémochromatose génétique

L'hémochromatose génétique, transmise selon le mode autosomique récessif, est vraisemblablement la maladie héréditaire la plus fréquente dans les populations d'Europe du Nord. Elle est caractérisée par une hyperabsorption intestinale du fer entraînant une surcharge multiviscérale progressive. L'atteinte tissulaire se traduit par une élévation du fer sérique et une saturation augmentée de la protéine transporteuse du fer, la transferrine, avant l'apparition des signes cliniques vers 40 ans chez l'homme et 50 ans chez la femme. En l'absence de traitement, l'évolution est mortelle, le plus souvent par insuffisance cardiaque ou cancer du foie. Le traitement déplétif par saignées évite la survenue des complications et, s'il est instauré précocement, l'espérance de vie des malades rejoint celle de la population générale [2]. L'identification d'une mutation majeure du gène *HFE*, C282Y, associée sans ambiguïté à l'hémochromatose avec une fréquence allélique > 90 % chez les malades d'Europe du Nord [3, 4], fait envisager un dépistage sur une base génotypique [4]. La deuxième mutation décrite, H63D,

est sur-représentée chez les malades non porteurs de la mutation C282Y, mais son rôle reste discuté.

La protéine HFE est apparentée aux molécules HLA de classe I

Le gène *HFE*, de 12 kb, code pour une protéine de 343 acides aminés, possédant de fortes similitudes avec HLA-A2, HLA G et le FcRn appartenant à la famille des molécules HLA de classe I. Cette famille comprend, d'une part, les molécules classiques ou classe Ia, HLA-A, B et C dont les gènes sont localisés dans le CMH, en 6p21.3 et, d'autre part, les molécules non classiques ou classe Ib, parmi lesquelles on distingue cinq protéines dont les gènes sont également situés dans le CMH de classe I, HLA-E, F, G, MICA et MICB, et quatre protéines dont les gènes ne sont pas localisés sur le chromosome 6: le récepteur néonatal pour le Fc des immunoglobulines (FcRn), CD1, la Zn α_2 glycoprotéine (ZAG) et MRI (*Tableau 1*). Le gène *HFE* est situé sur le chromosome 6, mais en dehors du CMH proprement dit. Seuls les gènes localisés dans le CMH présentent un polymorphisme allélique, plus ou moins large. Les molécules HLA de classe I classiques sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de types cellulaires très variés. Les HLA de classe Ib, pour la plupart transmembranaires également, ont une expression plus faible que les molécules de classe Ia et plus restreinte en particulier aux organes lymphoïdes, à l'intestin et au placenta (*Tableau 1*). Contrairement aux HLA de classe Ia qui lient les peptides endogènes de 8 à 10 acides aminés, les molécules de classe Ib interagissent avec des antigènes de nature différente comme les lipides, voire avec des protéines. Un homologue viral de ces molécules

non classiques a été décrit pour le cytomégalovirus (CMV) humain [5] et plus récemment pour le CMV murin [6]. Ces virus dépriment l'immunité de l'hôte en diminuant, d'une part, l'expression des molécules de classe I classiques et, d'autre part, grâce à ces molécules classe I-like, la réactivité des cellules NK vis-à-vis des cellules déplétées en molécules de classe I (*m/s* 1997, n° 6-7, p. 865). L'homologue murin du virus humain aurait pour ligand LIR-1, un membre de la superfamille des immunoglobulines apparenté aux récepteurs inhibiteurs NK [7].

La structure tridimensionnelle de la protéine HFE, déduite initialement de la séquence de l'ADNc, prédisait une protéine proche d'une chaîne lourde de molécule HLA de classe I avec trois domaines extramembranaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ s'associant à la $\beta 2$ microglobuline, un segment transmembranaire unique et une courte extrémité carboxy-terminale [1]. La partie amino-terminale, supposée extracellulaire, contient une région de liaison potentielle au peptide, peu polymorphe (domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$), et un domaine immunoglobuline ($\alpha 3$). Cependant, la proline fermant dans le FcRn le sillon où se place normalement le peptide est également présente dans HFE. De plus, seules deux des quatre tyrosines impliquées dans la liaison d'une molécule de classe I au peptide sont conservées dans HFE. Ces constatations ne plaident pas en faveur d'une liaison peptide-HFE mais une interaction originale avec un autre type de ligand, protéique ou non, reste envisageable, en particulier par les régions $\alpha 1$ et $\alpha 2$ exposées à l'extérieur de la molécule, comme cela est décrit pour le FcRn [8]. Avant même la découverte du gène *HFE*, l'implication dans la régulation du métabolisme du fer d'une pro-

Tableau I
LES MOLÉCULES HLA DE CLASSE I β OU NON CLASSIQUES

Nom de la protéine	Localisation du gène	Liaison β 2 microglobuline	Expression tissulaire de la protéine	Fonction
HLA A, B, C	6p21.3	+	les cellules nucléées sauf les gamètes, les neurones et les astrocytes cytotrophoblaste	présentation de peptides, ligand de récepteurs NK KIR
HLA C		-		coopération HLA G ?
HLA E	6p21.3	+	amnios	ligand majeur du récepteur NK CD94/NKG2A présentation de peptides dérivés du peptide signal de HLA classe I
HLA F	6p21.3	nd	nd	inconnue
HLA G	6p21.3	+	cytotrophoblaste extravilleux et cellules endothéliales du chorion au 1 ^{er} trimestre de la grossesse, cellules épithéliales thymiques, mélanocytes malins, monocytes ?	tolérance materno-fœtale. Protection du fœtus vis-à-vis d'infections? interaction avec CD94/NKG2A ?
MIC A	6p21.3	-	épithélium intestinal, cellules endothéliales, keratinocytes, monocytes	réponse au <i>stress</i> présentation aux lymphocytes $\gamma\delta^+$?
HFE	6p22.	+	tube digestif, placenta	métabolisme du fer, liaison au récepteur de la transferrine
FcRn	19q13.3	+	intestin, placenta, foie	transport et clairance des IgG
CD1 a	1q22-23	labile	thymocytes corticaux,	présentation de lipides, de glycolipides et de peptides hydrophobes
b	1q22-23	+	sous-population B,	
c	1q22-23	+	CPA	
CD1 d	1q22-23	-	épithélium intestinal et colique, thymus ?	contrôle la fonction des lymphocytes NKT présentation de glycolipides
CD1 e	1q22-23	nd	nd	inconnue
MR1	1q25.3	nd	nd	inconnue
ZAG	7	-	sécrétée dans les liquides biologiques	inconnue

Les caractéristiques des molécules de classe Ia, HLA A, B, C sont rappelées au début du tableau. HLA G était considéré comme un ligand de récepteur inhibiteur de natural killer mais HLA E apparaît en 1998 comme le ligand majeur de CD94/NKG2A. Le profil d'expression de HLA E reste à préciser pour définir le rôle respectif des deux molécules et leur mode d'interaction éventuelle dans les phénomènes de tolérance. La cristallisation des molécules HLA de classe Ib FcRn, CD1, ZAG et HFE a montré la présence d'une proline dans le domaine α 2, fermant une extrémité du sillon où se place normalement le peptide dans les HLA de classe Ia. CPA: cellules présentatrices de l'antigène (macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans), KIR: killer cell inhibitory receptor; MIC: MHC class I related chain.; NK: natural killer; ZAG: Zn α 2 glycoprotéine.

téine s'associant à la β 2 microglobuline était fortement suspectée sur l'existence d'une surcharge martiale chez les souris dont le gène codant pour la β 2 microglobuline a été invalidé [9, 10]. La mutation majeure dans l'hémochromatose C282Y tou-

chant, d'après les comparaisons de séquence, une cystéine impliquée dans un pont disulfure du domaine α 3, modifierait la conformation spatiale de la protéine, abolissant la liaison à la β 2 microglobuline (et du même coup son acheminement à la

membrane cellulaire). Ces hypothèses ont été récemment confirmées par l'analyse cristallographique de complexes HFE soluble- β 2 microglobuline et leur comparaison avec deux molécules de classe I non classiques déjà cristallisées, FcRn et CD1 [11].

Expression de la protéine HFE

Les données sur la localisation de la protéine HFE dans les tissus humains normaux sont pour l'instant fragmentaires. En utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre un peptide carboxy-terminal, Parkkila *et al.* ont décrit un marquage périnucléaire dans les cellules des cryptes de l'intestin proximal, siège de l'absorption du fer, et un marquage de la membrane cytoplasmique latérobasale des cellules de l'estomac et du côlon [12] alors que les hépatocytes et les cellules du système phagocytaire mononucléé étaient négatifs. Les mêmes auteurs ont montré une expression à la membrane apicale du syncytiotrophoblaste de placenta humain à terme [13]. Des expériences de transfection cellulaire ont permis d'établir qu'HFE est exprimée à la surface cellulaire, en association avec la $\beta 2$ microglobuline. La forme mutée C282Y n'est plus acheminée à la membrane cytoplasmique mais semble séquestrée dans des compartiments intermédiaires entre réticulum endoplasmique et Golgi. Comme attendu, la $\beta 2$ microglobuline ne peut plus être co-immunoprécipitée en présence de cette protéine mutée [14]. Ces données confirment que la liaison à la $\beta 2$ microglobuline est un facteur limitant pour la maturation et l'expression normale d'HFE. Ce phénomène n'est cependant pas universel parmi toutes les molécules de classe I : chez la souris, la cystéine incriminée dans la mutation C282Y est conservée dans les molécules H2-L^d et, lorsqu'elle est mutée, la molécule ne s'exprime plus à la membrane cellulaire bien que la chaîne lourde H-2L^d puisse toujours s'associer à la $\beta 2$ microglobuline [15].

Les modèles de surexpression étudiant le trafic intracellulaire d'HFE demeurent éloignés de l'expression normale de la protéine qui apparaît très faible dans ces mêmes lignées non transfectées [11] et dans les tissus normaux. Il faut donc rester prudent dans l'interprétation de ces résultats pour formuler des hypothèses physiopathologiques. D'après les données publiées sur le devenir des chaînes lourdes anormales de molécules HLA de classe I [16, 17],

la protéine HFE portant la mutation C282Y pourrait s'accumuler dans les compartiments comprenant le réticulum endoplasmique et le Golgi ou bien être rapidement transférée (par rétro-translocation) et dégradée dans le cytoplasme (figure 1). Selon que

l'on envisage l'un ou l'autre de ces processus, la surcharge en fer découlerait, soit de l'absence d'expression d'HFE à la membrane, soit d'une expression ectopique de la protéine, déclenchant une voie de transmission du signal inappropriée. La des

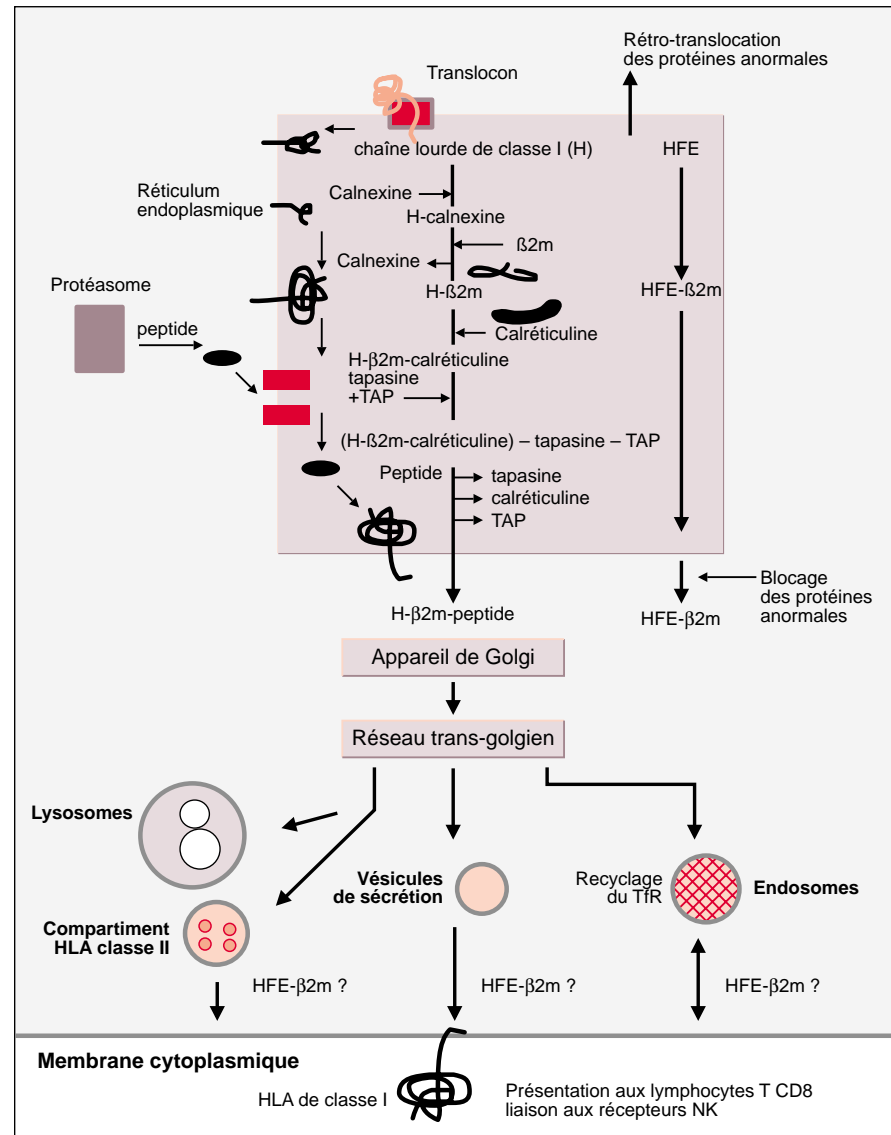


Figure 1. **Schéma de la biosynthèse d'une molécule HLA de classe Ia.** Les étapes et les compartiments suivis peuvent varier en fonction de la chaîne lourde, de l'espèce et du type cellulaire envisagés. Certaines molécules de classe Ib comme la famille CD1, empruntent la voie des compartiments HLA de classe II. Pour HFE, seuls sont connus la liaison à la $\beta 2$ microglobuline, l'indépendance vis-à-vis des TAP et l'absence de liaison à un peptide, la maturation dans le réticulum endoplasmique et des compartiments golgiens non précisés, enfin, au moins dans certains types de cellules épithéliales, la migration jusqu'à la membrane cytoplasmique. $\beta 2m$: $\beta 2$ microglobuline ; TAP : transporter associated with peptide processing, Tfr : récepteur de la transferrine.

cription récente (mais succincte !) de souris au gène *Hfe* invalidé, tant attendues par la communauté scientifique aussi bien pour confirmer le gène candidat que pour éclairer la physiopathologie, démontre que la surcharge en fer est directement liée à l'absence de la protéine HFE [18]. En effet, dans ce modèle dans lequel HFE n'est en principe plus synthétisée, la surcharge massive en fer observée dans les hépatocytes reproduit celle de l'hémochromatose.

Rôle biologique de HFE

L'intervention d'une molécule HLA de classe I-like dans la physiopathologie de l'hémochromatose génétique et donc dans le métabolisme du fer était déconcertante. Des molécules HLA de classe I ayant déjà été impliquées dans le processus de régulation d'un transporteur de glucose [19], un tel mécanisme d'interactions moléculaires pouvait être envisagé pour HFE. Les premières données expérimentales faisant envisager un rôle dans la régulation négative de l'absorption du fer, il restait à trouver les partenaires cellulaires de HFE.

Les protéines pouvant interagir avec HFE sont, en premier lieu, celles impliquées dans le routage des molécules de classe I et celles déjà connues pour participer au transport du fer, telles que le récepteur de la transferrine (TfR). L'association de HFE et du TfR, décrite par co-immunoprécipitation à partir d'extraits membranaires de placenta humain [13] vient d'être confirmée en culture cellulaire. L'interaction a été reproduite dans les cellules 293 entre le TfR et un hétérodimère HFE/ $\beta 2$ microglobuline surexprimé, composé, soit de la protéine HFE normale, soit de la forme mutée H63D, en présence de transferrine radio-marquée [20]. D'après les représentations de Scatchard, l'interaction HFE/TfR a pour conséquence une diminution d'affinité du récepteur pour son ligand. Dans ce modèle la forme mutée C282Y ne se lie pas au TfR, et ne peut donc inhiber la fixation de la transferrine à son récepteur. Il semble que la mutation H63D, tout en respectant l'association d'HFE au TfR, ne puisse plus

modifier l'affinité du TfR pour son ligand. Récemment, une très belle étude par cristallographie de complexes HFE-TfR solubles a permis de modéliser cette association [11]. Alors que deux molécules de transferrine se fixent sur le TfR, un seul hétérodimère HFE- $\beta 2$ microglobuline se lie au récepteur. Ainsi la transferrine et HFE interagiraient avec des régions différentes du TfR, et l'asymétrie engendrée par la présence d'HFE déstabiliserait la liaison transferrine-TfR. Par ailleurs, d'après cette étude, la formation des complexes HFE-TfR n'est possible qu'à pH 7,5 et non au pH acide auquel le TfR reste associé à l'apotransferrine dans les vésicules endosomiques, lors de la

libération du fer. Si cette modélisation est transposable à des molécules intégrées dans la membrane cellulaire, HFE diminuerait la liaison de la transferrine circulante au TfR (figure 2). La mutation H63D, remplaçant une histidine par un acide aspartique ferait disparaître des interactions intra et intermoléculaires dépendantes du pH. Dans ce cas, l'absence de variation d'affinité HFE-TfR en fonction du pH entraînerait une moindre liaison des deux molécules à pH 7,5, aboutissant à une augmentation de la fixation de la transferrine à son récepteur. De façon plus certaine, la substitution d'une histidine impliquée dans un pont intrachaine du domaine $\alpha 1$ d'HFE, peut altérer la

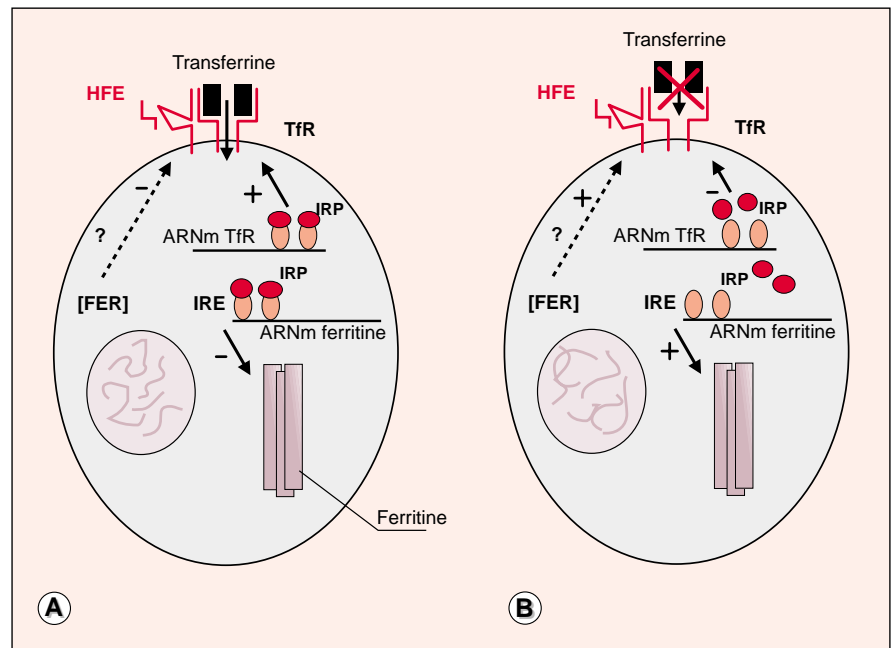


Figure 2. **Schéma du métabolisme du fer dans une cellule non polarisée, intégrant HFE et les protéines déjà connues dans la régulation de l'homéostasie du fer comme les IRP (iron regulatory protein), le récepteur de la transferrine (TfR) et la ferritine. Suivant ce schéma classique, le taux de fer de la cellule est réglé dans les étapes de traduction des ARNm par les IRP.**
A. Une diminution de la concentration intracellulaire du fer a pour conséquence, d'une part, une augmentation de l'expression des récepteurs de la transferrine et, d'autre part, une diminution de synthèse de la ferritine (régulation post-transcriptionnelle par les IRP). **B.** Au contraire, en cas d'augmentation intracellulaire du fer, la libération des IRE (iron responsive element) entraîne simultanément la diminution de la synthèse des TfR et l'augmentation de la synthèse de ferritine. Un mécanisme voisin pourrait exister pour HFE via les complexes HFE/TfR: un excès de fer entraînerait une surexpression de la protéine HFE et donc une moindre affinité TfR/transferrine, parallèlement à une diminution de la synthèse de TfR. Cependant, en l'absence de données suffisantes sur les séquences régulatrices du gène, les mécanismes mis en jeu restent hypothétiques.

conformation locale de la protéine, à l'origine d'un dysfonctionnement. Bien que le mode d'interaction HFE-TfR reste à préciser, c'est la première donnée expérimentale appuyant les résultats de l'étude d'un groupe de malades [21], faisant de H63D une mutation mineure de pénétrance faible, favorisant la surcharge en fer.

Conclusion

Ces derniers mois, des avancées majeures comme le modèle murin d'inactivation du gène *HFE*, la cristallisation de la protéine à haut niveau de résolution et sa modélisation ont permis de confirmer que *HFE* est bien le gène d'au moins une des formes génétiques d'hémochromatose. La protéine joue un rôle capital dans le métabolisme du fer. Le modèle du complexe ternaire HFE/TfR/transferrine proposé par Feder *et al.* est séduisant même si de nombreuses inconnues subsistent pour l'intégrer dans les rouages déjà établis du métabolisme du fer, en particulier le système de régulation intracellulaire de la synthèse des chaînes de la ferritine et du récepteur de la transferrine passant par les IRP. Par ailleurs, s'il est démontré qu'*HFE* est uniquement dévolue à la régulation du métabolisme du fer, il paraît à nouveau déconcertant qu'une telle conservation de structure parmi les molécules HLA de classe I puisse aboutir à des rôles biologiques si différents ■

RÉFÉRENCES

1. Le Gall J, Labie D. Un bon gène candidat pour l'hémochromatose. Analyse d'homozygotie par descendance en l'absence de consanguinité. *Med Sci* 1996; 12: 1273-6.
2. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampish HJ, Stromeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and non-cirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 14: 1256-62.
3. Jouanolle AM, Fergelot P, Gandon G, Yaouanq J, Le Gall JY, David V. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum Genet* 1997; 10: 544-7.
4. The UK haemochromatosis consortium. A simple genetic test identifies 90% of UK patients with haemochromatosis. *Gut* 1997; 41: 841-4.
5. Beck S, Barel BG. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988; 331: 269-72.
6. Rawlinson WD, Farell HE, Barel BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996; 70: 8833-49.
7. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; 7: 273-82.
8. Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 1994; 372: 336-43.
9. De Sousa M, Reimao R, Lacerda R, Hugo P, Kaufmann SHE, Porto G. Iron overload in $\beta 2$ microglobulin deficient mice. *Immunol Lett* 1994; 60: 828-32.
10. Rothenberg BE, Volland YR. $\beta 2$ knock out mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1529-34.
11. Lebrón JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998; 93: 111-23.
12. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, Bacon BR, Sly WS. Immunochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2534-9.
13. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Sly WS. Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13198-202.
14. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa F, Morikan E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC. Hemochromatosis founder mutation disrupts $\beta 2$ microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 14025-8.
15. Miyazaki JI, Apelia E, Ozato K. Intracellular blockade caused by disruption of the disulphide bridge in the third external domain of major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 757-61.
16. Raposo G, van Santen MH, Leijendekker R, Geuze HJ, Ploegh HL. Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Biol* 1995; 131: 1403-19.
17. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1896-901.
18. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, *et al.* Hfe gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2492-7.
19. Olsson L, Goldstein A, Stagsted J. Regulation of receptor internalization by the major histocompatibility complex class I molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9086-90.
20. Feder JN, David MP, Irrinki A, Lee VK, Lebrón JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, Schatzman RC. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1472-7.
21. Beutler E. The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 762-4.

Patricia Fergelot

Maître de conférences des Universités, praticien hospitalier.

Stéphanie Lohyer

Étudiante en thèse.

Jean-Yves Le Gall

Professeur des universités, praticien hospitalier. CHU de Rennes et UPR 41 Cnrs, Faculté de médecine, 2, avenue du Pr-Léon-Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France.

TIRÉS À PART

P. Fergelot.