



HAL
open science

Etude des interactions de l'axe hepcidine - ferroportine - fer et infection mycobactérienne

Rafiou Agoro

► **To cite this version:**

Rafiou Agoro. Etude des interactions de l'axe hepcidine - ferroportine - fer et infection mycobactérienne. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2016. Français. NNT: 2016ORLE2041 . tel-01529751

HAL Id: tel-01529751

<https://theses.hal.science/tel-01529751>

Submitted on 31 May 2017

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

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

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INEM - UMR7355 CNRS Equipe "Relations hôte-pathogène"

THÈSE présentée par :
Rafiou AGORO

soutenue le : **10 Octobre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Spécialité : Immunologie et Physiopathologie

**Etude des Interactions de l'axe Hepcidine –
Ferroportine – Fer et Infection
Mycobactérienne**

THÈSE dirigée par :

Catherine MURA

Valérie QUESNIAUX

Professeur, Université d'Orléans

Directrice de recherche, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

Olivier LOREAL

Caroline DEMANGEL

Directeur de recherche INSERM, Rennes

Directrice de recherche INSERM, Paris

JURY :

Chantal PICHON

Olivier LOREAL

Caroline DEMANGEL

François CANONNE-HERGAUX

Laurent KREMER

Catherine MURA

Valérie QUESNIAUX

Professeur, Université d'Orléans

Directeur de recherche, INSERM, Rennes

Directrice de recherche, INSERM Paris

Chargé de recherche, INSERM Toulouse

Directeur de recherche, CNRS Montpellier

Professeur, Université d'Orléans

Directrice de recherche, CNRS Orléans

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INEM - UMR7355 CNRS Equipe "Relations hôte-pathogène"

THÈSE présentée par :
Rafiou AGORO

soutenue le : **10 Octobre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Spécialité : Immunologie et Physiopathologie

**Etude des Interactions de l'axe Hepcidine –
Ferroportine – Fer et Infection
Mycobactérienne**

THÈSE dirigée par :

Catherine MURA

Valérie QUESNIAUX

Professeur, Université d'Orléans

Directrice de recherche, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

Olivier LOREAL

Caroline DEMANGEL

Directeur de recherche INSERM, Rennes

Directrice de recherche INSERM, Paris

JURY :

Chantal PICHON

Olivier LOREAL

Caroline DEMANGEL

François CANONNE-HERGAUX

Laurent KREMER

Catherine MURA

Valérie QUESNIAUX

Professeur, Université d'Orléans

Directeur de recherche, INSERM, Rennes

Directrice de recherche, INSERM Paris

Chargé de recherche, INSERM Toulouse

Directeur de recherche, CNRS Montpellier

Professeur, Université d'Orléans

Directrice de recherche, CNRS Orléans

Table des matières

Table des matières

Remerciements	6
Contributions scientifiques	9
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des abréviations	12
Préambule	14
Première partie : Etat de l'art	16
Chapitre 1 : Le fer et le vivant	17
I.1. Le fer: élément chimique à double-jeu	17
I.2. Le fer dans les organismes vivants	19
I.2.1. Importance du fer pour la croissance des pathogènes.....	19
I.2.2. Importance du fer pour la croissance des mammifères.....	19
I.3. Pathologies liées au fer chez les mammifères	20
I.3.1. La déficience en fer: l'anémie.....	21
I.3.1.1 Introduction.....	21
I.3.1.2. Facteurs de risque et traitement de l'anémie.....	22
I.3.1.3. Résistance/susceptibilité à l'infection.....	22
I.3.2. L'hémochromatose: la surcharge en fer.....	22
I.3.2.1. Introduction.....	22
I.3.2.2. Stratégies thérapeutiques de traitement d'hémochromatose.....	24
I.3.2.3. Hémochromatose et infection mycobactérienne.....	25
Chapitre 2 : Régulation du fer chez les mammifères: rôle de l'axe hepcidine-ferroportine 26	
II.1. Sources de fer pour les mammifères	27
II.2. Métabolisme du fer chez les mammifères	28
II.2.1. L'absorption intestinale du fer.....	28
II.2.2. Distribution du fer chez l'homme.....	29
II.2.3. Recyclage du fer.....	31
II.3. Homéostasie systémique du fer chez les mammifères : rôle de l'axe hepcidine-ferroportine	33
II.3.1. Axe hepcidine-ferroportine.....	33
II.3.2. Régulateurs positifs de l'hepcidine.....	34
II.3.2.1. Régulation par le fer.....	35
II.3.2.1.1. Les protéines bone morphogenetic proteins (BMPs).....	35
II.3.2.1.2. L'interaction HFE-TfR1 et HFE-TfR2.....	36
II.3.2.2. Régulation de l'hepcidine par l'inflammation et l'infection.....	37
II.3.2.3. Interaction et chevauchement entre les voies de signalisation JAK-STAT et BMP-SMAD conduisant à l'expression d'hepcidine.....	37
II.3.3. Régulateurs négatifs de l'hepcidine.....	39
II.3.3.1. Régulation par la matriptase 2.....	40
II.3.3.2. Régulation par l'érythropoïèse.....	40
II.3.3.3. Régulation par l'hypoxie.....	40

II.4. Homéostasie du fer cellulaire par le système IRP/IRE	41
II.5. Régulation de la ferroportine par l'inflammation et l'infection	42
Chapitre 3 : La biologie du macrophage.....	44
III.1. Introduction : la réponse immunitaire.....	44
III.2. Historique et découverte des macrophages	49
III.3. Origine des macrophages	49
III.4. Caractéristiques des macrophages	50
III.5. Rôle du macrophage dans l'immunité innée	51
III.5.1. La « famille » des macrophages M1	51
III.5.1.1. L'IFN- γ :	51
III.5.1.2. Les ligands des TLRs	52
III.5.1.3. Le facteur de croissance granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) :	53
III.5.2. La « famille » des macrophages M2	53
III.5.2.1. TLR :	53
III.5.2.2. L'IL-4 et IL-13	54
III.5.2.3. Les Immunoglobulines G	54
III.5.2.4. IL-10	54
III.5.2.5. Glucocorticoïdes	55
III.5.2.6. M-CSF.....	55
III.5.3. Chevauchement des macrophages M1 avec les macrophages M2	57
III.6. Les macrophages au centre du recrutement des cellules immunitaires.....	58
III.6.1. Association des macrophages M1 avec une réponse Th1	58
III.6.2. Association des macrophages M2 avec une réponse Th2.....	59
III.7. Homéostasie du fer dans les macrophages	60
III.7.1. Acquisition du fer par les macrophages.....	60
III.7.1.1. Le récepteur de la transferrine 1	60
III.7.1.2. Les récepteurs des protéines de l'hème :	61
III.7.1.3. Le récepteur de la lipocaline 2 (24p3R)	62
III.7.1.4. L'erythrophagocytose	62
III.7.1.5. Le ZIP8/14	62
III.7.2. Sortie du fer des organites intracellulaires vers le cytosol.....	62
III.7.2.1. Divalent Metal Transporter 1 (DMT1).....	63
III.7.2.2. Natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1).....	63
III.7.3. Sortie du fer des macrophages par la ferroportine.....	63
III.8. Polarisation des macrophages et statut en fer.....	63
Chapitre 4 : Interactions hôte-pathogènes pour la lutte martiale.....	65
IV.1. Caractéristiques des mycobactéries	66
IV.2. Contexte d'étude d'infection mycobactérienne.....	67
IV.2.1. Historique, prévalence et incidence de la tuberculose.....	67
IV.2.2. Stratégies mondiales de lutte contre la tuberculose	68
IV.2.3. Causes de la tuberculose	68
IV.2.4. Cycle infectieux de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mtb</i>)	69
IV.3. Prévention et traitement de la tuberculose	70
IV.3.1. Historique du vaccin antituberculeux : le BCG.....	70
IV.3.2. Les effets secondaires d'une administration de BCG	71
IV.3.3. Traitement de la tuberculose	72
IV.4. Mécanisme de défense de l'hôte face à une infection mycobactérienne.....	74

IV.4.1. Mise en place de l'immunité innée contre <i>Mtb</i>	74
IV.4.1.1. Phagocytose de <i>Mtb</i>	74
IV.4.1.2. Sensing de <i>Mtb</i> par les TLRs	74
IV.4.2. Immunité adaptative contre <i>Mtb</i>	76
IV.4.3. Evasion de l'immunité innée par <i>Mtb</i>	78
IV.4.4. Evasion de l'immunité adaptative	78
IV.4.5. Immunité nutritionnelle du fer	79
IV.4.5.1. Le fer et la tuberculose	79
IV.4.5.2. Séquestration du fer comme mécanisme de défense inné contre une infection	80
IV.4.5.3. L'hepcidine, « une défensine aigüe »	80
IV.4.5.4. Evasion de l'immunité nutritionnelle de l'hôte par les pathogènes : rôle des sidérophores	81
IV.4.5.4.1. Acquisition du fer non héminique	81
IV.4.5.4.2. Acquisition du fer héminique par <i>M. tuberculosis</i>	83
IV.4.5.4.3. Le stockage du fer par <i>Mycobacterium</i>	84
IV.4.5.4.4. La régulation des sidérophores	84
Deuxième partie : Problématique et Objectifs de thèse	85
Problématique	86
Objectifs visés	86
Troisième partie : Résultats & discussions	88
Chapitre 5 : Résultats	89
V.1. La régulation transcriptionnelle positive de l'hepcidine et négative de la ferroportine par l'inflammation est dépendante de la polarisation des macrophages.	89
V.2. La polarisation des macrophages est associée à un régime en fer	103
V.3. Un régime riche en fer atténue la croissance bactérienne durant une infection à <i>M. bovis</i> BCG	135
V.4. La régulation de l'hepcidine est dépendante de MyD88 en réponse au fer	179
Chapitre 6 : Discussion générale	192
Conclusion générale & perspectives	209
Conclusion générale & perspectives	210
Références bibliographiques	213
Annexes	233

Remerciements

« Le meilleur ami de “merci” est “beaucoup” » Michel Bouthot

Merci 1 : Les Chefs

Je remercie les membres de jury qui m’ont fait l’honneur d’examiner ce travail. Un merci particulier à la présidente du jury, Chantal Pichon, professeur des Universités mais également et surtout ma responsable pédagogique de Master 2. Je tiens à témoigner ma gratitude aux Dr Olivier Loreal et Dr Caroline Demangel qui ont accepté d’examiner et de rapporter mes travaux de thèse à l’école doctorale. Merci également aux Dr Laurent Kremer et Dr François Canonne-Hergaux pour leur disponibilité en tant qu’examineurs de mes travaux de thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont à mes directrices de thèse :

- Catherine : merci du fond de cœur de m’avoir fait découvrir le fer, l’hepcidine, la ferroportine et j’en passe.... Franchement j’ai appris énormément à vos côtés. Merci également pour votre pédagogie, vos suggestions d’idées, orientations et réflexions scientifiques. Bref merci de m’avoir formé !
- Valérie : à chaque fois que je discute avec vous que ce soit dans votre bureau ou lors de mes présentations, j’en sors la tête plus pleine. Merci pour votre aide précieuse dans les corrections du « fameux » manuscrit « IRON BCG » et d’autres.... Je ne vous remercierai jamais assez! Merci également de m’avoir accueilli dans votre laboratoire également.

Un remerciement spécial et particulier à Bernhard. Je me rappelle ce fameux « rendez-vous » du 19/11/2012 où je me présente « naïvement » pour les modalités de mon stage M2 avec Bernhard et je repars avec une vingtaine de publications en format papier sur l’IL-36, l’IL-1, l’inflammation pulmonaire et j’en passe... Merci de m’avoir initié à la recherche car au final c’était ma porte d’entrée à l’INEM que je chéris tant.

Je remercie particulièrement Dieudonnée d’être simplement et toujours présente pour les thésards. Merci de m’avoir montré et initié à la rédaction d’un article scientifique. Merci pour les discussions scientifiques et personnelles. Merci pour tout... Dieudo.

Un merci spécial à nos collaboratrices Irène Garcia et Raffaella Gozzelino pour leurs discussions sur le volet « fer – BCG » de ce manuscrit.

Merci à François (pour des discussions toujours enrichissantes et décontractées !), Isabelle, Stéphane, Marc, Céline, Olivier, Arnaud Menuet, Lekbir

Merci 2 : Les amis et collègues de l'INEM

Au groupe TB team, un grand merci pour les échanges et les entraides durant les nécropsies. Madame Rose ou Stef (au choix !), tu as toujours été là (Merci !!!). A Noria, un thank spécial difficile à évaluer car il tend vers l'infini positif !!! . Merci à Sulaymane Benmerzoug et Fabio Vitarelli pour nos discussions aussi bien au laboratoire mais également pour les moments partagés autour du ballon rond.

Un merci à Manoussa et Ameziane membres du G4 (incluant Noria et moi !). Ameziane merci de faire du bruit à la fenêtre pour me couper de ma concentration et surtout quand j'ai les maux de cou !!! Merci à Manoussa pour nos discussions aux éclats de rire (on se comprend ! Merci encore !!!). Ça fait toujours plaisir de discuter avec vous !

Merci à Flora (ça va ? oui à merveille ! matinal), Isa (pour nos petites discussions pendant les nécropsies papaïne), Pauline (pour les soirées passées dans le pré !), Chloé, Corinne (Coco), les Aurélias, les Florences, Mégane, Amandine, Manon, Jessica, Quentin, Louis, Léa, Bérengère, Fahima, Jennifer, Marie-Laure Bourigault, Ludivine, Justyne, Nathalie avec qui j'ai passé ces 3 années magnifiques.

Je n'oublie pas les collègues et amis chinois ou brésiliens avec qui j'ai eu des échanges constructifs. Merci à Alexandre, Daniele, Maisa Changwei et Qianghui.

Un merci infini aux stagiaires BTS, Licence, Master 1 et Master 2 que j'ai eu à encadrer pendant ma thèse. Annaëlle, Luiz, Justine, Vania, les Meriems, Mélanie, Corentin, Charlyne, Marine, et Fabien, merci à vous encore je ne vous remercierai jamais assez !

Je remercie également mes voisins sympas du bureau « close space » Marie-Laure Dessin et Laurent Dhemine pour la sympathie et leur bonne humeur au quotidien!

Merci à David Gosset et à la plateforme P@cific pour les jolies photos des cellules.

Merci également à Arnaud Paris, David Laurenceau, Géraldine, Vanessa, Caroline, Nadège, Anne, Atif, O. Voisin, Abdel, Amezine Cherfouh pour nos petites salutations suivies potentiellement d'échanges aussi sympas !

Merci à tous les autres personnels du TAAM (Nadya, Severine, Alex, Jerome et autres) ; merci à la « dame de cantine » avec des échanges toujours cordiales.

Merci 3 : Les proches et la famille

Merci à Djalil pour tout ! Un merci particulier à Amal pour tes encouragements et l'écoute que tu as toujours eu envers moi, merci également à Serena, Grâce, Ophélie et Aurore pour les moments partagés plus ou moins longs durant ces 3 années (c'était super nos collaborations !)

Merci à Iulia, Amra, Daniella, Aurore pour les petits mots et gestes d'encouragements.

Merci au grand frère Idrissou Biya Kolou pour son soutien!!!

Merci à mes collaborateurs du projet ATM Kenneth, Soulemane, Cissé, Chérif et Ado.

Merci à Biga, Gbossi Chamsou pour nos petites virées !!!

Je remercie également mes collègues de Master 2 qui ont toujours été sympas et qui le seront toujours !!! (Amandine, Aline, Amine, Anthony et tous les autres)

A mes parents et ma chère famille toujours aussi bienveillante envers moi, je vous dédie ce travail ! Merci pour tout ! Merci à Papa et Maman de m'avoir inculqué ces valeurs initiales éducatives qui m'ont permis de tenir le coup et d'affronter ce projet de thèse. Merci aux sœurs magnifiques et super cool... j'ai eu la chance de vous avoir ! Merci pour les appels particuliers quotidiens. A mon seul et unique ptit frère, j'espère que tu feras mieux que moi.

Merci à tous ceux que je n'ai pas pu citer ici !!!

A vous tous merci beaucoup !!!

Contributions scientifiques

Articles publiés

1. Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization

(Blood Cells, Molecules and Diseases <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2016.07.006>)

Rafiou Agoro, Catherine Mura

2. IL-1R1-MyD88 axis elicits papain-induced lung inflammation

(European Journal of Immunology <http://dx.doi:10.1002/eji.201646366>)

Rafiou Agoro, Julie Piotet-Morin, Jennifer Palomo, Chloé Michaudel, Solenne Vigne, Isabelle Maillet, Pauline Chenuet, Noëlline Guillou, Jessica Le Bérichel, Malgorzata Kisielow, Marc Le Bert, Valérie Quesniaux, Matthias Muller, Franco Di Padova, Bernhard Ryffel, Cem Gabay and Aurélie Couturier-Maillard

Article soumis

1. Iron-rich diet decreases mycobacterial burden and correlates with hepcidin upregulation, lower pro-inflammatory mediators and higher T cell recruitment

Rafiou Agoro, Stéphanie Rose, Raffaella Gozzelino, Irène Garçia, Bernhard Ryffel, Valerie F. J. Quesniaux and Catherine Mura

Soumis à The Journal of Infectious Diseases

Articles en préparation

1. Cell iron status modulates macrophage polarization

Rafiou Agoro, Valerie F. J. Quesniaux and Catherine Mura

Manuscrit en préparation

2. MyD88 dependent regulation of hepcidin

Rafiou Agoro, Bernhard Ryffel, Valerie F. J. Quesniaux and Catherine Mura

Manuscrit en préparation

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Teneur des éléments majeurs et des oligo-éléments dans le corps humain (en g/Kg)</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 2 : Différents types d'hémochromatoses</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 3 : Apports nutritionnels recommandés par la FAO et l'OMS pour divers sous-groupes de population</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 4 : Répartition du fer dans l'organisme</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 5 : Nomenclature des macrophages en fonction de leur localisation anatomique.....</i>	<i>50</i>

Liste des figures

Figure 1 : Générations des espèces réactives oxygénées impliquant le fer.	18
Figure 2 : Représentation schématique du statut en fer de l'organisme en fonction de pathologies caractéristiques.	21
Figure 3 : Mécanisme d'absorption du fer chez l'homme.	29
Figure 4 : Distribution du fer dans l'organisme.	30
Figure 5 : Acquisition et recyclage du fer.	32
Figure 6 : Structure de l'hepcidine.	34
Figure 7 : Schéma récapitulatif des différentes voies de régulation de l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes.	39
Figure 8 : Régulation post-transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme du fer par le système IRP/IRE.	42
Figure 9 : Différenciation des cellules sanguines à partir des cellules souches multipotentes.	48
Figure 10 : Schéma des voies de signalisation résultant de l'interaction LPS-TLR4.	52
Figure 11 : Récapitulatif des principaux stimuli et voies de signalisations intracellulaires intervenant dans la polarisation des macrophages.	56
Figure 12 : Représentation phénotypique des macrophages M1, M2a, M2b, M2c et M2a + M2c.	57
Figure 13 : Mobilisation des lymphocytes Th1 par les macrophages M1.	58
Figure 14 : Mobilisation des cellules immunitaires impliquées dans la réponse Th2 par les macrophages M2.	59
Figure 15 : Mécanisme d'internalisation de l'holotransferrine.	61
Figure 16 : Mécanisme d'acquisition du fer hémérique.	61
Figure 17 : Caractéristiques phénotypiques des macrophages M1 et M2 en fonction des marqueurs du métabolisme du fer.	64
Figure 18 : Schéma montrant les molécules impliquées dans la formation de la paroi mycobactérienne.	66
Figure 19 : Cycle de Mtb.	69
Figure 20 : Structure et constituants cellulaires d'un granulome tuberculeux.	70
Figure 21 : Récapitulatif des différentes étapes stratégiques mises en place dans la lutte contre la tuberculose.	73
Figure 22 : Interactions ligands mycobactériens et TLRs de l'hôte, et voies de signalisations intracellulaires.	75
Figure 23 : Interaction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dans les cellules phagocytaires de Mtb.	77
Figure 24 : Structure des sidérophores des mycobactéries pathogènes.	82
Figure 25 : Mécanisme d'acquisition du fer par Mtb via la carboxymycobactine.	83
Figure 26 : Schéma résumant les stimuli et les inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaires décrits dans l'article I.	193
Figure 27 : Conséquences fonctionnelles du métabolisme de la L-arginine.	194
Figure 28 : Profil métabolique des macrophages M1 (gauche) et M2 (droite)	196
Figure 29 : Comparaison phénotypique des macrophages M1, M2 et Mox.	199
Figure 30 : Estimation de la localisation du phénotype des macrophages M(Fe) en fonction des macrophages M1, M2 et Mox.	201
Figure 31 : Représentation schématique d'une cellule montrant les TLRs et des récepteurs IL-1R1 et ST2 (IL-33R).	204

Liste des abréviations

AP-1, Activator protein 1	HLA, human leukocyte antigen	oxPAPC, oxidised 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn 3-phosphorylcholine
APC, antigen-presenting cell	HO, haem oxygenase	Pam ₃ CSK ₄ , triacylated lipopeptide
APP, Acute Phase Protein	HRG1, Heme-Responsive Gene Protein 1	Pam3CysSerLys4
Araf, Arabinose; Galf, Galactose;	IdeR, Iron-dependent regulator	PAMP, pathogen-associated molecular Patterns
Arg, Arginase	IFNGR, interferon	PCBP, poly(rC) binding protein
BAAR, bacilles acido-alcoolrésistantes	IKK, IκB kinase	PDIM, phthiocerol dimycocerosate
BfrB, Bacterioferritin B	IL-1R1, Interleukin 1 receptor 1;	PGE2, prostaglandine E2
BMDC, bone marrow-derived dendritic cells;	IL-1RL1, Interleukin 1 receptor-like 1	PGL, phenolic glycolipid
BMDM, bone marrow-derived macrophages;	ImQ, imiquimod	PGN, Peptidoglycan
Bmp, bone morphogenetic protein;	Inhbb, inhibin b;	PI3K, phosphoinositide 3-kinase
BMPR, Bone morphogenic protein receptor	iNOS, inducible nitric oxide synthase	PIM, Phosphatidyl Inositol Mannoside;
CCL, CC chemokine ligands	IRAK, IL-1R-associated kinase	PknG, protéine kinase G
CD: cluster of differentiation	IRE, iron responsive elements	poly(I:C), double strand poly(I:C)
CLR, C lectin receptors	IRF, interferon regulatory transcription factor	PRR, pattern recognition receptors
cMB, carboxymycobactin	JNK, c-Jun N-terminal kinase	R848, resiquimod
CpG, dinucléotide CpG-ODN,	LAM, LipoArabinoMannan;	RIG récepteurs d'hélicase
CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand	LDL, low density lipoprotein	ROS, <i>reactive oxygen species</i>
DAMP, danger associated molecular pattern	LM, LipoMannan;	SLC, solute carrier
Dcyb, duodenal cytochrome b	LPS, lipopolysaccharide	SMAD, mothers against decapentaplegic homolog
DMT, divalent metal transporter	MA, Mycolic Acid;	STAT, Signal transducer and activator of transcription
DTH, delayed hypersensitivity reaction,	mAGP, complexe mycolyl Arabino Galactan-Peptidoglycan;	STEAP3, Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3
EPO, érythropoïétine	ManP, Mannose	TBK, TANK-binding kinase
ERFE, érythroferrone	MAPK, mitogen-activated protein kinases	TfR, transferrin receptor
FAC, ferric ammonium citrate	MhuD, Mycobacterium heme utilization degrader	TGF-β, tumor growth factor β
FAD, flavine adénine dinucléotide	MKK, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase	TIRAP, Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein
FAO, organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture	MmpL, Mycobacterial membrane protein Large	TLR, toll-like receptor
FCγR, Fcγ receptors	MmpS, mycobacterial membrane protein small	TMPRSS6, transmembrane protease, serine 6
Fe ²⁺ , fer ferreux	MyD88, Myeloid differentiation primary response gene 88,	TRAF, tumor necrosis factor receptor associated factor
Fe ³⁺ , fer ferrique	NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	TRAM, TRIF-related adaptor molecule
Fe-S, clusters fer-soufre	NK, natural killer	TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
Fpn, ferroportin	NO, nitric oxide	TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β;
FtH, ferritin H	Nramp, Natural resistance-associated macrophage	TWSG, twisted gastrulation BMP signalling modulator
GCR, glucocorticoid receptor	NTBI, Non-transferrin-bound serum iron	UTR, untranslated regions
GDF, growth differentiation factors	O ₂ ⁻ , anion superoxyde	VHL/HIF, von Hippel-Lindau/hypoxia-inducible transcription factor
GFP, Green Fluorescent Protein	OH·, radical hydroxyl	ym, chitinase
GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor	OMD, objectifs du millénaire pour le	ZIP: ZRT IRT-like Protein
H ₂ O ₂ , peroxyde d'hydrogène	OMS, Organisation Mondiale de la Santé	
Hamp, hepcidin antimicrobial peptide		
HCP, Haem Carrier Protein		
HFE, High Fer		
HIF, hypoxia-inducible factor		
HJV, Hemojuvelin		

Préambule

Préambule

Depuis toujours, l'être humain fait face aux maladies infectieuses engendrées par différents pathogènes comme les bactéries, les champignons, les virus, ... Une partie de l'histoire de l'homme s'est toujours consacrée à la recherche de solutions thérapeutiques, de moyens de protection et à la compréhension du mode de contamination, intra-espèces ou inter-espèces, et d'action des pathogènes. L'objectif de toutes ces investigations vise à assurer la survie de l'espèce humaine. La variabilité naturelle permet aux pathogènes de s'adapter pour survivre face à la menace d'extinction de leurs espèces. Elle permet l'émergence de nouvelles souches pathogènes, et à l'occasion, le franchissement de la barrière des espèces, ou l'apparition d'une dysbiose. L'homme a ainsi été récemment exposé à des virus tels que Zika en Amérique latine alors qu'initialement présent en Asie et en Afrique et le virus Ebola réapparu en Afrique de l'Ouest faisant plus de 11000 morts en 3 ans selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). L'émergence de souches bactériennes résistantes voire multi-résistantes aux antibiotiques et l'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance par les bactéries posent problème, ainsi *Mycobacterium tuberculosis* qui a fait près de 3 morts par minute en 2015 partage ainsi le podium malheureux de la maladie infectieuse la plus mortelle avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)/sida. Même si des antibiotiques (la rifampicine et l'isoniazide) existent contre la tuberculose, de nouvelles souches résistantes de mycobactéries pathogènes émergentes compliquent notre lutte contre cette maladie.

Un arsenal de moyens de défenses naturels s'est développé chez les mammifères. En effet, les agents pathogènes sont attaqués sur tous les fronts, ainsi la phagocytose, la sécrétion de molécules bactéricides (peptides antimicrobiens, espèces réactives oxygénées,...), et la déplétion nutritive représentent autant de mécanismes mis en œuvre. Dans ce contexte l'accès au fer, oligo-élément primordial pour les processus métaboliques de l'hôte mais également pour la survie et la croissance des pathogènes, représente une arme non négligeable. Au début des années 2000 la découverte du mécanisme de régulation de l'homéostasie systémique du fer a représenté une petite révolution, mais a aussi mis en lumière sa part intrinsèque dans la défense immune de l'hôte. Ce mécanisme se trouve définitivement ancré dans l'arsenal de défense de l'hôte. Chez les mammifères, la source indispensable de fer se trouve dans l'alimentation et son

absorption est régulée par le couple hormone hepcidine – transporteur ferroportine évitant ainsi un excès de fer dans l'organisme. Cette hormone aussi classée comme un peptide antimicrobien est surexprimée en cas d'inflammation. Ainsi un nouvel axe d'investigation scientifique sur la compréhension des mécanismes d'interaction entre l'homéostasie du fer et l'immunité a émergé naturellement. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cet axe de recherche afin d'apporter quelques chaînons manquants.

Mes objectifs de thèse peuvent être divisés en deux parties :

-Une partie consiste à améliorer nos connaissances du mécanisme de régulation de l'axe hepcidine – ferroportine en condition inflammatoire.

- Une deuxième partie de recherche est orientée vers l'étude du rôle du fer en réponse à une infection mycobactérienne.

Première partie : Etat de l'art

Chapitre 1 : Le fer et le vivant

I.1. Le fer: élément chimique à double-jeu

Le fer est le métal de transition le plus abondant sur terre. Les métaux de transition possèdent une configuration atomique particulière avec une couche électronique partiellement remplie, ainsi ils peuvent former des ions et ont de multiples degrés d'oxydation. Le fer appartient aux métaux non-nobles, ceux qui s'oxydent « **facilement** » à l'air libre.

Les métaux de transition sont également des constituants essentiels du vivant, ce sont des **oligo-éléments**. Les oligo-éléments sont des substances de nature minérale présentes à de faibles teneurs dans les organismes vivants (**Tableau 1**).

*Tableau 1 : Teneur des éléments majeurs et des oligo-éléments dans le corps humain (en g/Kg)
(d'après Schröder (Schroeder, 2004))*

Eléments majeurs (g/kg)		Oligo-éléments (g/kg)	
Oxygène	624.3	Fer	0.06
Carbone	211.5	Fluor	0.037
Hydrogène	98.6	Zinc	0.033
Azote	31	Rubidium	0.0046
Calcium	19	Strontium	0.0046
Phosphore	9.5	Brome	0.0029
Potassium	2.3	Cuivre	0.001
Soufre	1.6	Vanadium	0.0003
Chlore	0.8	Sélénium	0.0002
Sodium	0.8	Manganèse	0.0002
Magnésium	0.27	Iode	0.0002
		Molybdène	0.0001
		Nickel	0.0001
		Chrome	0.00002
		Cobalt	0.00002
		Uranium	0.000001
		Beryllium	0.0000003

Le fer est nécessaire à toute forme de vie sur terre du fait de ses propriétés de fixation de l'oxygène et d'oxydo-réduction. Dans les organismes vivants, le fer est utilisé essentiellement comme cofacteur associé à des protéines, les métalloprotéines, pour assurer le transport d'oxygène, la fixation de substrat (comme l'azote), la catalyse (comme la synthèse d'ADN), le transfert d'électrons, ou la configuration structurale tertiaire et quaternaire de protéines (Abbaspour *et al.*, 2014). Dans le règne animal, végétal et des microorganismes, les clusters fer-soufre (Fe-S) constituent également des cofacteurs inorganiques impliqués dans de nombreux processus cellulaires (Mettert and Kiley, 2015). Les clusters de fer sont composés de combinaisons variables de fer avec des atomes de soufre formant des structures rhombiques (2Fe-2S) ou cubiques (4Fe-4S), capables de céder ou d'accepter un électron facilitant ainsi des réactions d'oxydo-réduction (Rouault, 2015).

A l'état libre, le fer est retrouvé principalement sous deux formes: la forme oxydée (ferrique Fe^{3+}) et la forme réduite (ferreux Fe^{2+}). L'importance biologique du fer réside dans sa capacité à naviguer entre ces deux états d'oxydation: la forme ferreuse soluble et la forme ferrique insoluble. Le fer peut ainsi être un accepteur ou un donneur d'électrons dans des processus chimiques d'oxydo-réduction. Ce potentiel redox du fer produit des espèces réactives oxygénées qui peuvent générer des conséquences irréversibles comme la mort cellulaire. En effet, à l'échelle cellulaire, en présence d'espèces réactives oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène, le fer catalyse la réaction de Fenton (**Figure 1**) générant ainsi des radicaux oxygénés comme le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) qui contribuent à l'endommagement des lipides et des protéines cellulaires, mais aussi de l'ADN. Ainsi, la présence trop importante de clusters fer-soufre, dont la synthèse est directement liée au taux de fer présent dans l'organisme, peut conduire à des dommages cellulaires par l'intermédiaire de la production d'espèces réactives oxygénées (Mettert and Kiley, 2015).

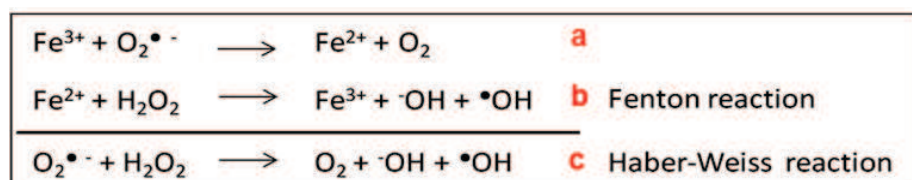


Figure 1 : Générations des espèces réactives oxygénées impliquant le fer.

Le fer ferrique (Fe^{3+}) en présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) génère le fer ferreux (Fe^{2+}) et l'oxygène stable (a). En présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le fer ferreux génère le fer ferrique, l'anion hydroxyle et le radical hydroxyle ; cette réaction est aussi appelée la réaction de Fenton (b). La combinaison des réactions a et b aboutit à la réaction de Haber-Weiss (c).

I.2. Le fer dans les organismes vivants

Le Fe^{3+} est insoluble, abondant tandis que le Fe^{2+} est soluble, rare dans les organismes vivants. En condition physiologique, le fer retrouvé sous forme libre est rare. En effet, le fer est faiblement soluble à pH physiologique, particulièrement quand il est sous la forme oxydée (Fe^{3+}) ; de ce fait, les organismes vivants produisent de nombreuses protéines destinées au transport ou au stockage du fer. Cette stratégie de fixation du fer assure une modulation rapide de la biodisponibilité du fer et prévient des effets toxiques du fer.

I.2.1. Importance du fer pour la croissance des pathogènes

Le fer est indispensable pour la croissance de tous les pathogènes à l'exception de *Borrelia burgdorferi* qui est capable d'utiliser le manganèse à la place du fer, attribuant ainsi à cette bactérie une résistance particulière durant l'infection (Aguirre *et al.*, 2013; Drakesmith and Prentice, 2012). L'acquisition du fer par le pathogène et la séquestration du fer par l'hôte suite à une infection reflètent une coévolution de l'hôte et des pathogènes dans la mise en place de ces mécanismes (Sheldon *et al.*, 2016). Un des défis majeurs des pathogènes durant une infection reste un accès au fer à une concentration nécessaire pour assurer leur croissance. Chez les mammifères, la concentration physiologique du fer est estimée entre 10^{-8} et 10^{-9} M, ce qui reste en dessous du seuil de concentration de fer nécessaire à la croissance des pathogènes estimé à 10^{-6} M. De plus, les mécanismes de séquestration du fer existent chez l'hôte pour réduire le fer biodisponible jusqu'à 10^{-18} M (pour revue (Rodriguez and Neyrolles, 2014)).

I.2.2. Importance du fer pour la croissance des mammifères

Chez les mammifères le fer est majoritairement retrouvé sous forme d'hémoprotéine, structure aromatique appelée porphyrine contenant un atome de fer. Ainsi, l'hémoglobine nécessaire à la production des globules rouges, produite dans le cytoplasme des érythroblastes de la moelle osseuse et qui joue le rôle de transporteur d'oxygène dans la circulation sanguine contient 80% du fer de l'organisme (soit ~ 25 mg/jour nécessaire à la production des globules rouges). Le fer est également requis pour la synthèse de nombreuses autres hémoprotéines, comme la myoglobine qui transporte l'oxygène dans le cytoplasme des cellules, les cytochromes P-450, enzymes importantes du métabolisme oxydatif impliqué en particulier dans

les processus de respiration cellulaire, le fer est aussi présent comme cofacteur de nombreuses autres enzymes nécessaires par exemple à la synthèse de l'ADN (Zhang, 2014).

La capacité à réagir avec l'oxygène place le fer au centre des situations de stress oxydatif, cette réactivité le rend particulièrement dangereux pour les constituants cellulaires lorsqu'il n'est pas parfaitement pris en charge ou lorsqu'il est présent en excès. Ainsi, chez les mammifères le fer est retrouvé rarement sous forme libre. En effet, dans la circulation sanguine le fer est pris en charge par la transferrine appelée également sidérophiline pour son affinité au fer. A l'échelle intracellulaire, le fer est lié à la ferritine capable de fixer jusqu'à 4500 atomes de fer chez les mammifères (Chiancone *et al.*, 2004).

Par ailleurs, une régulation fine s'impose afin d'assurer les besoins du fer de l'organisme et éviter ses effets délétères. En condition physiologique, le taux de fer est contrôlé par l'absorption de fer alimentaire qui répond ainsi aux pertes de fer et au taux d'érythropoïèse.

I.3. Pathologies liées au fer chez les mammifères

Le statut en fer des mammifères associé à des pathologies peut être défini et considéré comme un continuum allant de :

- Une déficience en fer avec une anémie,
- Une déficience en fer sans anémie,
- Un statut en fer normal avec des variations de concentrations au niveau du stock de fer,
- Et finalement une surcharge de fer qui peut causer des dommages au niveau des organes dans les formes sévères.

La rupture de l'homéostasie du fer est impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'anémie et les maladies liées à une surcharge en fer tissulaire. De nouvelles études suggèrent aussi des liens entre l'âge, l'accumulation du fer tissulaire et la sévérité des pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives ou une susceptibilité aux infections (**Figure 2**)

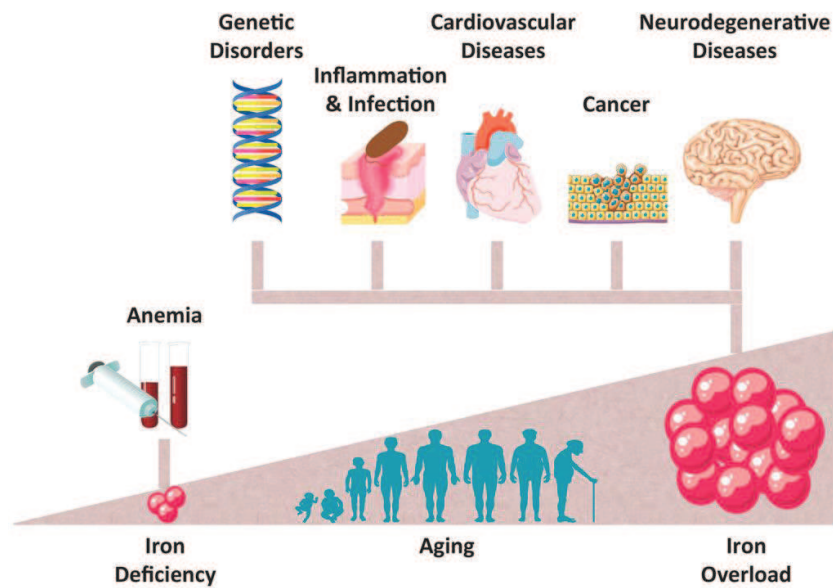


Figure 2 : Représentation schématique du statut en fer de l'organisme en fonction de pathologies caractéristiques. (Gozzelino and Arosio, 2016)

I.3.1. La déficience en fer: l'anémie

I.3.1.1 Introduction

La déficience en fer résulte d'un profond déficit en fer caractérisée par un épuisement progressif du stock du fer (WHO, 2001). Elle se produit sous deux formes principales: une déficience en fer absolue et une déficience en fer fonctionnelle. La forme de déficience en fer absolue intervient lorsque le stock total du fer est faible ou épuisé. La déficience en fer fonctionnelle est une pathologie au cours de laquelle la quantité totale de fer reste normale mais un apport du fer dans la moelle osseuse reste insuffisant ce qui conduit à un défaut dans le processus d'érythropoïèse (Lopez *et al.*, 2016).

La déficience en fer, principale cause d'anémie (Kassebaum *et al.*, 2014) a été identifiée par l'OMS comme la déficience nutritionnelle la plus répandue dans le monde. Dans les pays en développement, elle touche plus les femmes et les enfants; de plus c'est la première forme de carence en nutriments dans les pays industrialisés. Actuellement, plus d'un milliard de personnes dans le monde sont affectés par cette déficience (WHO, 2001).

I.3.1.2. Facteurs de risque et traitement de l'anémie

L'anémie comme évoqué précédemment est une déficience en fer qui peut être due à plusieurs facteurs. Elle peut résulter d'une absorption faible du fer par rapport aux exigences nécessaires pour un bon fonctionnement de l'organisme. D'autres composants alimentaires affectent directement la biodisponibilité du fer dans l'organisme. Ainsi les phytates (retrouvés dans les céréales et les légumes), les polyphénols (retrouvés dans les légumes, les fruits, certaines céréales et légumes, le thé, le café et le vin), le calcium, et les protéines inhibent l'absorption du fer. Par contre l'acide ascorbique ou la vitamine C (présente dans les agrumes tels que l'orange, le citron et le pamplemousse) augmentent l'absorption intestinale du fer (Hurrell and Egli, 2010). En condition anémique, un régime spécifique riche en fer associé à une prise de la vitamine C permettrait d'ajuster ou de rétablir le niveau de fer. De plus une consommation plus importante du fer pendant l'enfance réduit significativement le risque d'anémie chez les adultes. Chez la femme enceinte, une prise de suppléments riche en fer pendant la grossesse prévient l'anémie induit par les pertes sanguines pendant l'accouchement. L'anémie peut également résulter de pertes sanguines, on parle d'anémie ferriprive, ou d'inflammation chronique, on parle dans ce cas d'anémie inflammatoire.

I.3.1.3. Résistance/susceptibilité à l'infection

Il a été montré que la morbidité issue des maladies infectieuses est accrue dans des populations en condition de déficience en fer, à cause en particulier des effets de la déficience en fer sur le système immunitaire. Dans ces conditions, les leucocytes ont une capacité diminuée de destruction des microorganismes ingérés. D'autre part, la prolifération des lymphocytes est réduite en condition de déficience en fer (Lo, 2016; Seligman *et al.*, 1992). Ainsi, une supplémentation en fer et une fortification du fer dans le lait et les céréales ont été rapportées comme des facteurs contribuant à réduire la morbidité issue des maladies infectieuses (Enwonwu, 1990).

I.3.2. L'hémochromatose: la surcharge en fer

I.3.2.1. Introduction

L'hémochromatose définit une accumulation de fer dans l'organisme. Deux formes principales d'hémochromatose ont été décrites: les hémochromatoses primaires ou héréditaires

et les hémochromatoses secondaires (**Tableau 2**). L'hémochromatose primaire ou héréditaire est caractérisée par des mutations au niveau des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer comme *HFE* (High Fer), le *HJV* (Hemojuvelin), l'hepcidine, le récepteur de la transferrine et la ferroportine. Ces lésions génétiques déstabilisent ainsi toute l'homéostasie du fer (Camaschella and Poggiali, 2011). Chez les individus affectés le contrôle de l'absorption du fer alimentaire n'est plus assuré, les entérocytes et les macrophages libèrent des quantités excessives de fer dans le plasma entraînant une saturation de la transferrine supérieure à la normale physiologique (20-45%). La saturation de la transferrine dans le cas d'hémochromatose héréditaire qui peut être supérieure à 80% est associée à une présence plus importante du fer non lié à la transferrine (Non-transferrin-bound serum iron, NTBI). Ce dernier peut être pris en charge par les hépatocytes et les cardiomyocytes par l'intermédiaire des transporteurs alternatifs de fer « ZRT IRT-like Protein 14 » (ZIP14 ou SLC39A14) (Pinilla-Tenas *et al.*, 2011) provoquant ainsi des surcharges en fer tissulaire.

Avec une fréquence comprise entre 1/200 et 1/300, l'hémochromatose est la maladie génétique héréditaire la plus fréquente rencontrée dans les populations du Nord de l'Europe (Merryweather-Clarke *et al.*, 1998). Plusieurs mutations génétiques peuvent conduire aux symptômes cliniques de l'hémochromatose (**Tableau 2**). La plus importante parmi elle est la mutation Cys282Tyr sur le gène *HFE* qui est responsable de la majorité des cas d'hémochromatose. Les individus homozygotes pour ce défaut génétique développent une surcharge en fer caractérisée par un dépôt du fer majoritairement dans les hépatocytes, puis les autres tissus, ce qui entraîne diverses conséquences cliniques comme la fibrose et cirrhose hépatique, le diabète, et des perturbations endocriniennes. Les hommes sont plus fréquemment atteints par cette pathologie, car les femmes sont protégées par la perte de fer physiologique durant les menstruations et les grossesses.

Les hémochromatoses secondaires ou acquises quant à elles sont caractérisées par des comportements à risques conduisant à une surcharge en fer progressive au cours de la vie comme une consommation d'alcool (**Tableau 2**). La surcharge en fer connue sous le nom « African Iron Overload » est une forme de surcharge en fer connue pour affecter les populations d'Afrique Subsaharienne. Dans cette forme de surcharge en fer, le dépôt du fer au niveau hépatique se fait dans les hépatocytes et les macrophages et les conséquences cliniques sont une fibrose et une cirrhose hépatique. Il a été suggéré que cette forme de surcharge en fer soit due à la consommation de bière traditionnelle contenant du fer dissous à partir des fûts métalliques dans lesquels elle est brassée. (Kasvosve *et al.*, 2000). Cependant, il a été montré en 2003 que

la mutation Q248H de la ferroportine 1 pourrait être associée à cette forme de surcharge de fer (Gordeuk *et al.*, 2003). Des pathologies génétiques, comme la α -thalassémie, peuvent aussi conduire secondairement à une surcharge en fer.

Tableau 2 : Différents types d'hémochromatoses

Hémochromatoses primaires
Hémochromatose <i>HFE</i> – dépendant (Type I) <ul style="list-style-type: none"> • Type 1a : Mutation Cys282Tyr (homozygotie) • Type 1b: Mutation Cys282Tyr et His63Asp (hétérozygotie) • Type 1c : Mutation Ser65Cys : autre mutation <i>HFE</i> • Autres mutations ponctuelles du gène <i>HFE</i>
Hémochromatose <i>HFE</i> – indépendant (Type II) <ul style="list-style-type: none"> • Type 2a : Mutations sur le gène <i>HJV</i> (hémoujuveline) • Type 2b : Mutations sur le gène hepcidine
Hémochromatose Type III <ul style="list-style-type: none"> • Mutations sur le gène du récepteur de la transferrine 2 (<i>TfR2</i>)
Hémochromatose Type IV <ul style="list-style-type: none"> • Mutations sur le gène de la ferroportine
Hémochromatoses secondaires (acquises)
<ul style="list-style-type: none"> • Maladies alcooliques du foie : hépatite chronique du foie • Maladies du sang : β-thalassémie

I.3.2.2. Stratégies thérapeutiques de traitement d'hémochromatose

Le traitement de l'hémochromatose revient à diminuer le taux de fer circulant dans l'objectif d'épuiser le stock de fer et donc de réduire les effets liés au dépôt du fer dans les différents organes. Cliniquement, il consiste en général à pratiquer des soustractions sanguines hebdomadaires de 400 à 500 ml en moyenne, durant 1 à 2 ans en fonction de la surcharge en fer suivi d'un traitement d'entretien dans l'objectif d'éviter une ré-accumulation du fer.

I.3.2.3. Hémochromatose et infection mycobactérienne

Les conséquences de l'hémochromatose sur la croissance mycobactérienne restent controversées. Des études *in vitro* réalisées sur les macrophages issus des patients atteints d'hémochromatose (homozygotie pour C282Y) montrent une capacité réduite d'acquisition du fer et une croissance bactérienne diminuée de 50% en comparaison aux macrophages issus des individus normaux (Olayanmi *et al.*, 2002; Olayanmi *et al.*, 2007). Des modèles cellulaires de diminution de la concentration de fer intramacrophagique *via* une surexpression de la ferroportine au niveau des macrophages suggèrent une hypothèse selon laquelle une concentration faible de fer intramacrophagique serait associée à une résistance de l'hôte aux pathogènes intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis* (Johnson *et al.*, 2010). Par ailleurs, une étude *in vivo* a montré qu'un défaut d'expression de la molécule HFE en utilisant indirectement les souris β -2 microglobuline déficientes induit une susceptibilité à l'infection (Schaible *et al.*, 2002).

Chapitre 2 : Régulation du fer chez les mammifères: rôle de l'axe hepcidine-ferroportine

Le fer comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent joue de multiples rôles vitaux chez les mammifères. Il existe un mécanisme de régulation de l'homéostasie systémique du fer et un mécanisme de régulation de l'homéostasie du fer intracellulaire. Le mécanisme d'homéostasie du fer intracellulaire a été bien décrit dans les années 1970-1980, et suffisait à expliquer à l'époque l'homéostasie du fer. Le mécanisme de régulation de l'homéostasie systémique du fer a quant à lui commencé à être décrypté au début des années 2000 avec la découverte de l'hepcidine. L'implication du gène *HFE* codant une molécule apparentée au CMH de classe I et de l'hepcidine comme peptide antimicrobien, a mis en lumière une relation insoupçonnée entre l'homéostasie du fer et le système immunitaire. L'hepcidine, peptide antimicrobien, joue un rôle d'hormone au niveau systémique qui permet de régler le tempo de sortie du fer par la ferroportine, seul exporteur du fer connu à ce jour. De plus, de multiples voies permettent de réguler le taux d'expression de l'hepcidine et de la ferroportine, en fonction du fer et de l'inflammation. La découverte de ce mécanisme a ouvert un nouveau champ d'investigation, et de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de défense chez les mammifères.

II.1. Sources de fer pour les mammifères

L'alimentation reste la seule source de fer pour les mammifères en condition physiologique normale. La teneur en fer varie en fonction de la nature des aliments. En effet les produits carnés constituent une source importante de fer comme le boudin noir, le foie, les rognons et la viande rouge. Le fer est également retrouvé en quantité considérable dans les produits de la mer (les coquillages et les poissons), le chocolat, le germe de blé, les charcuteries, les œufs et certains aliments enrichis comme les céréales de petit-déjeuner. La qualité d'absorption du fer dépend de la nature de l'aliment. Ainsi, le fer contenu dans les produits carnés est 2,5 fois plus assimilable que le fer retrouvé dans les produits végétaux et les produits laitiers. Par ailleurs, la consommation simultanée de la viande et de végétaux riches en vitamine C (agrumes, kiwi, fruits rouges et le chou) permet d'améliorer l'assimilation du fer d'origine végétale. Pour un régime riche en vitamine C et en protéines animales, la biodisponibilité du fer est de 15%; de 10% pour un régime riche en céréales et en vitamine C et de 5% pour un régime pauvre en protéines animales et en vitamine C (WHO, 2004) (**Tableau 3**). Dans les aliments que nous consommons quotidiennement, le fer est présent sous deux formes: hémique et non hémique. Le fer hémique se trouve dans le sang et dans les protéines qui contiennent le groupe hème. Le fer est aussi présent dans les mitochondries de toutes cellules utilisant l'oxygène pour la respiration. Les apports nutritionnels journaliers du fer recommandé par l'OMS et la FAO sont récapitulés dans le tableau ci-dessous. Ces recommandations montrent que comme tout élément nutritif, l'apport exigé en fer varie en fonction de l'âge et de la situation physiologique. Globalement les besoins en fer augmentent avec l'âge et les femmes présentent des demandes beaucoup plus importantes que l'homme dues aux pertes de fer occasionnées durant les menstruations (Hurrell and Egli, 2010; Petry et al., 2010).

Tableau 3 : Apports nutritionnels recommandés par la FAO et l'OMS pour divers sous-groupes de population

Fer (mg)	Enfants 1 – 3 ans	Enfants 4 – 6 ans	Femmes 19 – 50 ans	Femmes enceintes (2^{ème} trimestre)	Femmes allaitantes 0 – 3 mois	Hommes 19 – 50 ans
Biod 15%	3.9	4.2	19.6	> 50	10.0	9.1
Biod 10%	5.8	6.3	29.4	> 50	15.0	13.7
Biod 5%	11.6	12.6	58.8	> 50	30.0	27.4

II.2. Métabolisme du fer chez les mammifères

II.2.1. L'absorption intestinale du fer

Chez les mammifères, le fer présent dans l'alimentation est absorbé au niveau du tube proximal du duodénum. La quantité de fer absorbée est fonction du stock du fer disponible dans l'organisme et correspond à la perte de fer, ainsi seul 1 – 2 mg des 4000 – 5000 mg du fer total de l'organisme sont absorbés quotidiennement (Nathan *et al.*, 2003). L'élimination de fer de l'organisme reste limitée chez les mammifères, il n'existe pas de mécanisme d'excrétion du fer, et une faible quantité de fer est perdue lors du processus de desquamation et du renouvellement cellulaire des entérocytes, de saignements, auquel se rajoute celle issue de menstruation chez les femmes. Le fer non héminique et le fer lié à l'hème peuvent être absorbés au niveau du pôle apical des villosités du duodénum.

La forme ferrique non héminique du fer présente dans l'alimentation est transformée dans un premier temps en fer ferreux (Fe^{2+}) par les réductases ferriques: le cytochrome b duodenal (Dcytb). La forme réduite du fer peut ainsi traverser la membrane du duodénum pour entrer dans les entérocytes *via* le transporteur « Divalent metal transporter -1 » (DMT-1) aussi connu sous le nom de « Natural resistance-associated macrophage 2 » (NRAMP2) (**Figure 3**).

Le fer héminique est retrouvé principalement dans l'alimentation d'origine animale comme la viande rouge. Au niveau des entérocytes duodénaux, l'hème passe la membrane grâce au transporteur « Haem carrier protein 1 » (HCP1) pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Par la suite intervient une dégradation de l'hème par l'hème oxygénase conduisant à la libération du fer sous forme Fe^{2+} dans la cellule (**Figure 3**) (Han, 2011)

Le fer ferreux dans l'entérocyte présente trois destinées: un stockage sous forme de ferritine, une utilisation par la mitochondrie pour le processus de la chaîne respiratoire ou un export du fer des entérocytes vers le plasma par la ferroportine (**Figure 3**).

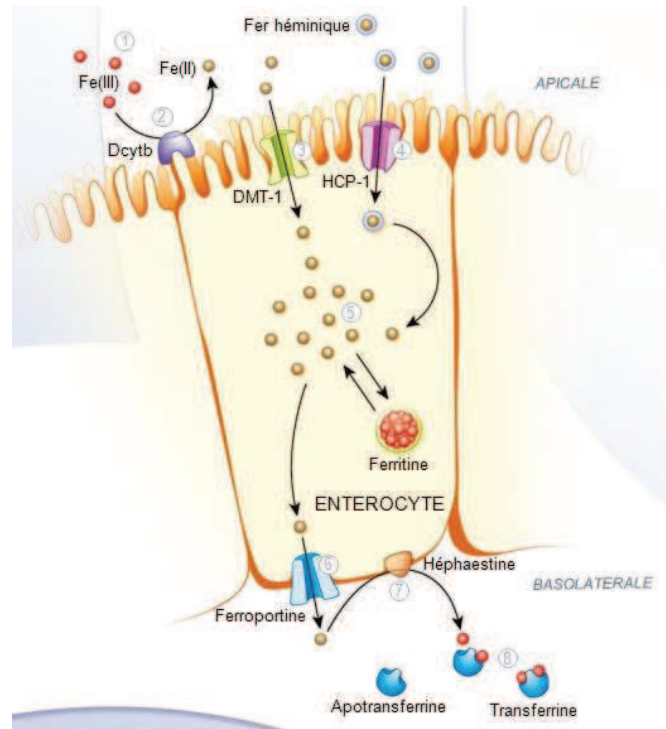


Figure 3 : Mécanisme d'absorption du fer chez l'homme.

Le fer de l'alimentation quotidienne de l'homme est présent sous deux formes, le fer non hémérique et le fer hémérique. Le fer non hémérique à l'état ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par l'enzyme Dcyb (Duodenal Cytochrome b). Le Fe^{2+} entre dans les entérocytes par l'intermédiaire du transporteur divalent metal transporter 1 (DMT1). Le fer hémérique au niveau du pôle apical des entérocytes entre grâce à la protéine membranaire haem carrier protein 1 (HCP-1). Le fer ferreux est ensuite extrait de l'hème par l'hème oxygénase (mécanisme non décrit sur ce schéma). Le fer ferreux à l'intérieur des entérocytes est soit stocké au niveau cellulaire par l'intermédiaire de la ferritine, soit exporté vers le plasma *via* la ferroportine. Le fer ferreux exporté est ensuite oxydé en fer ferrique et se lie à l'apotransferrine.

II.2.2. Distribution du fer chez l'homme

Une fois exporté dans le plasma, le fer Fe^{2+} est oxydé par l'héphaestine ou la céruloplasmine en Fe^{3+} . Ce dernier se fixe alors à l'apotransferrine pour former l'holotransferrine. L'holotransferrine est ensuite reconnue par les récepteurs TfR1 (Transferrin receptor 1) exprimés ubiquitairement à la surface cellulaire et TfR2 exprimé spécifiquement à la surface des hépatocytes. Le fer lié à la transferrine est ainsi distribué dans plusieurs compartiments de l'organisme pour assurer des fonctions vitales. Ainsi dans les muscles, il est utilisé pour la formation des myoglobines, dans la moelle osseuse il est impliqué dans le processus d'érythropoïèse pour la formation des globules rouges qui contiennent la majorité du fer présent dans l'organisme. En condition de gestation, le fer circulant traverse le placenta pour assurer les besoins du développement du fœtus. L'excès du fer est stocké dans les hépatocytes (Figure 4).

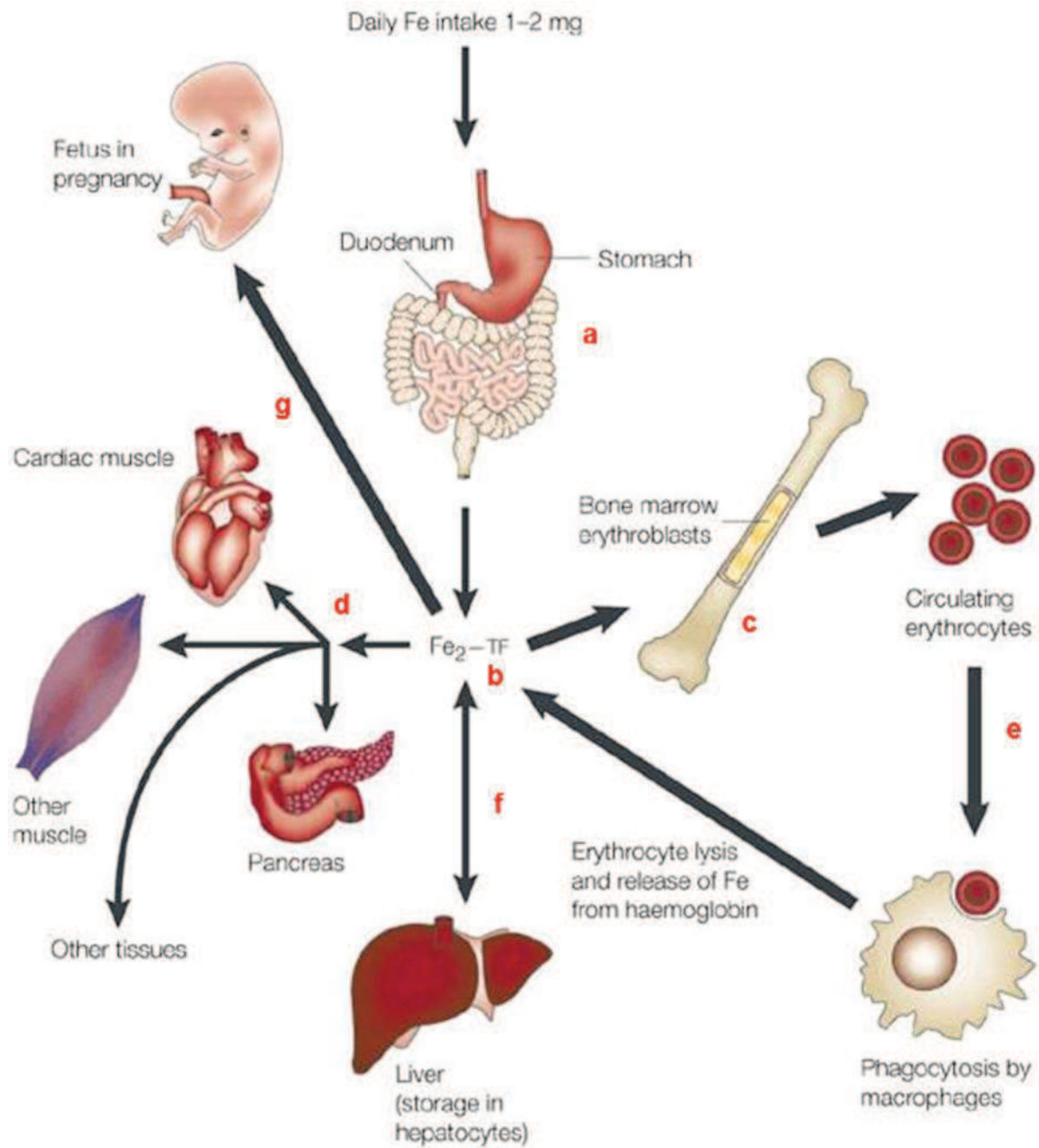


Figure 4 : Distribution du fer dans l'organisme

Le fer absorbé par voie alimentaire (a) associé à la transferrine (holotransferrine) dans la circulation sanguine (b) est distribué dans les compartiments comme la moelle osseuse (c) pour la formation des érythrocytes, les muscles (cœur, et autres) et le pancréas pour la formation de la myoglobine (d). Les globules rouges sénescents subissent le processus d'érythrophagocytose permettant le recyclage du fer (e). L'excédent du fer est stocké dans les hépatocytes (f) où il peut être mobilisé en condition de déficience. Chez les femmes enceintes, la mobilisation du fer circulant vers le placenta est nécessaire pour le développement du fœtus (g) (modifié de (Andrews, 2000)).

Le fer contenu dans l'organisme humain s'élève à 4 g et réparti dans plusieurs compartiments (**Tableau 4**).

*Tableau 4 : Répartition du fer dans l'organisme
(pour revue (Ganz and Nemeth, 2015))*

Compartiment	Protéine liée au fer	Concentration en fer
Erythrocytes	Hémoglobine	1500-2500 mg
Stockage du fer (hépatocytes et macrophages)	Ferritine	200-1200 mg
Plasma	Transferrine	3-4 mg
Autres tissus	Myoglobine (muscle)	200 mg

II.2.3. Recyclage du fer

L'être humain recycle plus de 360 milliards de globules rouges sénescents par jour soit plus de 5 millions par seconde (White *et al.*, 2013). Le recyclage du fer contenu dans les globules rouges est un processus important puisque c'est le compartiment de l'organisme contenant le plus de fer. Le recyclage du fer des globules rouges implique l'érythrophagocytose. En effet les érythrocytes sénescents ou endommagés sont phagocytés par les macrophages et lysés pour libérer l'hème. L'hème est ensuite exporté vers le cytosol par l'intermédiaire du transporteur HRG1 (White *et al.*, 2013). De plus les macrophages expriment les clusters de différenciation CD163 et CD91 qui reconnaissent respectivement les complexes hème-hémopexine et hémoglobine-haptoglobine induisant leur endocytose. L'hème libéré dans l'endosome est exporté vers le cytosol par HRG1. Une fois dans le cytosol, l'hème est dégradé par l'hème oxygénase pour libérer le monoxyde de carbone, la biliverdine et le fer ferreux (**Figure 5**). Le recyclage du fer par les macrophages peut se faire par l'intermédiaire de l'acquisition du fer lié à la transferrine formant l'holotransferrine et qui est reconnue par son récepteur TfR1. L'interaction TfR1-holotransferrine induit une endocytose suivie d'une libération du fer de la transferrine. Le fer est par la suite exporté de l'endosome grâce à la protéine de transport des ions : la mucopolysaccharidase ou TRPML1 (Dong *et al.*, 2008) ou par l'intermédiaire de DMT1 (Soe-Lin *et al.*, 2010). Le Fe²⁺ libéré dans le cytosol est ensuite immédiatement pris en charge par des molécules de la famille des « poly(rC) binding protein » (PCBP) protectrices de l'effet toxique de cette forme du fer. Ceci conduit à délivrer le fer à la

ferritine (Leidgens *et al.*, 2013). En condition de demande importante de fer par l'organisme, la ferritine est dégradée par des lysosomes et protéasomes pour libérer le Fe^{2+} qui peut être exporté de la cellule par la ferroportine (Donovan *et al.*, 2005). L'hème présent dans le cytosol des macrophages peut être exporté au niveau extracellulaire par l'intermédiaire de la protéine de transport FLVCR1 (Chiabrando *et al.*, 2014).

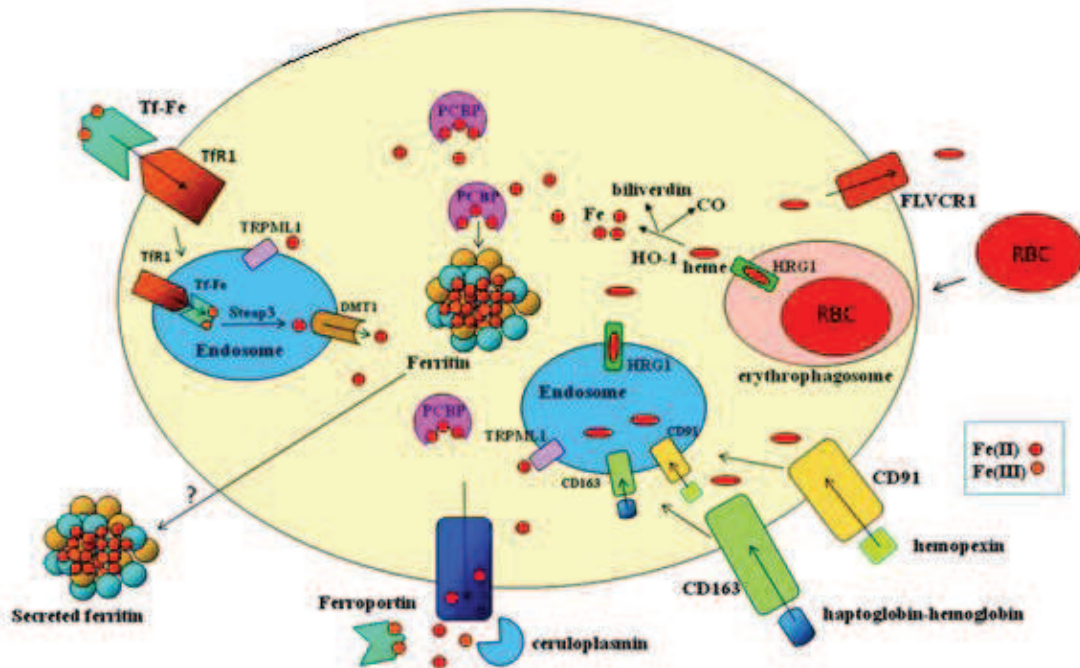


Figure 5 : Acquisition et recyclage du fer.

L'érythrophagocytose conduit à la formation d'un érythrophagosome contenant les érythrocytes. Une protéolyse des érythrocytes conduit à la libération de l'hème qui peut être exporté par le transporteur HRG1. L'interaction des complexes hème-hémopexine et hémoglobine-haptoglobine respectivement avec les clusters de différenciation CD91 et CD163 permet de recycler le fer contenu dans l'hème et l'hémoglobine. L'hème présent dans les endosomes ou érythrophagosome peut être exporté vers le cytosol grâce au transporteur HRG1. Dans le cytosol, l'hème est dégradé par l'enzyme hème oxygénase (HO-1) pour libérer le fer et générer le monoxyde de carbone et la biliverdine. L'interaction du complexe Fer-transferrine avec son récepteur TfR1 induit une endocytose puis le fer est libéré de la transferrine. Le fer contenu dans les endosomes peut être exporté grâce à DMT1 et TRPM1. Le fer libre présent dans le cytosol des macrophages est capté par les protéines PCBP et délivrer à la ferritine qui peut être probablement sécrétée (modifié et adapté de (Gammella *et al.*, 2014)).

II.3. Homéostasie systémique du fer chez les mammifères : rôle de l'axe hepcidine-ferroportine

En absence de voie d'excrétion du fer, le contrôle du taux de fer dans l'organisme repose entièrement sur la régulation de l'entrée du fer qui est assurée par l'axe hepcidine-ferroportine. Ce système assure les besoins en fer de l'organisme, et empêche l'accumulation toxique du fer dans les organes vitaux, comme le foie et le cœur.

II.3.1. Axe hepcidine-ferroportine

Vers la fin de l'année 2000, l'hepcidine a été purifiée pour la première fois chez l'homme, à partir de sang et d'urine, et caractérisée pour ses propriétés antimicrobiennes par deux équipes indépendantes (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001). Dans le même temps deux équipes françaises ont montré l'implication de cette molécule dans le métabolisme du fer (Nicolas *et al.*, 2001; Pigeon *et al.*, 2001). Ce peptide formé de 25 acides aminés est comme son nom l'indique, « **hepatic bacteriocidal protein** » synthétisé majoritairement par le foie. Un seul gène *HAMP* situé sur le chromosome 19 code pour l'hepcidine chez l'homme. Chez la souris, deux gènes *Hamp1* et *Hamp2* localisés au niveau du chromosome 7 avec une similarité de séquence nucléotidique de 90% ont été identifiés; le gène *HAMP* humain et *Hamp1* murin sont des gènes orthologues (Nicolas *et al.*, 2001). Les peptides hepcidine 1 et hepcidine 2 synthétisés par les gènes *Hamp1* et *Hamp2* respectivement sont identiques à 68% et sont tous les deux exprimés fortement dans le foie (Ilyin *et al.*, 2003).

Le gène de l'hepcidine est formé de 3 exons codant pour un propeptide de 84 acides aminés (**Figure 6**). La maturation de ce propeptide est ensuite réalisée grâce à un clivage du propeptide par la convertase furine pour donner un peptide de 25 acides aminés principalement retrouvé dans le sang et les urines (Valore and Ganz, 2008). D'autres peptides de tailles plus courtes (20 et 22 acides aminés) peuvent être également détectés (Park *et al.*, 2001). Ce peptide mature présente une structure caractérisée par 8 cystéines impliquées dans 4 ponts disulfures dont un formé par deux cystéines adjacentes (Hunter *et al.*, 2002).

L'hepcidine joue un rôle d'hormone et contrôle la concentration de fer circulant dans le plasma en régulant négativement le niveau de la ferroportine fonctionnelle, seul exporteur de fer cellulaire connu, à la surface cellulaire. Des analyses fonctionnelles et de colocalisation ont en effet montré que l'hepcidine circulante se fixe sur la ferroportine et induit son internalisation et sa dégradation (Nemeth *et al.*, 2004b). L'hepcidine qui interagit avec la ferroportine est

l'hepcidine formé de 25 acides aminés. Il a été décrit que les 5 acides aminés N terminaux de l'hepcidine sont nécessaires pour l'interaction avec la ferroportine (Nemeth *et al.*, 2006).

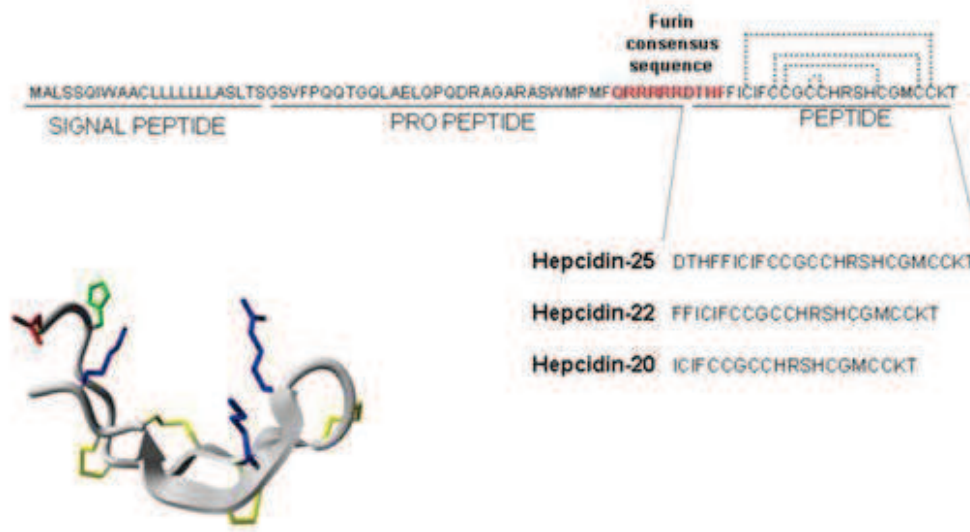


Figure 6 : Structure de l'hepcidine.

L'hepcidine mature dérive d'un propeptide de 84 acides aminés, ce dernier subit deux clivages. Le premier consiste à éliminer le signal peptide. Le second clivage effectué par la furine reconnaît la séquence QRRRRRDTHF permettant la formation de trois types d'hepcidine (25 ; 22 ; 20), la forme mature de 25 acides aminés est prédominante. La structure d'hepcidine 25 est caractérisée par deux brins courts stabilisés par quatre ponts disulfures (en jaune). Les résidus arginine et lysine sont représentés en bleu, l'acide aspartique en rouge et l'histidine localisée en position N-terminal en vert (Poli *et al.*, 2014).

L'hepcidine circulante réduit donc la sortie du fer au niveau des entérocytes, des macrophages et des hépatocytes, et ainsi contrôle négativement l'absorption du fer alimentaire au niveau du duodénum, le relargage du fer recyclé à partir des érythrocytes sénescents, et la libération du lieu du fer de son lieu de stockage. L'axe hepcidine-ferroportine représente donc un système de régulation de l'homéostasie systémique du fer.

Des régulateurs positifs et négatifs interviennent dans l'expression d'hepcidine afin d'affiner sa production en fonction des besoins. Le taux de fer élevé de l'organisme et l'inflammation sont les deux stimuli majeurs connus pour réguler positivement l'expression d'hepcidine.

II.3.2. Régulateurs positifs de l'hepcidine

La régulation transcriptionnelle de l'hepcidine par l'inflammation dans les hépatocytes a été largement analysée. Il a d'abord été rapporté que la cytokine IL-6 *via* l'activation de la voie IL-6R et le facteur de transcription STAT3 était un facteur majeur de la régulation de de

transcription de l'hepcidine (Nemeth *et al.*, 2004a; Verga Falzacappa *et al.*, 2007). Cependant, les souris IL-6 KO montrent une surexpression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation induite par le LPS ((Besson-Fournier *et al.*, 2012) et données propres non présentées dans ce travail).

II.3.2.1. Régulation par le fer

La régulation de l'hepcidine par le fer est médiée principalement par la voie de signalisation BMPR-SMAD. Le récepteur BMPR impliqué dans la régulation du fer est un hétérodimère de type I et II qui induit une signalisation *via* la voie SMAD régulant positivement ainsi l'expression du gène codant pour l'hepcidine (*HAMP*). L'induction de la voie de signalisation BMPR requiert un ligand BMP plus spécifiquement BMP6 induit par le fer et qui interagit avec d'autres protéines comme l'hémojuvénile, la néogénine et les récepteurs à la transferrine.

II.3.2.1.1. Les protéines bone morphogenetic proteins (BMPs)

Les protéines BMPs appartiennent à la superfamille des cytokines TGF- β (Tumor Growth Factor β). Elles jouent des rôles importants dans le développement, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire. Les BMPs interviennent également dans la régulation du métabolisme du fer. Les travaux de Wang *et al* en 2005 ont permis de montrer que la voie BMPR-SMAD joue un rôle central dans la régulation de l'hepcidine en réponse au taux de fer de l'organisme. En effet une déplétion de la protéine SMAD4 au niveau des hépatocytes conduit à une surcharge en fer au niveau hépatique. Dans cette même étude, les auteurs ont montré qu'une stimulation d'une lignée cellulaire d'hépatocytes (HEPA1-6 hepatocyte carcinoma cells) avec le TGF- β ou le BMP4 induit l'expression d'hepcidine et que cette expression est abolie lorsque les cellules sont dérivées des souris SMAD4 knock out (Wang *et al.*, 2005). Ces investigations ont permis de poser les bases de l'implication de la voie BMP-BMPR-SMAD dans la régulation de l'expression de l'hepcidine. L'identification du rôle majeur de BMP6 dans la régulation d'hepcidine n'est intervenue que 3 ans plus tard avec les travaux de Kautz *et al* en 2008 et Andriopoulos *et al* en 2009 qui ont montré que BMP6 est le principal ligand impliqué dans la régulation positive de l'hepcidine *in vivo* en réponse au fer. En effet ces auteurs ont montré notamment qu'un défaut de production de BMP6 induit une surcharge massive de fer

associée à une diminution importante de l'expression d'hepcidine et une réduction de la phosphorylation des protéines SMAD1/5/8 dans le noyau. Les souris traitées avec du BMP6 exogène montrent une diminution du fer sérique associée à une augmentation de l'expression d'hepcidine (Andriopoulos *et al.*, 2009; Kautz *et al.*, 2008; Meynard *et al.*, 2009). Le fer s'accumule alors dans les hépatocytes qui expriment le récepteur BMPR. Les hépatocytes ne produisent pas BMP6, ligand primordial de BMPR impliqué dans l'expression d'hepcidine en réponse au taux de fer, mais BMP6 est synthétisé par les cellules non parenchymateuses du milieu environnant comme les cellules endothéliales sinusoidales (Rausa *et al.*, 2015).

Une forme sévère et juvénile d'hémochromatose est liée au défaut du gène codant l'hémojuvéline (*HJV* connu sous le nom de *HFE2*), caractérisé après l'identification de la mutation G320V en 2004 en Grèce (Pissia *et al.*, 2004). En 2006 Babitt *et al.* ont montré que la mutation de la protéine hémojuvénile associée à l'hémochromatose est liée à un défaut de la signalisation BMPR suggérant le rôle de l'hémojuvéline comme co-récepteur de BMPR impliqué dans la régulation positive de l'hepcidine par le fer (Babitt *et al.*, 2006).

II.3.2.1.2. L'interaction HFE-TfR1 et HFE-TfR2

L'hémochromatose héréditaire a permis de mettre en évidence des gènes, comme *HFE* et *TfR2*, impliqués dans la régulation de l'absorption du fer et du niveau d'hepcidine produit lors d'une augmentation du taux de fer dans l'organisme. Les analyses génétiques ont montré dès 1976 la localisation sur le chromosome 6 du gène de l'hémochromatose héréditaire classique dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Simon *et al.*, 1976), mais ce n'est qu'en 1996 que le gène *HFE* codant une molécule de CMH de classe I-like a été identifié par clonage positionnel (Feder *et al.*, 1996). Cette protéine HLA interagit avec le récepteur de la transferrine et modifie l'affinité pour l'holotransferrine (Feder *et al.*, 1998). La protéine HFE s'associe à la β 2-microglobuline, mais contrairement aux protéines classiques du CMH de classe I ne présente pas de peptides antigéniques aux cellules T. L'analyse cristallographique a montré que l'interaction avec TfR impliquait les domaines hélices α 1 et α 2 (comme pour l'interaction de molécules classiques du CMH de classe I aux TCRs) et que la cavité d'insertion de peptide antigénique était fermée (Lebron *et al.*, 1998) (Bennett *et al.*, 2000).

Une forme héréditaire d'hémochromatose non liée à HFE a conduit à l'identification du gène *TfR2* (Camaschella *et al.*, 2000). L'augmentation du taux d'holotransferrine circulant

induit une dislocation du complexe HFE-TfR1 nécessaire à une initiation de la cascade de signalisation conduisant à l'expression d'hepcidine. La protéine HFE interagit alors avec le deuxième récepteur de la transferrine (TfR2) (Gao *et al.*, 2009; Goswami and Andrews, 2006; Schmidt *et al.*, 2008). La molécule HFE joue un rôle crucial sur la voie de signalisation BMPR-SMAD et non dans la production des ligands BMPs puisque les souris *Hfe* KO ont une déficience en terme de signalisation BMPR-SMAD alors que l'expression de BMP6 est identique par rapport aux souris sauvages (Corradini *et al.*, 2009). Le mécanisme précis des interactions HFE-TfR1 et HFE-TfR2 impliquées dans l'expression d'hepcidine et le rôle exact de *HFE* restent encore à élucider.

II.3.2.2. Régulation de l'hepcidine par l'inflammation et l'infection

L'implication du gène *HFE* codant une molécule apparentée du CMH de classe I et de l'hepcidine codant un peptide antimicrobien a mis en lumière une relation entre l'homéostasie du fer et le système immunitaire au cours de l'évolution. Par ailleurs, en condition d'inflammation chronique, une anémie résultant d'une réduction du taux de fer circulant apparaît. Ceci est dû à une diminution du recyclage du fer du système réticulo-endothélial (Fillet *et al.*, 1989; Kampschmidt *et al.*, 1965) et une diminution de l'absorption du fer (Cortell and Conrad, 1967; El-Shobaki and Rummel, 1985; Hershko *et al.*, 1974). Cette diminution du fer sérique s'explique avec la découverte de l'hepcidine comme l'hormone primordiale du métabolisme du fer surexprimée en condition inflammatoire. De fait, un traitement des hépatocytes par une molécule inflammatoire, le lipopolysaccharide (LPS) conduit à une augmentation de l'expression du gène de l'hepcidine (Pigeon *et al.*, 2001): l'hepcidine a ainsi été classée comme une protéine de phase aigüe de type II (Nemeth *et al.*, 2003).

Ainsi, la régulation de l'hepcidine, capable de réduire le taux de fer circulant, représente un des mécanismes de défense mis en place durant l'infection visant à lutter contre la croissance des agents pathogènes (Drakesmith and Prentice, 2012).

II.3.2.3. Interaction et chevauchement entre les voies de signalisation JAK-STAT et BMP-SMAD conduisant à l'expression d'hepcidine

La voie de signalisation IL-6-STAT3 a été associée à l'expression d'hepcidine au niveau hépatique en réponse à des stimuli inflammatoires (Nemeth *et al.*, 2004a). La fixation

d'IL-6 sur le récepteur gp130 induit une signalisation intracellulaire Jak/STAT conduisant finalement à la phosphorylation de STAT3 (Heinrich *et al.*, 1998; Pietrangelo *et al.*, 2007; Verga Falzacappa *et al.*, 2007). Le facteur de transcription STAT3 phosphorylé est transloqué ensuite dans le noyau et se lie ainsi à des sites d'activation de la transcription du gène de l'hepcidine (Verga Falzacappa *et al.*, 2007). La voie de signalisation impliquée dans l'expression d'hepcidine *via* IL6-STAT3 est directement liée à l'induction de l'anémie inflammatoire (Sakamori *et al.*, 2010). Lou *et al* en 2005 ont démontré que même après une déplétion des macrophages du foie (cellules de Kupffer), un traitement des souris par l'IL-6 induit l'expression d'hepcidine (Lou *et al.*, 2005) démontrant ainsi le rôle important des hépatocytes dans l'expression de l'hepcidine lors d'une inflammation.

Les études de Wang *et al* ont montré que les souris déficientes en SMAD4 spécifiquement au niveau du foie présentent une surcharge en fer dans divers tissus associée à un niveau d'expression hépatique d'hepcidine très faible (Wang *et al.*, 2005). Par ailleurs, un traitement par l'IL-6, connu pour induire l'expression d'hepcidine *via* la signalisation JAK/STAT à des souris SMAD4 KO spécifique du foie n'induit pas l'expression de l'hepcidine. Ceci suggère une interaction entre les voies SMAD4 et STAT3. De plus Steinbicker *et al* en 2011 ont montré qu'une inhibition des récepteurs BMP de type I Alk3 sur des hépatocytes, et chez le zébrafish et les souris réduit l'expression d'hepcidine en réponse à un traitement à l'IL-6 (Steinbicker *et al.*, 2011).

En 2012, une étude de Besson-Fournier *et al* a relevé qu'un traitement des souris avec la molécule inflammatoire LPS induit un niveau de phosphorylation SMAD1/5/8 identique chez les souris *Bmp6* KO et sauvage. De plus ces auteurs ont démontré que cette phosphorylation SMAD1/5/8 est indépendante de l'expression des ligands BMPs comme *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5*, *Bmp6*, *Bmp7* and *Bmp9* en réponse au LPS. Par ailleurs, les souris IL-6 KO montrent une augmentation de l'expression de l'hepcidine quasi normale par rapport aux souris de type sauvage dans le foie. Ces études ont conduit à la mise en évidence de l'implication d'une surexpression d'ARNm codant l'activine B au niveau hépatique en réponse au LPS. De plus la stimulation d'une lignée d'hépatocytes humaines par l'activine B induit une expression d'hepcidine et une phosphorylation des protéines SMAD1/5/8 (Besson-Fournier *et al.*, 2012). L'activine B est une cytokine de la famille des TGF- β , famille qui comprend 33 membres incluant les BMPs, GDFs (growth differentiation factors), les activines et les inhibines (Massague, 1992; Massague *et al.*, 1987). Les deux récepteurs BMPRI et BMPRII sérine-thréonine kinase transmembranaires induisent une transduction des signaux *via* les protéines

intracellulaires SMAD (Wrighton and Feng, 2008). Les cytokines impliquées dans la transduction des signaux BMPR sont divisées en deux groupes : le groupe TGF- β /Activin induit la signalisation à travers les récepteurs de type I ALK4, 5 et 7 activant SMAD2 et 3 tandis que le groupe BMP utilise les récepteurs de type I ALK1, 2, 3 et 6 induisant SMAD 1, 5 et 8. L'interaction des SMAD2/3 et SMAD1/5/8 avec SMAD4 induit la formation de complexes capables d'activer l'expression des gènes après translocation nucléaire (ten Dijke and Arthur, 2007). L'ensemble de ces études a permis de clarifier l'interaction entre les voies inflammatoires et celles liées au fer dans l'expression de l'hepcidine (**Figure 7**).

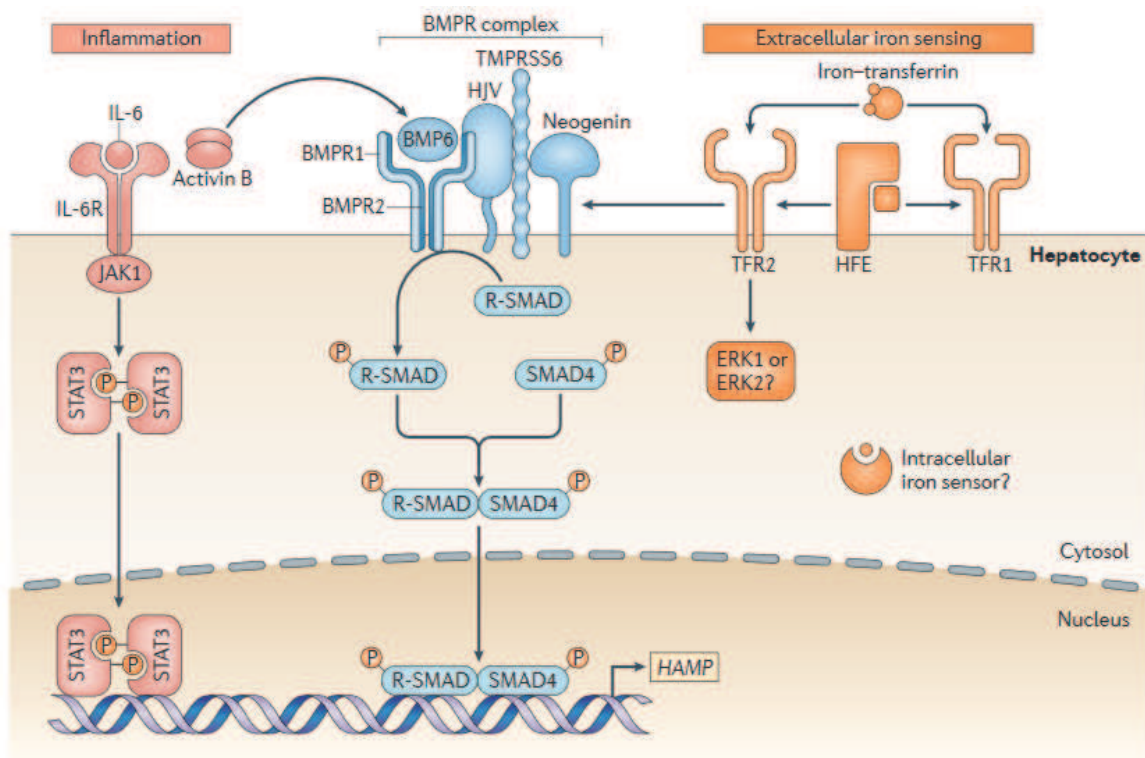


Figure 7 : Schéma récapitulatif des différentes voies de régulation de l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes.

La régulation de l'expression de l'hepcidine (HAMP) dans les hépatocytes en condition inflammatoire peut être médiée par IL-6 qui active la voie JAK/STAT3. La stimulation du complexe BMPR (BMPR 1,2, Hémoujuveline HJV, néogénine et Tmprss6) par le ligand BMP6, en réponse au fer, ou de l'activine B, en réponse à l'inflammation, conduit à l'activation du facteur SMAD4. Parallèlement les interactions HFE-TfR1-TfR2 peuvent agir sur le complexe BMPR modulant ainsi l'expression de l'hepcidine (Ganz and Nemeth, 2015).

II.3.3. Régulateurs négatifs de l'hepcidine

L'érythropoïèse requière une présence constante de fer dans le sang. Ainsi, la répression de l'expression de l'hepcidine est un mécanisme permettant une augmentation de la biodisponibilité du fer.

II.3.3.1. Régulation par la matriptase 2

Des travaux publiés en 2008 par trois équipes différentes ont permis de montrer que le TMPRSS6 (Transmembrane protease, serine 6) agit en amont de la voie de signalisation BMPR-SMAD modulant négativement l'expression de l'hepcidine (Du *et al.*, 2008; Folgueras *et al.*, 2008; Silvestri *et al.*, 2008). Une mutation du gène *TMPRSS6* induit une anémie ferriprive résultant d'une expression trop importante de l'hepcidine (Finberg *et al.*, 2008). Le mode d'action décrit par Silvestri *et al.* suggère que la matriptase clive l'hémojuvenile (HJV) entraînant une suppression de la voie de signalisation BMP-SMAD réduisant ainsi l'expression de l'hepcidine (Silvestri *et al.*, 2008).

II.3.3.2. Régulation par l'érythropoïèse

Le fer est important dans la formation et la maturation des globules rouges. L'érythropoïèse régule par un mécanisme de feedback le taux de fer circulant. Vokurka *et al.* en 2006 ont montré qu'une inhibition de l'érythropoïèse chez les souris après irradiation augmente significativement l'expression de l'hepcidine (Vokurka *et al.*, 2006) favorisant ainsi une absorption intestinale du fer et un relargage plus important du fer des macrophages. Le processus d'érythropoïèse est médiée par l'érythropoïétine (EPO), produite principalement par les reins. Cette protéine est requise pour l'érythropoïèse et la maturation des érythroblastes au cours des derniers stades de leur développement. Les régulateurs érythroïdes growth differentiation factor 15 (GDF15), twisted gastrulation BMP signalling modulator 1 (TWSG1) et érythroferrone (ERFE) sont connus comme des répresseurs d'expression d'hepcidine (Kautz *et al.*, 2014; Tanno *et al.*, 2007; Tanno *et al.*, 2009). L'érythropoïèse contrôle ainsi directement la disponibilité du fer.

II.3.3.3. Régulation par l'hypoxie

Le fer contenu dans l'hémoglobine fixe l'oxygène. Le niveau de l'oxygène présent dans les tissus dépend de la biodisponibilité du fer qui contribue à former l'hémoglobine. En condition hypoxique, l'érythropoïèse s'accroît en corrélation avec une diminution du taux d'hepcidine et donc une demande en fer plus élevée (Nicolas *et al.*, 2002). Des études de Peyssonnaud *et al.* en 2007 ont établi que la voie de régulation transcriptionnelle par le facteur von Hippel-Lindau/hypoxia-inducible transcription factor (VHL/HIF) est essentielle pour les

relations entre l'homéostasie du fer et la régulation de l'hepcidine *in vivo* via une diminution de l'hepcidine coordonnée avec une surexpression de l'érythropoïétine et de la ferroportine, la voie VHL/HIF permet ainsi une mobilisation du fer supportant la production des érythrocytes (Peyssonnaud *et al.*, 2007). Plus tard, les travaux de Mastrogiannaki *et al* en 2012 ont montré que la surexpression du facteur HIF2 (hypoxia-inducible factor-2) au niveau hépatique est impliquée indirectement dans la diminution de l'expression d'hepcidine via une augmentation de l'érythropoïèse et de la production d'érythropoïétine (Mastrogiannaki *et al.*, 2012).

II.4. Homéostasie du fer cellulaire par le système IRP/IRE

Au niveau cellulaire un mécanisme régule le taux de fer entrant par le récepteur à la transferrine et la quantité de fer stocké par la ferritine. L'expression du récepteur de la transferrine (TfR) (voie d'entrée majeure du fer dans la cellule) et de la ferritine est régulée au niveau post transcriptionnel d'une manière coordonnée et réciproque en réponse au taux de fer intracellulaire (Hentze and Kuhn, 1996; Rouault and Harford, 2000). En effet les ARNm codant TfR1, la ferritine (H et L) ainsi que la ferroportine contiennent des motifs formant des structures repliées en épingle à cheveux connus sous le nom de « *iron responsive elements* » (IREs) situés dans des régions non traduites (UTRs) des ARNs. Les motifs IREs sont formés d'une trentaine de nucléotides et sont conservés au cours de l'évolution chez les vertébrés, certains insectes et bactéries (Johansson and Theil, 2002). L'ARNm de *TfR1* contient cinq copies IRE en position 3' UTR et celui de la ferritine H ou L possède un seul IRE situé en position 5' UTR. En condition de déficience en fer cellulaire, les IREs sont reconnus par deux protéines cytoplasmiques iron regulatory protein 1 (IRP1) et IRP2 qui s'y fixent. Les interactions IRE/IRP induisent ainsi la stabilisation de l'ARNm codant TfR1 et donc augmentent son taux de traduction et répriment la traduction de la ferritine (**Figure 8**). Ainsi, en condition de taux de fer intracellulaire bas, la capacité d'internalisation de l'holotransferrine est plus importante tout en minimisant la séquestration intracellulaire par la ferritine. En condition de surcharge en fer cellulaire, le fer sous forme de cluster Fe-S se fixe sur les protéines IRP1 et IRP2 empêchant ainsi les interactions IRP/IRE, qui aboutit en conséquence à une dégradation de l'ARNm codant TfR1 et à une traduction de l'ARNm de la ferritine et de la ferroportine. Cette réponse empêche l'internalisation du fer, augmente les capacités de stockage du fer intracellulaire et donc la détoxification et pour finir augmente l'efflux du fer des cellules. Tout comme ces ARNm, celui codant DMT1 contient aussi une boucle en épingle à cheveux IRE située en position 3'

contribuant ainsi à une augmentation d'expression de ces transporteurs chez des souris soumises à un régime déficient en fer (**Figure 8**).

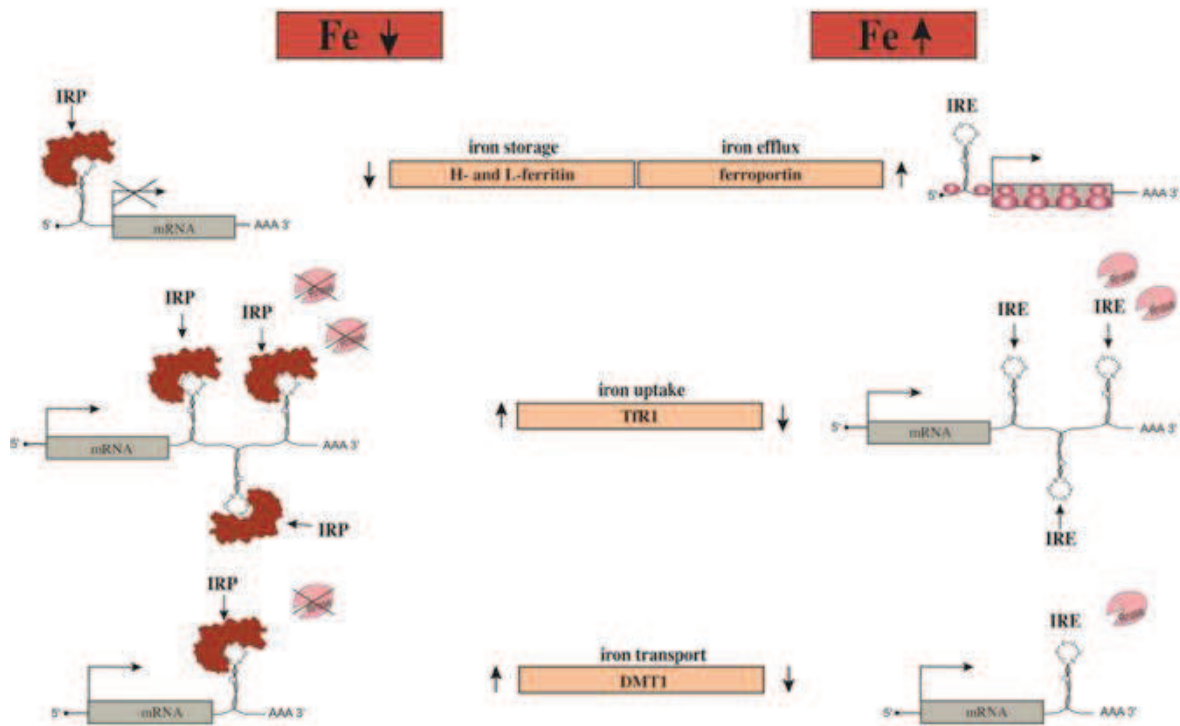


Figure 8: Régulation post-transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme du fer par le système IRP/IRE

En présence d'une concentration intracellulaire faible en fer, la traduction de l'ARNm de la ferritine et de la ferroportine est bloquée grâce à l'interaction de l'IRP avec le motif IRE localisé en position 5' de l'ARNm. Dans les mêmes conditions, les ARNm de la transferrine 1 (TfR1) et de DMT1 sont stabilisés grâce aux motifs IRE localisés en 3' de l'ARN messager augmentant la production de ces protéines. En condition d'excès de fer au niveau intracellulaire, le fer empêche l'interaction IRP/IRE grâce à sa fixation sur les IRPs permettant une traduction plus importante des ARNm de la ferritine et de la ferroportine. Parallèlement les ARNm de TfR1 et DMT1 sont dégradés. (modifié de (Wang and Pantopoulos, 2011)).

II.5. Régulation de la ferroportine par l'inflammation et l'infection

L'augmentation du niveau de production d'hepcidine en réponse à une inflammation ou un agent pathogène réduit le taux de fer circulant grâce à la dégradation de la ferroportine mature exprimée à la surface des cellules. La ferroportine peut être régulée également au niveau transcriptionnel par l'inflammation *via* un mécanisme dépendant de la voie de signalisation TLR. En effet Peyssonnaud *et al* en 2006 ont montré qu'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* induit une réduction de l'expression de la ferroportine dans les macrophages issus de souris de type sauvage tandis qu'une neutralisation de TLR4 abolit cet effet (Peyssonnaud

et al., 2006). Plus récemment, un mécanisme de diminution de l'expression de la ferroportine indépendamment de l'hepcidine a été décrit. En effet Guida *et al.* ont montré en 2015 qu'une stimulation de TLR2/TLR6 induit une diminution importante de l'expression de la ferroportine au niveau transcriptionnel et protéique dans les macrophages, le foie et la rate sans modification de l'expression de l'hepcidine (Guida *et al.*, 2015).

De multiples voies permettent de réguler le taux d'expression de l'hepcidine et de la ferroportine, par le fer et le système immunitaire. Cependant, le niveau de régulation de l'expression de l'hepcidine par le fer reste modéré, en condition physiologique normale le mécanisme continu de l'érythropoïèse chez les mammifères ne peut supporter un taux élevé d'hepcidine. En revanche, les variations de niveau d'hepcidine en réponse à une inflammation ou une infection sont beaucoup plus substantielles, et révèlent que l'organisme se défend au dépend de son érythropoïèse.

Chapitre 3 : La biologie du macrophage

«S'il y a un problème, il y a une solution. S'il n'y a pas de solution, c'est qu'il n'y a pas de problème» – Bob Marley

III.1. Introduction : la réponse immune

Depuis son existence, l'Homme a toujours vécu dans la perspective de trouver des solutions préventives et/ou thérapeutiques aux maladies auxquelles il est confronté. Même si des décalages importants existent entre le début d'une nouvelle maladie et la compréhension, la lutte et le traitement, l'histoire retiendra en général que tôt ou tard émergent des perspectives encourageantes menant à l'éradication des maladies. Nos ancêtres nous ont laissé à travers des écrits ou des œuvres d'arts des signes caractéristiques des maladies dont ils souffraient comme la peste, la variole, la rougeole, la tuberculose etc...

Le terme immunité provient du latin *immunis* qui désigne une exemption de charges, telles que les services et les impôts accordés aux sénateurs romains, soustraits du droit commun. Le terme immunité doit son nom au fait que les bactériologistes à l'époque observaient des phénomènes immunitaires de protection de certaines personnes contre les infections. En effet depuis fort longtemps il est connu qu'une personne guérie de certaines maladies ou ayant été mis en contact avec de faibles quantités de certaines substances responsables des maladies était protégée contre la répétition de ces maladies. Un des exemples est la variolisation pratiquée en Chine dès la fin du 17^{ème} siècle. Ce procédé consistait à inoculer à des personnes saines des produits de pustules de malades ayant une variole bénigne avec pour objectif de prévenir une variole mortelle.

Des efforts considérables de recherches ont été déployés pour comprendre les mécanismes de l'immunité. Il existe une grande diversité d'agents pathogènes ce qui va de pair avec une grande diversité de mécanismes de défense de l'hôte contre les pathogènes. Chez les mammifères la réponse immune implique une variété de cellules (les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques etc...), une variété de médiateurs de l'inflammation (l'histamine, les cytokines, les chimiokines, les leucotriènes, les prostaglandines etc...) et de réponses anti pathogènes (les facteurs chimiques solubles

comme le monoxyde d'azote NO, les espèces réactives oxygénées ROS, les peptides antimicrobiens, les mécanismes spécifiques comme la phagocytose etc...).

Au cours du 20^{ième} siècle, le rassemblement de données a fait émergé un modèle de défense de l'hôte contre l'infection chez les mammifères conduisant à la distinction entre l'immunité de type 1 et celle de type 2. Les travaux de Parish au début des années 1970 ont apporté les bases du modèle en montrant une corrélation inverse entre le niveau de production d'anticorps et l'hypersensibilité retardée liée par une immunité à médiation cellulaire. Un intérêt grandissant s'est donc porté sur la caractérisation de ces formes alternatives de défense de l'hôte : immunité à médiation cellulaire ou type 1 et immunité humorale ou type 2 (Parish, 1971, 1973; Parish and Liew, 1972).

Au début des années 1980 deux sous types de lymphocytes ont été décrits, les T helper, exprimant la protéine de surface CD4 (CD4⁺), et les T cytotoxiques, exprimant le marqueur CD8 (CD8⁺). Les cellules T helper CD4⁺ stimulent la production d'anticorps par les cellules B, alors que les cellules CD8⁺ cytotoxiques provoquent la lyse de cellules autologues infectées par des pathogènes intracellulaires. Puis deux sous populations de cellules CD4⁺ ont été caractérisées : les lymphocytes T helper de type 1 (Th1) et les T helper de type 2 (Th2) (pour revue (Spellberg and Edwards, 2001)).

Les deux types cellulaires Th1 et Th2 se distinguent par leur phénotype : les Th1 produisent de l'interféron γ (IFN γ), IL-2, TNF- α , alors que les Th2 produisent de l'IL-4 ainsi que de l'IL-5, IL-10 et IL-13. Ces deux types cellulaires se différencient à partir de cellules lymphocytes naïfs Th0 non activées libérées par le thymus. L'immunité de type 1 induite par les Th1 conduit à une réaction proinflammatoire avec une stimulation de la phagocytose, une poussée oxydative, la destruction de microbes intracellulaires et une augmentation de l'expression de MHC classe I et II sur les cellules présentant des antigènes aux lymphocytes T. L'IFN γ produit par les Th1 permet aussi d'induire la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires par d'autres types cellulaires, et stimule aussi l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et la rétraction des cellules endothéliales responsables des signes de l'inflammation rougeur-douleur-chaueur. Dans la réponse Th2, les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 permettent l'activation de la prolifération des cellules B suivie de la stimulation de la production d'anticorps. L'IL-5 stimule le recrutement et la prolifération des éosinophiles. Les cytokines Th2 sont fortement impliquées dans les réactions allergiques et atopiques (pour revue (Spellberg and Edwards, 2001)).

La régulation des cytokines Th1 et Th2 est effectuée d'une manière croisée. L'IFN- γ supprime la sécrétion de l'IL-4 et empêche la différenciation de Th0 en Th2, inversement l'IL-10 et l'IL-4 sont des cytokines anti-inflammatoires qui inhibent la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ et bloque la polarisation Th0 en Th1. La polarisation des cellules T activées dans les ganglions lymphatiques, en cellules matures Th1 ou Th2 est régulée sur le site de « danger » par plusieurs facteurs :

- L'environnement cytokinique: la présence de l'IL-12 et de l'IL-4 permet la polarisation des lymphocytes naïfs en Th1 et Th2 respectivement. De plus, la présence de cellules quiescentes permet la réversion de la population cellulaire dominante dans un environnement cytokinique changeant.
- Les hormones: la présence d'hormones immunologiquement actives, comme les glucocorticoïdes stimulent la réponse Th2 en supprimant la sécrétion et l'effet de l'IFN- γ et de l'IL-12 alors que la testostérone induit la sécrétion d'IL-2 et l'établissement de la réponse Th1.
- Les cellules présentatrices d'antigènes : les macrophages et les cellules dendritiques peuvent induire des réponses Th1 et Th2 (pour revue (Spellberg and Edwards, 2001)).

Le système immunitaire inné est programmé pour détecter dans le microenvironnement des « signaux de dangers » qui avec des facteurs systémiques jouent un rôle dans la polarisation cellulaire. Les cellules présentatrices d'antigènes agissent sur ce microenvironnement en sécrétant des cytokines polarisantes. Les macrophages ont été identifiés au début du 20^{ième} siècle comme des phagocytes impliqués dans l'élimination des pathogènes, et dans les années 1970 il a été montré que les macrophages sont largement activés par les cytokines produites par les lymphocytes. Les macrophages activés, en particulier par l'IFN- γ , sont des cellules ayant une forte activité de présentation d'antigènes et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs toxiques pour les agents pathogènes parmi lesquels les espèces réactives oxygénées. Ce type de macrophage activé définit le type classique ou M1. Au début des années 1990, il a aussi été montré que l'IL-4 convertit les macrophages chez lesquels la production des dérivés oxygénés est inhibée suivie d'une augmentation de l'expression du récepteur de mannose (CD206). Ainsi, le concept d'activation alternative des macrophages, ou M2, a été posé. Un large spectre d'activation des macrophages a progressivement été défini où les M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires représentent les extrêmes (pour revue (Spellberg and Edwards, 2001)).

Les microbes possèdent des molécules appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) capables d'induire directement la sécrétion de cytokines en se liant à des récepteurs non polymorphes des cellules de l'immunité appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors). Plusieurs classes de récepteurs PRRs permettent de reconnaître de multiples PAMPs parmi eux les TLRs (Toll-Like Receptors). Les TLRs sont des récepteurs très conservés durant l'évolution qui jouent un rôle important dans l'immunité innée et notamment dans les mécanismes de défense de l'hôte contre les microorganismes.

La défense de l'hôte contre les pathogènes s'effectue par deux formes d'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée se met en place rapidement à la suite de l'infection et elle est caractérisée par une réponse non spécifique au pathogène avec une production de molécules inflammatoires et anti-pathogènes dans l'objectif de détruire le pathogène ou même simplement grâce à une présence de barrières épithéliales qui empêchent l'entrée des organismes étrangers. L'immunité adaptative quant à elle est mise en place progressivement au cours de l'infection avec pour objectif de prendre le relais en cas d'incapacité de l'immunité innée de venir à bout de l'infection. Initiée par la réponse immunitaire innée, l'immunité adaptative est mise en place par l'interaction des cellules présentatrices d'antigènes (APC) ; comme leur nom l'indique, ces cellules présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Les interactions font intervenir du côté des APC le complexe majeur d'histocompatibilité CMH qui présente le peptide antigénique reconnu par le récepteur des cellules T (TCR). Les cellules T recevront par ailleurs des signaux de costimulation *via* leurs récepteurs CD28 ou CTLA-4 par le CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) exprimés par les APCs. L'immunité adaptative fait intervenir les lymphocytes T et les anticorps produits par les cellules B avec pour objectif un ciblage précis du pathogène. En réalité, l'immunité innée et l'immunité adaptative restent deux réponses coordinatrices et indissociables pour une lutte efficace contre le pathogène.

La réponse immunitaire, innée et adaptative, pour la défense de l'hôte fait appel à des diverses cellules hématopoïétiques différenciées tout en limitant les dommages « collatéraux ». Pour ce faire, un des mécanismes est l'induction de phénotypes cellulaires assurant ainsi une plasticité fonctionnelle des cellules. Les cellules sanguines spécialisées sont issues des cellules souches multipotentes dont les différentes étapes de différenciation sont présentées ci-dessous **(Figure 9)**.

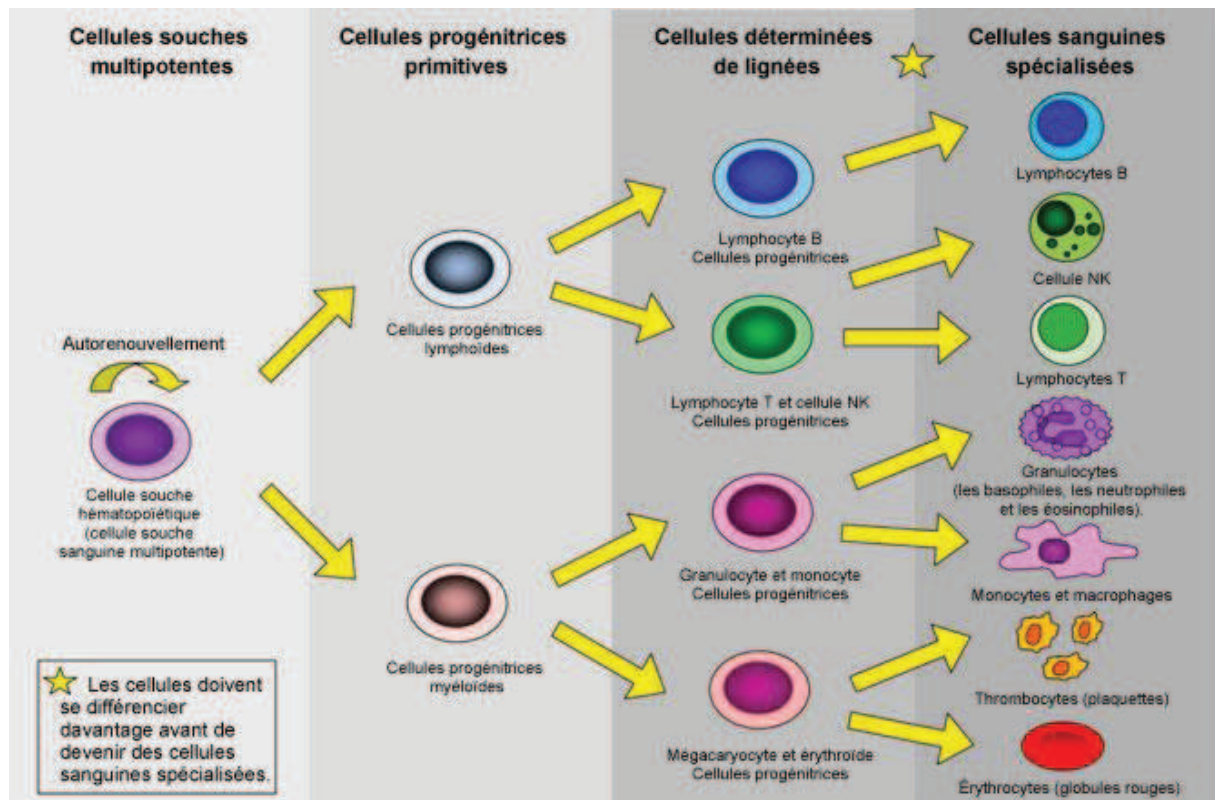


Figure 9 : Différenciation des cellules sanguines à partir des cellules souches multipotentes.

Pour résumer, une cellule souche multipotente est capable de se transformer en deux types de cellules progénitrices primitives :

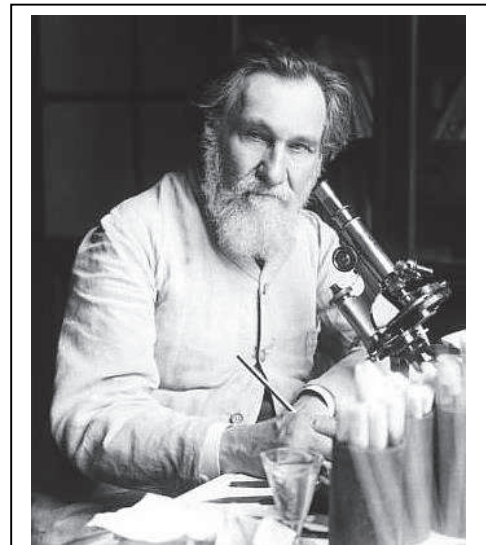
- Les cellules progénitrices lymphoïdes qui donneront à l'issue de leur différenciation les lymphocytes B, T et NK
- Les cellules progénitrices myéloïdes qui elles, se différencieront en érythrocytes, granulocytes, plaquettes ou monocytes/macrophages.

Dans ce chapitre, les caractéristiques phénotypiques associées aux fonctions particulières des macrophages seront abordées. Un accent particulier sera également mis sur le métabolisme du fer par les macrophages sous différents phénotypes.

III.2. Historique et découverte des macrophages

Cette année 2016 représente le centenaire de la mort du Dr Elie Metchnikoff, le père de l'immunité innée dont les travaux sur la phagocytose par les macrophages visant à éliminer les pathogènes ont largement inspiré les chercheurs au cours du dernier demi-siècle.

En 1891, il affirma notamment qu' « il n'est pas possible d'étudier les maladies en partant du principe que les pathogènes sont retrouvés uniquement dans le milieu extracellulaire »



Ilya Ilyich Mechnikov francisé en Élie Metchnikoff (1845 – 1916)

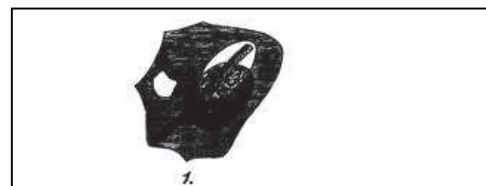
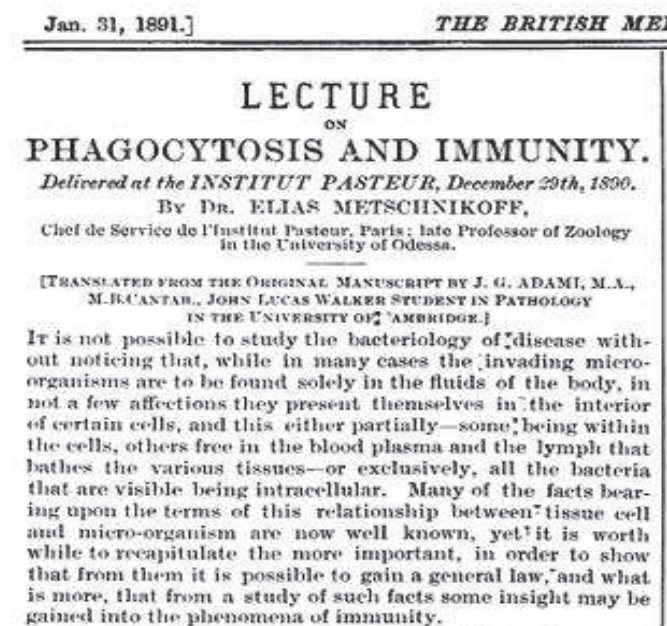


Fig. 4.—Phagocytes, macrophage and microphage, to show stages of digestion and destruction of bacilli, from spleen and eye respectively of white rat with anthrax. In 1 part of the bacillus is unaffected, but a vacuole has formed around the other part, which further has now lost the power of taking the stain. In 2, various stages are seen, the bacilli passing through the granular badly staining, to the vacuolated unstained, until finally but faint "shadows" are observable (Zeiss 1, oc. 3).

The facts enumerated thus far would seem to prove that there exists a certain antagonism between the microbes and the phagocytes, and this view is confirmed by the fact that in general the microbes find the interior of the phagocytes an unfavourable medium for their development and con-

Schéma original de Mechnikoff montrant le bacille d'anthrax dans le phagosome (Metschnikoff, 1891)

III.3. Origine des macrophages

Le système phagocytaire mononuclé est à l'origine de deux cellules importantes du système immunitaire : les macrophages et les cellules dendritiques (Doulatov *et al.*, 2010) avec des activités fonctionnelles bien distinctes malgré l'expression commune de plusieurs récepteurs retrouvés à leur surface. Les durées de vie des macrophages et des cellules dendritiques peuvent atteindre plusieurs années en fonction de la nature de la réponse immune

contrairement aux neutrophiles issus d'un système phagocytaire polynuclé par exemple qui ont une durée de vie limitée (Geissmann *et al.*, 2010). Les monocytes circulant peuvent pénétrer à l'intérieur des tissus où ils se différencient en macrophages. Selon leur localisation anatomique, la nomenclature des macrophages varie (Bosque *et al.*, 1997) (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Nomenclature des macrophages en fonction de leur localisation anatomique.

Organes	Nom du macrophage
Foie	Cellules de Kupffer
Rate	Macrophages spléniques
Poumons	Macrophages alvéolaires
Os	Ostéoclastes
Tissus conjonctifs	Histiocyte
Système nerveux central	Microglies
Peau	Cellules de Langerhans

III.4. Caractéristiques des macrophages

De taille variable entre 25 et 50 μM , les macrophages sont des cellules avec un noyau excentré, un cytoplasme abondant dans lequel se trouvent les organites parmi lesquels diverses granules et des vacuoles. Avec une membrane plasmique ondulée, les macrophages adhèrent au verre et au plastique. Ces cellules sont également caractérisées par un cytosquelette formé de microtubules et de filaments d'actine permettant la locomotion *via* la formation des pseudopodes lors de la phagocytose. Les macrophages expriment des récepteurs membranaires impliqués dans la médiation de la réponse immune parmi lesquels :

- Les Toll like récepteurs,
- Les récepteurs (FcR) de la portion constante des immunoglobulines (Ig) principalement IgG et IgE (Miyajima *et al.*, 1997),
- Les molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) I et II nécessaire à l'initiation de la réponse adaptative.
- Les récepteurs des facteurs de croissance, cytokines et chimiokines,

- Les récepteurs protéiques complexés comme les glycoprotéines de types lectines (CLR) retrouvés à la surface des macrophages reconnaissant les sucres tels que le mannose, le fucose et le galactose. On retrouve aussi les lipoprotéines permettant de reconnaître les LDL, les leucotriènes, la prostaglandine E2 (PGE2)
- Les macrophages expriment également des récepteurs impliqués dans le métabolisme du fer. Les détails sur ces récepteurs seront évoqués à la fin de ce chapitre (voir paragraphe III.7).

III.5. Rôle du macrophage dans l'immunité innée

Les macrophages expriment une variété de récepteurs, localisés au niveau de la membrane plasmique ou endosomale comme les TLR (Toll like receptors (TLR)) ainsi que des récepteurs cytosoliques comme les biosenseurs Nod-like récepteurs (NLR), qui reconnaissent des motifs associés aux pathogènes (PAMPs) et autres signaux de danger (DAMPs). L'interaction entre ces motifs et les différents récepteurs permet l'activation de la réponse immunitaire innée (pour revue, (Geissmann *et al.*, 2010; Gordon and Taylor, 2005)). Cette interaction induit une cascade de signalisation intracellulaire déclenchant la production des cytokines et des molécules antimicrobiennes comme le monoxyde d'azote et le monoxyde de carbone. Les macrophages peuvent être classés en deux grandes « familles » susceptibles de contenir des « sous-familles, genres et espèces » de macrophages. La plasticité phénotypique des macrophages leur permet de s'adapter à différentes conditions physiopathologiques (Stout *et al.*, 2005).

III.5.1. La « famille » des macrophages M1

Les macrophages M1 ou macrophages classiques sont des macrophages qui induisent une réponse pro-inflammatoire. La réponse pro-inflammatoire est dirigée par des stimuli spécifiques et qui conduisent à des cascades de signalisation spécifiques. Trois principaux stimuli conduisant au phénotype M1 des macrophages ont été décrits : l'IFN- γ , les produits bactériens stimulant les récepteurs TLR et les cytokines pro-inflammatoires :

III.5.1.1. L'IFN- γ :

L'IFN- γ une cytokine produite par les lymphocytes Th1, ILC1 et NK du milieu environnant, elle est reconnue par le récepteur IFNGR constitué de deux chaînes (IFNGR-1 et

IFNGR-2). L'interaction ligand-récepteur induit une cascade de signalisation conduisant à l'activation des facteurs de transcription STAT1 et IRF (IRF1 et IRF8) *via* une voie canonique ou non canonique (Johnson *et al.*, 2013; Martinez and Gordon, 2014). Il a été montré que l'expression d'IFN- γ est primordiale pour une réponse immunitaire Th1/M1 efficace puisque les macrophages des souris IFN- γ KO présentent un défaut de production des molécules antibactériennes provoquant une susceptibilité de ces souris à une infection par *Mycobacterium bovis* et *Listeria monocytogenes* (Dalton *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993). Chez l'homme, des mutations résultant d'un défaut d'expression du récepteur d'IFN- γ induit une susceptibilité aux infections mycobactériennes (Dorman and Holland, 2000) (**Figure 10**).

III.5.1.2. Les ligands des TLRs

Le LPS est le signal polarisant les macrophages M1 le plus étudié jusqu'à présent. Une activation du TLR4 par le LPS peut conduire à deux cascades de signalisations en fonction de la molécule adaptatrice MyD88 et TRIF (**Figure 10**):

- LPS-MyD88/Mal TIRAP-IRAK-TRAF6- IKK/MKK-I κ B/JNK p38-NF- κ B/AP-1
- LPS-TRIF/TRAM-TRAF6- IKK/TBK-NF- κ B/IRF

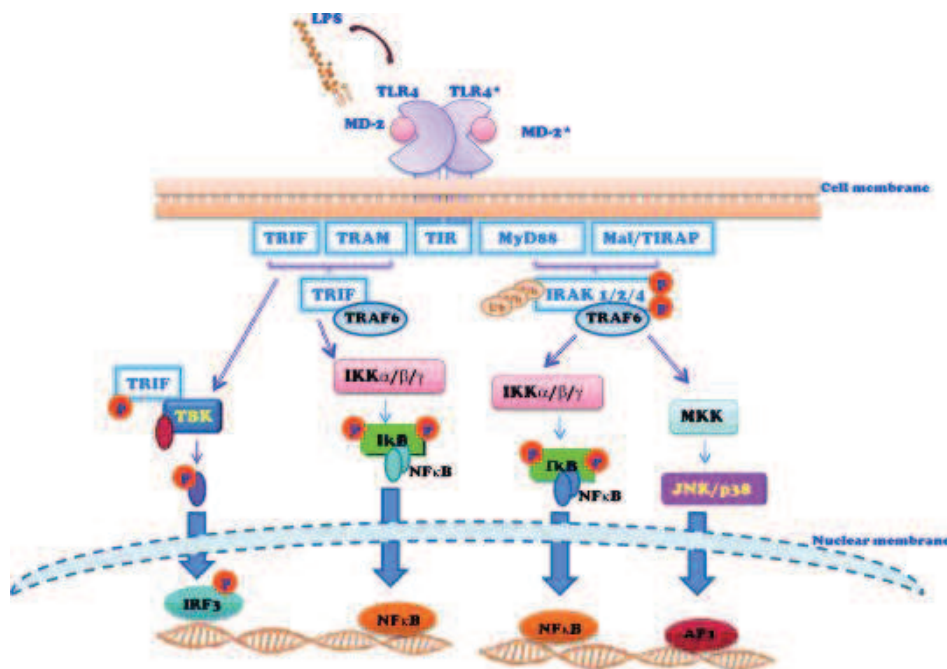


Figure 10 : Schéma des voies de signalisation résultant de l'interaction LPS-TLR4.

La fixation du LPS par le récepteur TLR4/MD-2 active deux voies différentes de transduction de signal. La voie MyD88-dépendante induit le recrutement des molécules adaptatrices MyD88 et TIRAP. Ceci conduit à la phosphorylation de la protéine IRAK et au recrutement de TRAF6 ce qui active NF- κ B et JNK/p38 induisant une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. La voie MyD88-indépendante active des facteurs de transcription, comme IRF3 qui conduit à la transcription d'autres cytokines pro-inflammatoires tels que les interférons de type 1 (Molinaro *et al.*, 2015).

L'activation des voies intracellulaires par le LPS induit une forte réponse inflammatoire par une production des cytokines (comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, le TNF- α et l'IFN- β), de chimiokines (CCL2, CXCL10 et CXCL11), des facteurs de présentation d'antigènes comme le CMH et des molécules de co-stimulations (Liu *et al.*, 2014; Martinez and Gordon, 2014). En général les souris TLRs KO sont susceptibles aux infections mycobactériennes dues à des défauts d'activation de leurs macrophages (Drennan *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2012). De plus, chez l'homme, le polymorphisme génétique de TLR4 (TLR4 896 A/G (Asp299Gly)) induit une susceptibilité aux infections mycobactériennes (Najmi *et al.*, 2010).

III.5.1.3. Le facteur de croissance granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) :

Le GM-CSF est produit par une variété de types cellulaires parmi lesquels les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les lymphocytes. La liaison GM-CSF à son récepteur (GM-CSFR), déclenche le recrutement de la molécule JAK2 induisant des voies de signalisation (ERK et AKT) et l'activation de facteurs de transcription (STAT5, NF- κ B et IRF5) ce qui conduit à la prolifération, la différenciation et la polarisation des macrophages en type M1 (**Figure 11**) (Krausgruber *et al.*, 2011).

III.5.2. La « famille » des macrophages M2

Les stimuli des macrophages M2 sont groupés principalement par leur capacité à induire des réponses anti-inflammatoires. Le phénotype M2 des macrophages est induit par les principaux éléments cités ci-dessous :

III.5.2.1. TLR :

L'activation de TLR2 ainsi que le TLR4 d'une manière beaucoup plus tardif conduit à la polarisation des macrophages en M2. En effet, l'hétéromère TLR1/TLR2 et l'homodimère TLR4 reconnaissent des peptidoglycanes, lipoprotéines et lipopolysacharides, localisés au niveau de la paroi mycobactérienne (Hossain and Norazmi, 2013; Killick *et al.*, 2013).

III.5.2.2. L'IL-4 et IL-13

Ces cytokines sont produites par les cellules Th2, les éosinophiles, les mastocytes, les basophiles et les macrophages, l'IL-4 est reconnue par son récepteur IL-4R α 1 qui est capable d'interagir avec la chaîne γ C. La liaison de l'IL-4 à son récepteur active JAK1 et JAK3 aboutissant à l'induction et à la translocation du facteur de transcription STAT6 et IRF4 (**Figure 11**). (Van Dyken and Locksley, 2013). Une déficience de l'IL-4 chez les souris induit un défaut de réponse immune durant des infections par des nématodes et chez les hommes le polymorphisme de l'IL-4R est associé avec le développement de l'asthme et d'atopies (Beghe *et al.*, 2003; Ford *et al.*, 2009)

III.5.2.3. Les Immunoglobulines G

Ce sont des glycoprotéines reconnues par le récepteur Fc γ . La signalisation FcR induit une activation des facteurs Syk et PI3K (**Figure 11**) (Sanchez-Mejorada and Rosales, 1998). Il a été montré que les animaux FcR KO ont une capacité réduite de phagocytose et que chez l'homme, des différences génétiques en termes de FcRs contribuent aux maladies autoimmunes comme le lupus érythémateux, l'arthrite et la sclérose multiple (Takai, 2002)

III.5.2.4. IL-10

Cette cytokine se lie à son récepteur IL-10R formé du dimère IL-10R1 et IL-10R2. Une autophosphorylation du récepteur conduit à l'activation du facteur de transcription STAT3 (**Figure 11**) et sa liaison est impliquée dans l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10 est une molécule impliquée dans la réponse immune Th2 et elle est également considérée comme une source potentielle d'inhibition des cellules Th1 (Fiorentino *et al.*, 1989). Les souris IL-10 KO développent des maladies inflammatoires intestinales suivies d'une colonisation par des bactéries entériques résidentes (Sellon *et al.*, 1998), et une exacerbation de la réponse inflammatoire suite à une infection par *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1996). Sur le plan clinique, une exacerbation de la colite est observée en cas d'un défaut d'expression des récepteurs de la cytokine IL-10 (Glocker *et al.*, 2009).

III.5.2.5. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones secrétées par les glandes surrénales et métabolisées par des enzymes cellulaires des macrophages. Les glucocorticoïdes actifs de nature lipophile se lient au récepteur du glucocorticoïde GCR, conduisant à la translocation du complexe dans le noyau (**Figure 11**). Une fois à l'intérieur du noyau le complexe glucocorticoïde et son récepteur se fixe sur l'ADN pour réguler la transcription des gènes ou interagir avec des facteurs de transcription comme le NF- κ B ou AP-1.

III.5.2.6. M-CSF

Le récepteur de M-CSF est un récepteur transmembranaire à tyrosine kinase. La liaison M-CSF liée au récepteur dimérique M-CSFR conduit à l'activation ERK et PI3K (**Figure 11**) (Martinez and Gordon, 2014).

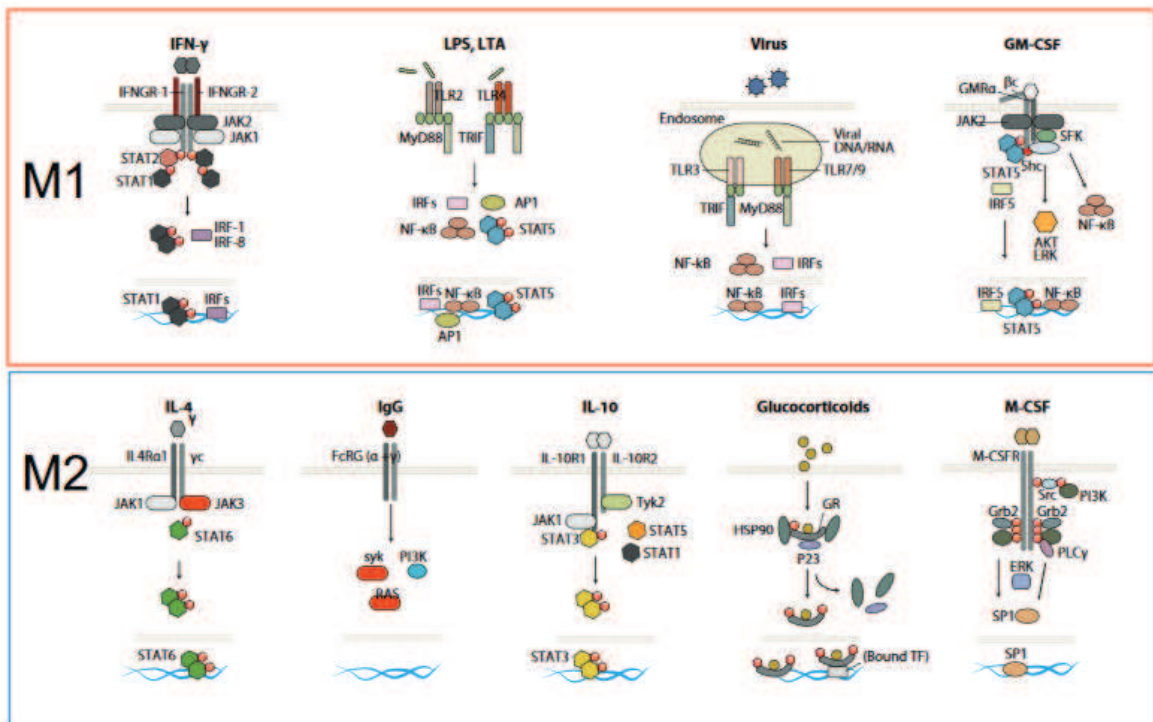


Figure 11 : Récapitulatif des principaux stimuli et voies de signalisations intracellulaires intervenant dans la polarisation des macrophages. (Martinez and Gordon, 2014).

III.5.3. Chevauchement des macrophages M1 avec les macrophages M2

La notion de bipolarisation des macrophages (M1 *versus* M2) dans la biologie des macrophages n'est plus d'actualité. En effet entre les deux pôles de macrophages, se trouvent des macrophages aux profils intermédiaires pouvant même exprimer les marqueurs M1 et M2 à la fois (**Figure 12**). De plus en plus des marqueurs de surfaces ou solubles sont attribués à chaque nouvelle catégorie de macrophages identifiés. Ces marqueurs peuvent être des marqueurs membranaires, cytokiniques et chimiokiniques, des récepteurs de cytokines et de chimiokines et pour finir des molécules effectrices.

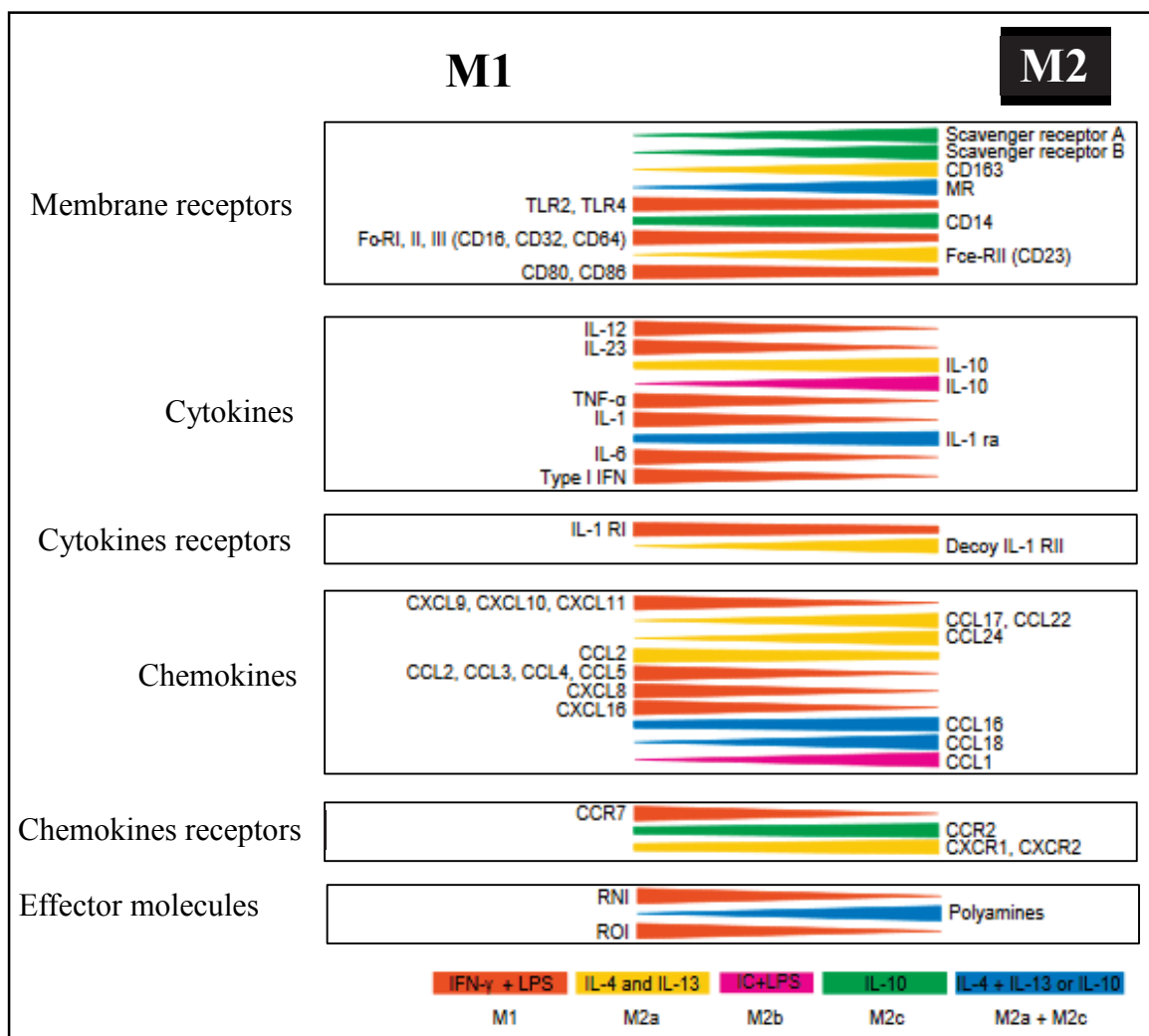


Figure 12 : Représentation phénotypique des macrophages M1, M2a, M2b, M2c et M2a + M2c.

Le niveau des différents marqueurs spécifiques est indiqué par l'épaisseur des bandes colorées en fonction de la catégorie des macrophages (Mantovani *et al.*, 2004).

III.6. Les macrophages au centre du recrutement des cellules immunitaires

L'orientation de la réponse inflammatoire est le résultat de la sécrétion de molécules chimioattractives pour les cellules spécifiques. En effet durant la polarisation de la réponse immune, les macrophages modifient le répertoire des chimiokines sur le site d'infection induisant ainsi un recrutement cellulaire spécifique.

III.6.1. Association des macrophages M1 avec une réponse Th1

La polarisation M1 conduit à la production des chimiokines CCL5, CXCL9, 10, 11 et 16 contribuant au recrutement des lymphocytes Th1, Tc1 et NK. Ces lymphocytes par la suite produisent l'IFN- γ nécessaire à l'amplification de la réponse M1 et Th1 crucial pour lutter contre les infections intracellulaires et la résistance tumorale (**Figure 13**). Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer Cells), les ILC1 et les lymphocytes T produisent de l'interféron- γ nécessaire à l'activation des macrophages classiques ou pro-inflammatoires avec des activités tumoricide et microbicide (Mosser and Edwards, 2008). Ces macrophages pro-inflammatoires produisent des cytokines comme le TNF, IL-12, IL-1 β et l'IL-23 induisant des réponses cellulaires antigène-spécifique Th1 et Th17 (Krausgruber *et al.*, 2011; Mosser and Edwards, 2008). Ces cellules sont connues en tant que médiateurs importants dans des maladies inflammatoires chroniques et autoimmunes comme l'arthrite rhumatoïde, la fibrose pulmonaire et la maladie de Crohn's (Smith *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2010; Woollard and Geissmann, 2010).

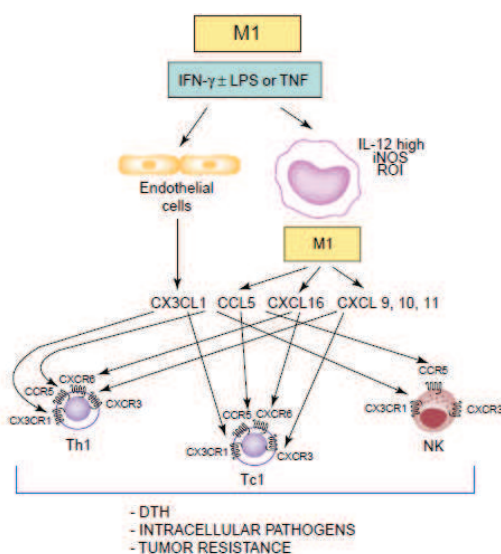


Figure 13 : Mobilisation des lymphocytes Th1 par les macrophages M1.

Une stimulation des cellules endothéliales et des macrophages M1 conduit à la production des chemoattractants CX3CL1, CCL5, CXCL9, 10, 11, 16. Ces chimiokines permettront le recrutement des lymphocytes Th1, Tc1 et NK nécessaire pour la mise en place de réponse immunes, comme la réaction d'hypersensibilité retardée (Delayed Hypersensitivity Reaction, DTH), la destruction des pathogènes intracellulaires et la réponse anti-tumorale (Mantovani *et al.*, 2004).

III.6.2. Association des macrophages M2 avec une réponse Th2

En ce qui concerne les macrophages M2 qui sont généralement subdivisés en trois groupes, il est connu que les M2a produisent le CCL17, 18, 22 et 24 qui contribuent au recrutement des basophiles, éosinophiles ainsi que les lymphocytes T naïfs, Th2, Tc2 et Treg. Quant aux macrophages M2b, ils produisent essentiellement la chimiokine CCL1 nécessaire au recrutement des éosinophiles et des lymphocytes Th2, Tc2 et Treg. Pour finir, les macrophages M2c, activés par de l'IL-10 produisent les chimiokines CCL16, CCL18 et CXCL13 qui contribuent au recrutement des éosinophiles, des lymphocytes T naïfs et des cellules folliculaires B (Figure 14).

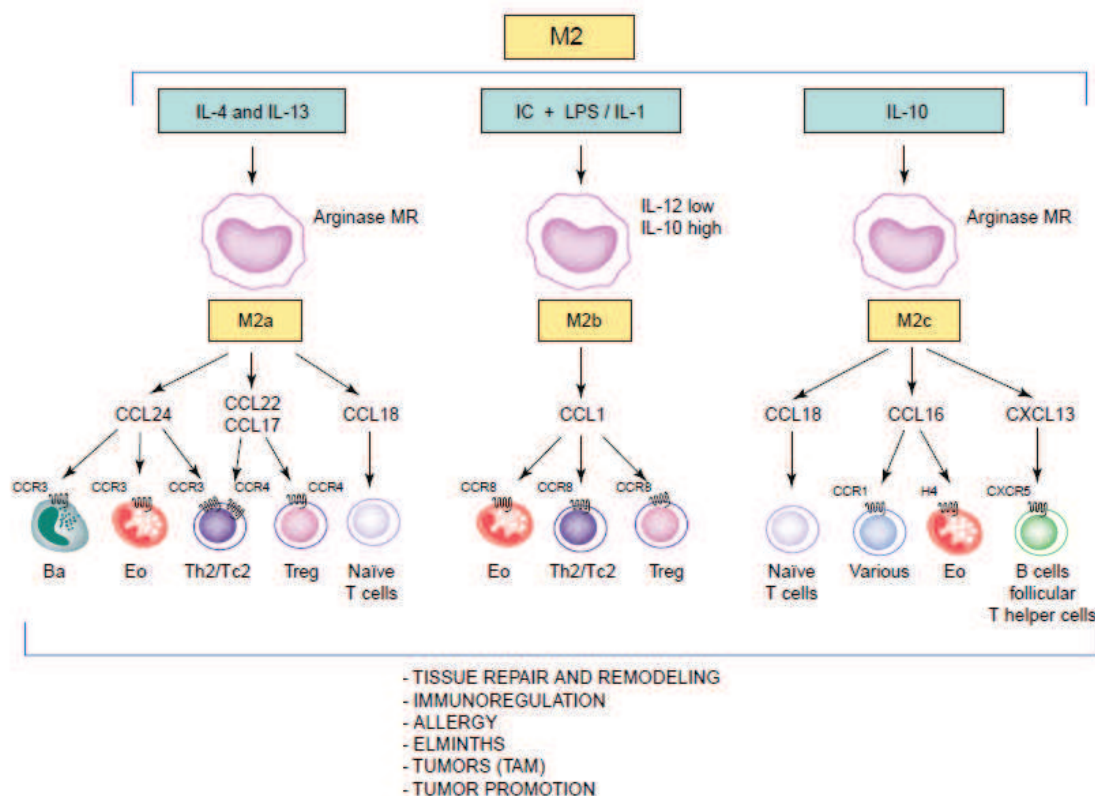


Figure 14 : Mobilisation des cellules immunitaires impliquées dans la réponse Th2 par les macrophages M2. Une stimulation des macrophages M2a, M2b et M2c par les ligands IL-4, IL-13, par des complexes immuns (IC) associés au LPS ou à l'IL-1 β et l'IL-10 induit la production des chimiokines CCLs 24, 22, 17, 18, 1, 16 et CXCL13. La reconnaissance de ces ligands par des récepteurs spécifiques des cellules T et des granulocytes induit le recrutement des basophiles, éosinophiles, lymphocytes Th2/Tc2 et lymphocytes Treg, cellules T naïves et des cellules T helper folliculaires. Les réponses immunes induites par ces cellules comprennent la réparation tissulaire, l'immunorégulation, l'allergie et la promotion des tumeurs (Mantovani *et al.*, 2004).

Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2 sont principalement voués à des activités suppressives et immunorégulatrices. Elles s'opposent aux activités cytotoxiques de la réponse des macrophages M1, atténuant l'inflammation et supprimant l'immunité anti-tumorale. Ces macrophages M2 favorisent le remodelage tissulaire, l'angiogenèse et le processus de cicatrisation (Gordon and Taylor, 2005; London *et al.*, 2011). Les macrophages régulateurs qui secrètent l'IL-10 ont des rôles similaires dans des réponses immunes adaptatives. Les macrophages régulateurs facilitent également la maintenance de l'homéostasie immune dans l'intestin en induisant le développement des cellules T régulatrices (Hadis *et al.*, 2011). L'activation des macrophages alternatifs est induite par une variété des cellules productrices d'IL-4, d'IL-13 parmi lesquelles les mastocytes et basophiles (Maizels *et al.*, 2009). Les lymphocytes Th2 sont connus pour être des principaux inducteurs des cellules M2 quand la réponse immune adaptative est activée.

III.7. Homéostasie du fer dans les macrophages

La quantité de fer absorbé quotidiennement (1-2 mg) représente une quantité infime par rapport au fer total de l'organisme (4000 – 5000mg). Ainsi le recyclage du fer endogène paraît primordial dans l'objectif de maintenir le niveau de fer requis pour assurer la demande de fer chez les mammifères. Les macrophages participent au métabolisme du fer par des processus d'acquisition, de recyclage, de transport et de stockage.

III.7.1. Acquisition du fer par les macrophages

Il existe plusieurs récepteurs et transporteurs exprimés à la surface membranaire qui interviennent dans le processus d'acquisition du fer au niveau des macrophages.

III.7.1.1. Le récepteur de la transferrine 1

Ce récepteur exprimé ubiquitairement à la surface des cellules interagit avec l'holotransferrine (complexe formé de la transferrine et de deux molécules de fer Fe^{3+}). L'interaction entre le récepteur de la transferrine et l'holotransferrine induit une endocytose médiée par la clathrine conduisant à la formation de l'endosome. A l'intérieur de l'endosome, une dissociation des deux molécules de fer du reste du complexe se produit et s'en suit une

réaction de réduction du fer ferrique en fer ferreux par la métalloréductase Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3 (STEAP3) (**Figure 15**) (Sendamarai *et al.*, 2008).

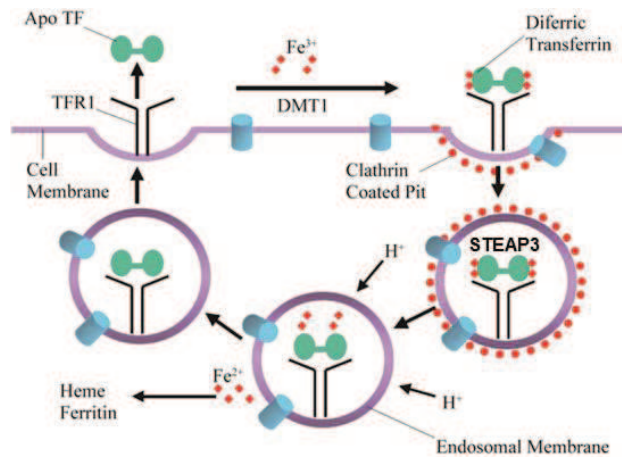


Figure 15 : Mécanisme d'internalisation de l'holotransferrine.

Le récepteur de la transferrine exprimé à la surface des cellules interagit avec l'holotransferrine induisant une endocytose médiée par la clathrine. Le fer lié à la transferrine est alors libéré grâce à l'enzyme STEAP3. La sortie du fer des endosomes s'effectue par le transporteur DMT1. La transferrine et son récepteur sont recyclés grâce à la fusion des membranes endosomale et cellulaire et le fer intracellulaire peut ainsi contribuer à la formation de l'hème ou s'associer à la ferritine.

III.7.1.2. Les récepteurs des protéines de l'hème :

Les travaux de Kristiansen *et al* et Hvidberg *et al* publiés respectivement en 2001 et 2005 ont permis d'identifier les clusters de différenciation CD91 et CD163 comme des récepteurs des complexes Hème-hémopexine et hémoglobine-haptoglobine respectivement (Hvidberg *et al.*, 2005; Kristiansen *et al.*, 2001). La fixation de ces complexes à leurs récepteurs spécifiques induit l'endocytose des ligands et le recyclage des récepteurs (**Figure 16**). L'hème retrouvé dans les endosomes est ainsi exporté dans le cytosol par l'intermédiaire du transporteur de l'hème « Heme-Responsive Gene Protein 1 » (HRG1) (White *et al.*, 2013).

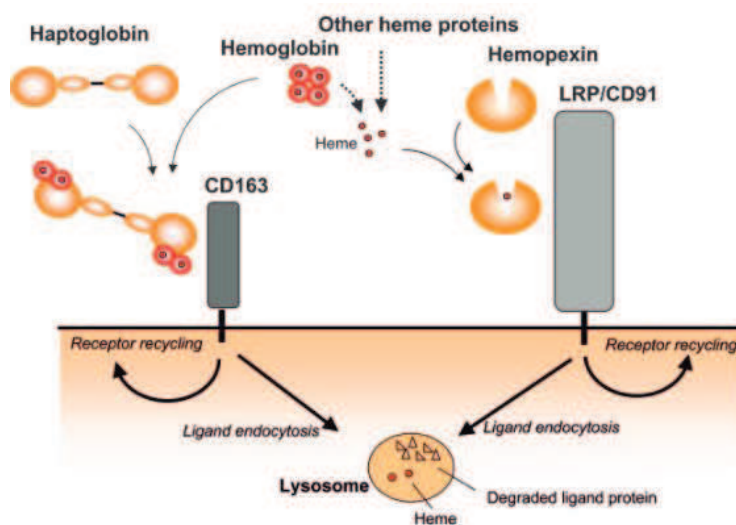


Figure 16 : Mécanisme d'acquisition du fer hémique

Les complexes haptoglobine-hémoglobine et hème-hémopexine se fixent respectivement sur les récepteurs CD163 et CD91 induisant une endocytose des ligands. Par la suite, le recyclage des récepteurs est effectué ((Hvidberg *et al.*, 2005))

III.7.1.3. Le récepteur de la lipocaline 2 (24p3R)

La lipocaline 2 ou sidéocaline est une molécule inflammatoire produite entre autre par les neutrophiles et les macrophages dont l'objectif principal est de réduire ou neutraliser les facteurs d'acquisitions du fer produit par les bactéries (les sidérophores) durant une infection. Le récepteur 24p3R reconnaît le complexe Lcn2-fer-sidérophore suivi de son internalisation. La lipocaline 2 est internalisée conduisant à la formation d'un endosome tardif contrairement à la transferrine qui s'arrête à un endosome précoce.

III.7.1.4. L'erythrophagocytose

Un autre moyen d'acquisition du fer non lié est le processus de phagocytose des érythrocytes. Une fois dans le phagolysosome, se produit la protéolyse et la dégradation de l'hème aboutissant à la libération du fer (se référer au chapitre 2 II. 2. 3).

III.7.1.5. Le ZIP8/14

Ces deux transporteurs appartiennent à la famille des « ZRT IRT-like Protein » (ZIP), une nouvelle famille de protéines, transporteur de plus de 14 ions métalliques identifiés à l'origine chez les plantes (Eide *et al.*, 1996). Initialement caractérisés pour le transport du zinc, ces transporteurs sont impliqués également dans le transport des autres ions cationiques parmi lesquels le cadmium, le fer et le zinc. Deux transporteurs, ZIP8 et ZIP14 sont impliqués dans le transport du fer ferreux et l'expression à la surface cellulaire de ces protéines est augmentée en condition de surcharge de fer. L'expression de ZIP14 est abondante dans le foie, le pancréas et le cœur, les trois principaux organes accumulant l'excès de fer dans les hémochromatoses héréditaires. Quant au transporteur ZIP8, il est exprimé majoritairement au niveau du poumon, le placenta et le pancréas (Liuzzi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012).

III.7.2. Sortie du fer des organites intracellulaires vers le cytosol

La sortie du fer des endosomes utilise les transporteurs DMT1 et Nramp1 qui sont exprimés à la surface des endosomes.

III.7.2.1. Divalent Metal Transporter 1 (DMT1)

Ce transporteur est impliqué dans le processus d'absorption du fer au niveau des entérocytes. Il intervient également dans l'export du fer Fe^{2+} des endosomes vers le cytosol des macrophages et des cellules érythroïdes. Le transport du fer par DMT1 est en effet pH dépendent. Deux formes alternatives résultant de l'épissage des exons 3' donnent des ARN avec ou sans IRE, ainsi qu'un épissage alternatif en région 5' produisent des isoformes variées dont les fonctions ne sont pas complètement définies. Le DMT1 est codé par le gène *SLC11A2* et des mutations dans ce gène conduisent à une anémie microcytaire hypochromique.

III.7.2.2. Natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1)

Cette protéine est codée par le gène *SLC11A1* et exprimée dans les lysosomes est recrutée à la membrane des phagosomes induisant la sortie du fer de ces derniers lors d'une phagocytose de pathogènes. Ce mécanisme permet un appauvrissement du fer intraphagosomal améliorant la résistance de l'hôte face aux infections intracellulaires.

III.7.3. Sortie du fer des macrophages par la ferroportine

Une fois dans le cytosol des macrophages, l'export du fer vers le milieu extracellulaire se fait par l'intermédiaire de la ferroportine. Malgré les voies d'entrée du fer multiples, la ferroportine reste la seule et unique voie connue à ce jour de sortie du fer ferreux des macrophages. La sécrétion de la ferritine ou l'export de l'hème constituent également des mécanismes indirects de sortie du fer des macrophages.

III.8. Polarisation des macrophages et statut en fer

Une étude récente publiée par Corna *et al* a permis d'établir un lien entre le profil des macrophages et leurs activités fonctionnelles dans l'homéostasie du fer. Dans cette étude ils ont mis en évidence que les macrophages M1 obtenus après une stimulation avec de l'IFN- γ ont une réduction de l'activité de fixation de IRP (Iron Regulatory Protein), une faible expression du récepteur de la transferrine TfR1, de CD163, de la ferroportine et de l'hème oxygénase-1, mais une expression importante de la céruloplasmine par rapport aux macrophages M2. Les

auteurs ont également montré que ces macrophages présentent un niveau de fer intracellulaire Fe^{2+} libre (Labile Iron Pool) faible et une augmentation du niveau protéique de la ferritine H et une capacité restreinte en termes d'internalisation et de recyclage du fer. Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2 résultant d'une activation par de l'IL-4 avec le M-CSF avaient un taux de fer intracellulaire importante, une expression de TfR1, CD163 et hème oxygénase plus élevée en corrélation avec une activité de recyclage de fer plus marquée. **(Figure 17)** (Corna *et al.*, 2010).

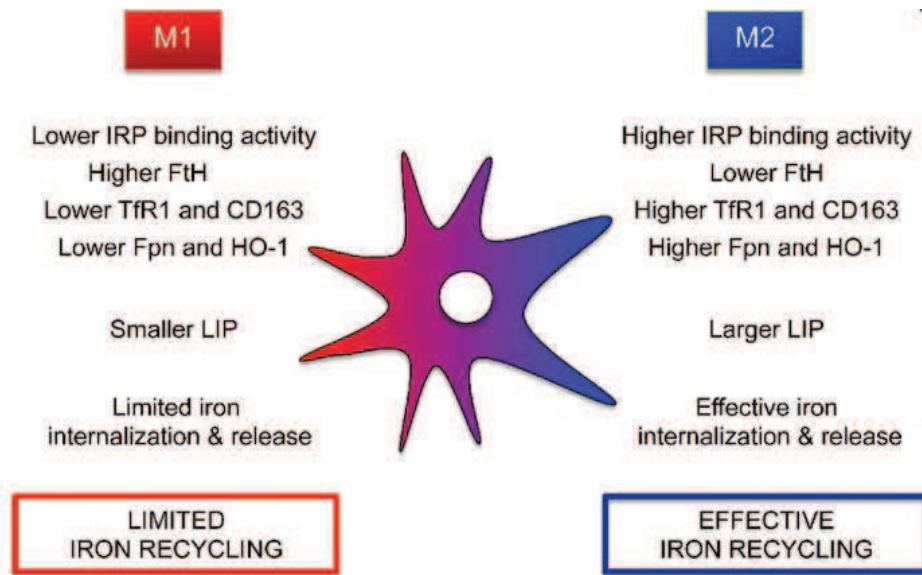


Figure 17 : Caractéristiques phénotypiques des macrophages M1 et M2 en fonction des marqueurs du métabolisme du fer.

IRP, iron regulatory protein; FtH, ferritin H; TfR1, transferrin receptor 1; CD163, cluster of differentiation 16; HO-1, heme oxygenase 1; LIP, labile iron pool (Corna *et al.*, 2010).

Chapitre 4 : Interactions hôte-pathogènes pour la lutte martiale

Les interactions hôte-pathogènes sont caractérisées par des réponses dynamiques entre le pathogène et l'hôte durant le processus d'infection. La survie de la bactérie au sein de l'hôte requiert des exigences minimales en termes de nutriments (acides aminés, glucides, oligo-éléments). L'acquisition de certains oligo-éléments comme le fer par le pathogène est crucial pour un fonctionnement optimal des enzymes et facteurs de transcription. Durant l'infection, l'hôte met en place des mécanismes de défense visant à priver les pathogènes de ces éléments nutritifs : c'est l'immunité nutritionnelle.

L'immunité nutritionnelle est un processus par lequel un organisme hôte séquestre les oligo-éléments dans l'objectif de limiter leur acquisition par les pathogènes lors d'une infection. En effet, les concentrations des oligo-éléments comme le fer et le zinc diminuent durant une infection menant à une hypoferrémie et une hypozincémie respectivement.

La concentration de fer circulant comme nous l'avons abordée dans le chapitre 2 est le résultat d'un mécanisme impliquant l'axe hepcidine-ferroportine pour limiter la sortie du fer des entérocytes après une absorption de fer alimentaire, des macrophages spléniques après un recyclage du fer et des hépatocytes pour le fer stocké. Le pathogène riposte en produisant des molécules à forte affinité pour le fer connues sous le nom de sidérophores au pouvoir captatif du fer plus élevé et sophistiqué.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser particulièrement aux mécanismes de défense de l'hôte par la mise en place d'une réponse immune innée et adaptative face aux mycobactéries en premier lieu. D'autre part les stratégies de séquestrations du fer par l'hôte durant une infection mycobactérienne et les mécanismes d'acquisition du fer par *Mycobacterium* durant une infection seront évoqués.

IV.1. Caractéristiques des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles acido-alcoolorésistants (BAAR) en d'autres termes qui résistent à une décoloration à l'acide ou à l'alcool après une coloration grâce à la présence jusqu'à 60% de lipides au niveau de la paroi bactérienne de *Mycobacterium tuberculosis* par exemple (**Figure 18**). Basé sur ce principe, une coloration spécifique : la coloration Ziehl-Neelsen est utilisée pour les caractériser (**Annexe 1**).

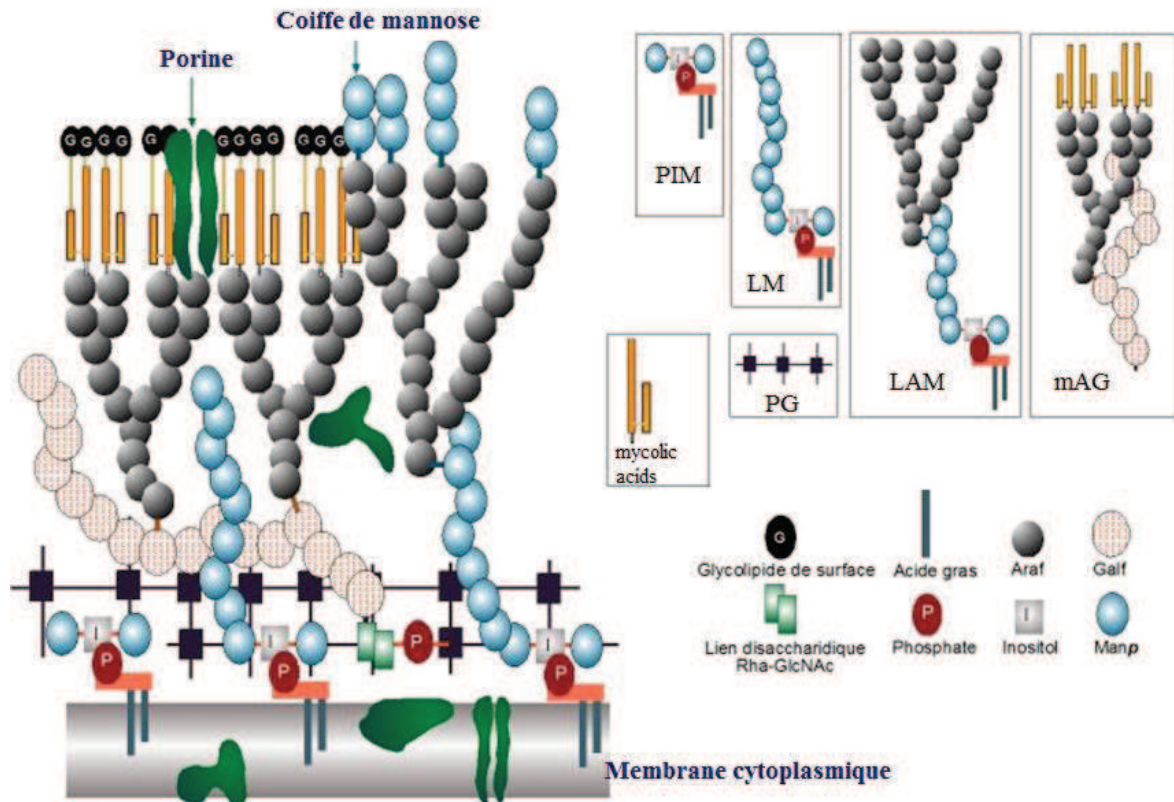


Figure 18 : Schéma montrant les molécules impliquées dans la formation de la paroi mycobactérienne. PIM, Phosphatidyl Inositol Mannoside; LM, LipoMannane; LAM, LipoArabinoMannane; mAGP, complexe mycolyl Arabino Galactan-Peptidoglycan; PGN, Peptidoglycan; MA, Mycolic Acid; Araf, Arabinose; Galf, Galactose; ManP, Mannose (Adapté de (Chatterjee, 1997))

Les mycobactéries peuvent être classées en fonction de leur rapidité de croissance : a) les espèces à croissance rapide (avec un temps de génération compris entre 2 – 3 h) ; c'est l'exemple de *M. aurum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* et *M. vaccae*. b) Les espèces à croissance lente dont le temps de génération est estimé à 20h) : *M. avium*, *M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. marinum* et *M. tuberculosis* (Goude and Parish, 2008).

Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* comprend des espèces pathogènes comme *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum* ainsi que l'espèce *M. microti* non pathogène pour l'homme.

IV.2. Contexte d'étude d'infection mycobactérienne

IV.2.1. Historique, prévalence et incidence de la tuberculose

La tuberculose (TB), maladie décrite comme contagieuse par Avicenne (980- 1037) dès le 11^{ème} siècle reste un problème de santé publique majeur 10 siècles plus tard. Les populations défavorisées (conditions socioéconomiques défavorables, accès aux soins difficile) dans les pays sous-développés et développés sont les plus touchées. De plus l'association à d'autres maladies comme le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)/sida et l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques ont donné un regain d'intérêt pour lutter définitivement contre cette maladie. La tuberculose commence par une infection par le bacille tuberculeux ou bacille de Koch (BK), en référence à Robert Koch qui identifia la bactérie pour la première fois en 1882. Au cours de cette primo-infection tuberculeuse, qui passe le plus souvent inaperçue sur le plan symptomatique, le BK se multiplie à l'intérieur des cellules phagocytaires comme les macrophages, qui sont l'une des premières lignes de défense du système immunitaire. Une réponse de l'immunité cellulaire permet alors le plus souvent de contenir le bacille dans le foyer de primo-infection.



Avicenne (980 – 1037)

La tuberculose humaine partage avec le VIH/sida le podium malheureux du classement des maladies les plus mortelles au monde (1.5 million pour la TB et 1.2 million pour le VIH/sida avec 0.4 million de co-infection TB-VIH/sida) en 2015. D'une manière plus synthétique, la TB a fait 3 morts/minute en 2015. Dans la même année 9.6 millions de personnes ont développé la tuberculose active (5.4 millions d'hommes, 3.2 millions de femmes et 1 millions d'enfants) soit 20 nouveaux cas de TB par minute. Actuellement 1 personne sur 3 dans le monde est infectée par *M. tuberculosis* (soit 2,5 milliards). Généralement un système immunitaire compétent de

l'hôte est capable de contenir l'infection. Ainsi seulement 5% des personnes infectées par *Mtb* peuvent développer la maladie et ce le plus souvent en condition d'immunodéficience.

IV.2.2. Stratégies mondiales de lutte contre la tuberculose

L'année 2015 était censée être le tournant majeur en termes de développement mondial puisque cette année était la date limite pour atteindre les objectifs du millénaire pour le développement (OMD) qui s'étaient de 2000 à 2015 définis lors du sommet du millénaire à New York (du 6 au 8 septembre 2000). L'objectif 6 de ces fameux OMD se focalisait sur la lutte contre le VIH/sida, la tuberculose, le paludisme et d'autres maladies. En dépit des efforts réalisés pour combattre la tuberculose selon le plan stratégique « The Stop TB strategy at a glance » (qui s'étale de 2006 à 2015) inclus dans les OMD, la TB a fait plus de 1.5 millions de morts en 2015. Un nouveau plan stratégique (The End TB strategy) a été adopté en mai 2014 visant à réduire de 90% la mortalité due à la tuberculose d'ici 2030. Il est à préciser qu'un monde « TB-free » est une affaire de sécurité mondiale puisque la transmission de la maladie par voie aérienne facilite la contamination. De plus, le monde n'a jamais connu de mouvements de population aussi importants (vacances, études, commerces, migrations...) que ces dernières années. En dépit des bonnes volontés des uns et des autres pour combattre cette maladie, l'OMS estime un déficit de 2.7 milliards d'euros pour venir à bout de la tuberculose. En France, 4934 (dont 61% d'hommes) déclarations de cas de la tuberculose ont été enregistrées en 2013. En région Centre (France) on dénombre entre 5 – 8 cas de tuberculose pour 100.000 habitants en 2013 (Aït Belghiti and Antoine, 2015). Néanmoins une prise en charge efficace des personnes atteintes de la maladie permet de les guérir de l'infection.

IV.2.3. Causes de la tuberculose

La tuberculose humaine est causée par les agents *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) et *Mycobacterium bovis* (*Mb*). Les deux espèces précitées sont génétiquement identiques à un taux supérieur à 99.95% (Garnier *et al.*, 2003). *M. bovis* est également à l'origine du vaccin antituberculeux mis au point par Albert Calmette et Camille Guérin. La transmission de la maladie se fait principalement en présence d'une personne atteinte de la forme pulmonaire de la maladie. De plus les bovins infectés par *M. bovis* peuvent transmettre la TB à l'homme par ingestion de lait cru de vaches contaminées par *M. bovis* ou par un contact rapproché avec les

animaux infectés par la bactérie (Cosivi *et al.*, 1998). La tuberculose causée par *M. bovis* représente 3,1% des cas de tuberculose avec des proportions beaucoup plus importantes dans des zones où l'activité de l'élevage du bétail est importante (par exemple 16% des cas de la tuberculose en Tanzanie) (El-Sayed *et al.*, 2016). Grâce au processus de pasteurisation systématique, les pays industrialisés ont réussi à réduire significativement les cas de zoonose provoqués par *M. bovis*.

IV.2.4. Cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)

Comme résumé sur la **figure 19** ci-dessous, le processus infectieux de *Mtb* passe par une transmission des mycobactéries par inhalation par un individu sain d'aérosols rejetés par un individu malade. Les mycobactéries infectent les macrophages *via* un processus de phagocytose « inachevé » permettant à la bactérie de se multiplier dans les phagosomes. Une réaction immédiate de l'hôte dans ces conditions permet ultérieurement le recrutement des cellules immunitaires sur le site des phagocytes infectés comme les lymphocytes. L'ensemble des cellules immunitaires forment des structures bien organisées appelées granulomes visant à contenir les mycobactéries extraphagocytes ou intraphagocytes (**Figure 20**). L'entrée en nécrose du granulome permet par la suite une multiplication extracellulaire mycobactérienne importante, une infection de nouveaux phagocytes et un risque de propagation de la maladie (**Figure 19**).

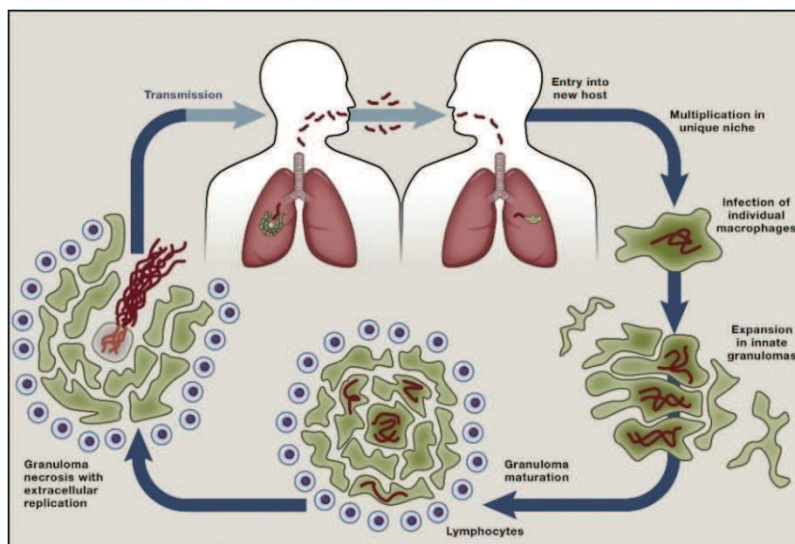


Figure 19: Cycle de *Mtb*.

Les mycobactéries expectorées par un individu malade et inhalées par un individu sain infectent les macrophages de ce dernier. Par la suite la formation de granulomes se met en place. La destruction du granulome conduit à la prolifération mycobactérienne et entraîne ainsi un nouveau cycle d'infection (Cambier *et al.*, 2014a).

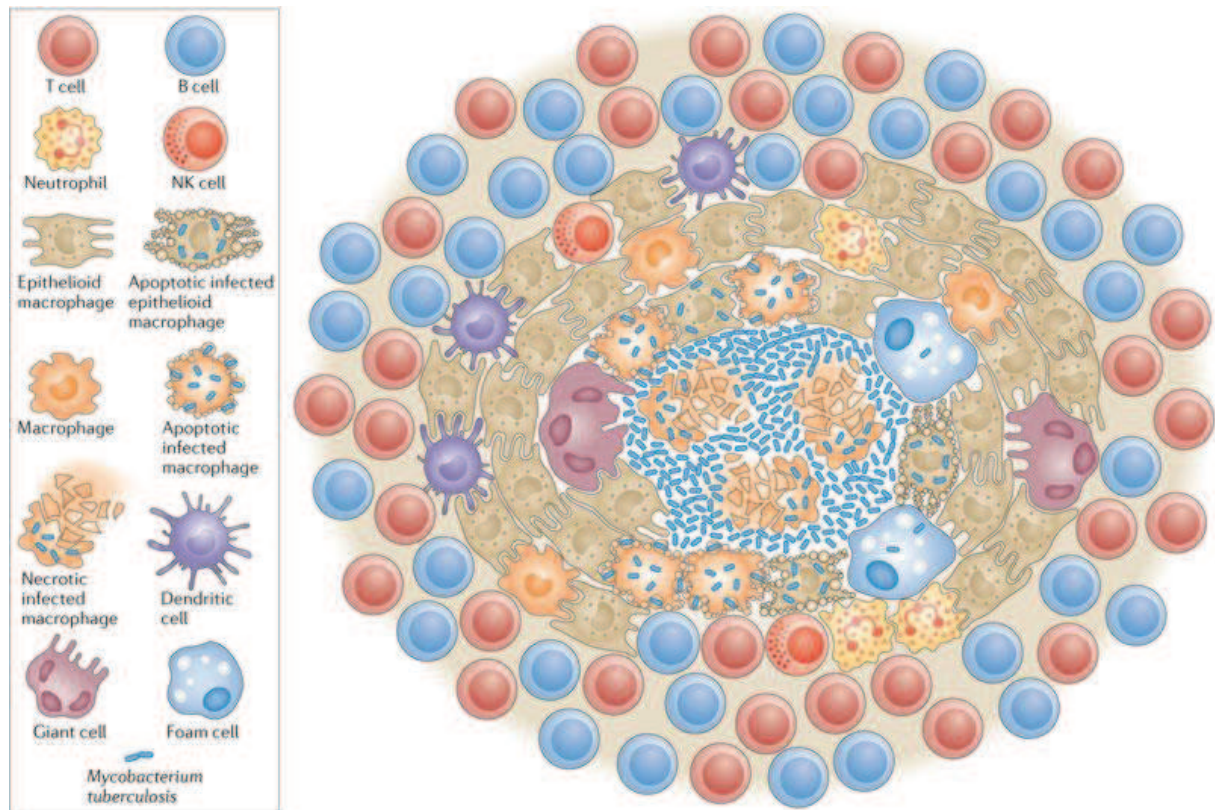


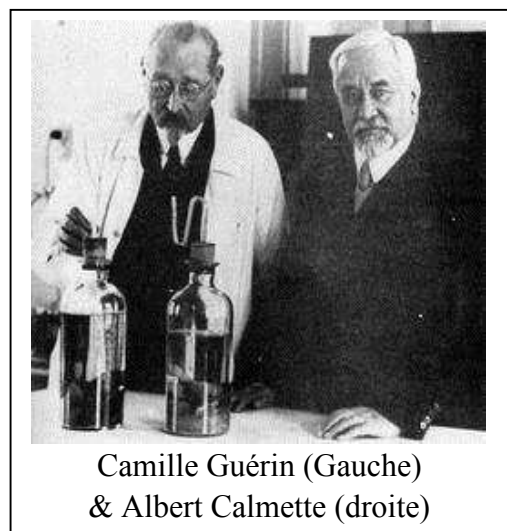
Figure 20 : Structure et constituants cellulaires d'un granulome tuberculeux.

Le granulome mycobactérien est formé au centre de mycobactéries extraphagocytes ou intraphagocytes des macrophages épithélioïdes, des cellules dendritiques, des neutrophiles et des lymphocytes NK et à l'extérieur de lymphocytes T et B (Ramakrishnan, 2012).

IV.3. Prévention et traitement de la tuberculose

IV.3.1. Historique du vaccin antituberculeux : le BCG

Entre 1908 et 1921, deux chercheurs français Albert Calmette et Camille Guérin de l'Institut Pasteur de Lille ont dérivé et obtenu une souche atténuée de *M. bovis* appelée BCG (Bacille de Calmette et Guérin) après une série de repiquage pendant 13 ans de la souche *M. bovis* que leur a fourni Edmond Nocard (Calmette and Guérin, 1911; Calmette and Guérin, 1920). Une fois les souches de BCG attestées atténuées et inoffensives, elles ont été envoyées de l'Institut Pasteur vers d'autres



laboratoires dans le monde entier à partir de 1924 pour la production des vaccins BCG à large échelle, ce qui a permis de sauver de nombreuses vies.

De 1921 jusqu'à 2014, on estime à 4 milliards les doses (100 millions de doses en 2004 selon l'OMS) de BCG administrées à travers le monde avec des effets secondaires limités chez les individus immunocompétents. Par contre chez les individus immunodéprimés, par exemple chez les individus atteints du VIH/sida, une administration de BCG peut conduire à une dissémination de l'infection (Casanova *et al.*, 1995). Cette souche atténuée de *M. bovis* est capable d'induire une protection efficace contre la forme disséminée de la tuberculose chez les enfants mais reste inefficace pour lutter contre la tuberculose pulmonaire chez les adultes (Colditz *et al.*, 1994; Ottenhoff and Kaufmann, 2012). Le BCG permet de protéger les individus vaccinés contre la forme disséminée de la tuberculose dont la méningite et la TB miliaire chez 80% des enfants (Colditz *et al.*, 1995; Trunz *et al.*, 2006). Néanmoins, des variations importantes en termes de résultats sont obtenues dans différents pays sur l'efficacité du vaccin BCG, ce qui a conduit à une flexibilité en termes de législation des procédures de vaccination selon les pays.

IV.3.2. Les effets secondaires d'une administration de BCG

Une administration de BCG par voie intradermique durant le processus de vaccination peut induire des effets indésirables comme une inflammation locale. Ce vaccin « vivant » peut également persister et devenir pathogène. Chez certains individus avec une déficience immunitaire, la vaccination BCG conduit à une infection locale ou une dissémination de la bactérie pouvant conduire à la mort. Avec des risques secondaires non négligeables et une efficacité variable en fonction des régions géographiques, un processus de restriction de l'utilisation de BCG fait de plus en plus d'adepte surtout dans des pays développés (www.bcgatlas.org). En France, depuis 2007, le vaccin n'est plus obligatoire mais il est fortement recommandé pour les personnes à risque c'est-à-dire vivant dans des zones à risque d'infection comme l'Ile-de-France et la Guyane. Outre le rôle préventif du BCG contre la tuberculose, le BCG est utilisé depuis 1979 pour le traitement curatif contre le cancer de la vessie. Néanmoins, des études et observations récentes montrent que cette stratégie thérapeutique peut induire une infection systémique entraînant même la mort du patient en condition d'immunodéficience (Samodai *et al.*, 1991; Steg *et al.*, 1989).

IV.3.3. Traitement de la tuberculose

Des efforts considérables, résumés en **figure 21**, ont été réalisés à plusieurs époques pour lutter contre la tuberculose. Actuellement le traitement de la tuberculose se fait par une prise de deux séries d'antibiotiques échelonnés sur six mois:

- La première série constituée d'Isoniazide, Rifampicine, Pyzanimide et éthambutol est prise sur une période de 2 mois
- La deuxième série constituée de d'Isoniazide et de Rifampicine est prescrite sur une durée de 4 mois.

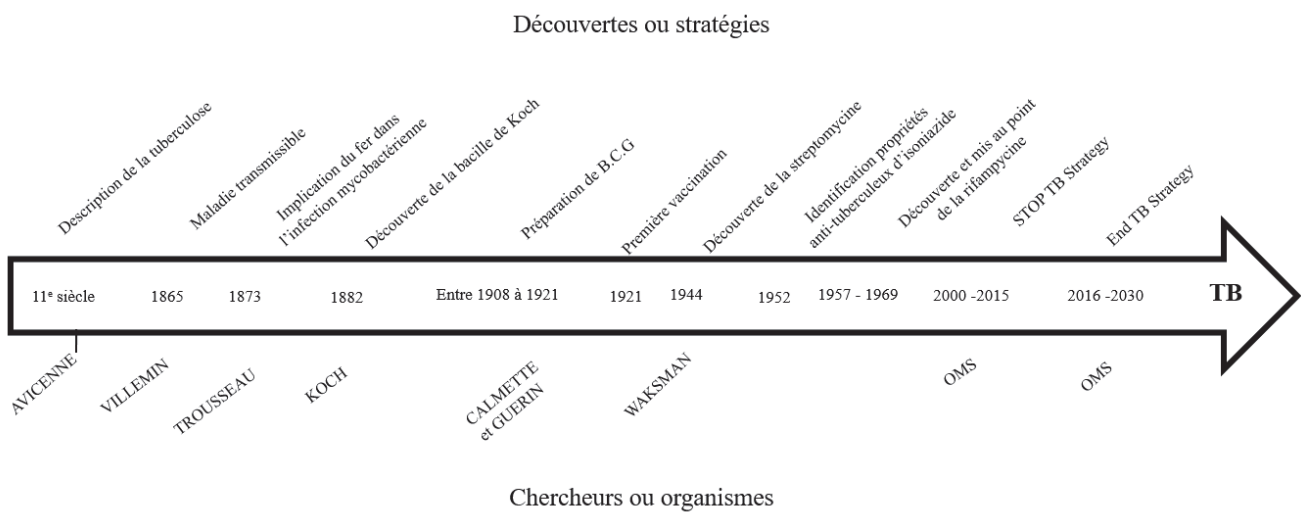


Figure 21 : Récapitulatif des différentes étapes stratégiques mises en place dans la lutte contre la tuberculose.

IV.4. Mécanisme de défense de l'hôte face à une infection mycobactérienne

Les mycobactéries et ses divers composés sont reconnus par les voies classiques de l'activation de l'immunité innée et adaptative.

IV.4.1. Mise en place de l'immunité innée contre *Mtb*

IV.4.1.1. Phagocytose de *Mtb*

L'immunité innée de l'hôte contre la tuberculose est initiée par une phagocytose de *Mtb* par les macrophages alvéolaires. L'endocytose de *Mtb* fait intervenir plusieurs récepteurs dont les récepteurs du complément et de mannose et de type « scavenger » à la surface des cellules phagocytaires, qui peuvent fixer des molécules présentes à la surface de *Mtb* et induire l'internalisation de *Mtb* (van Crevel *et al.*, 2002) (**Figure 23**).

IV.4.1.2. Sensing de *Mtb* par les TLRs

L'interaction de ligands spécifiques mycobactériens avec les TLRs induit une activation des macrophages par différentes voies de signalisation. Parmi les TLRs identifiés à ce jour, les TLR2, TLR4 et TLR9 ont été décrits comme des récepteurs clés impliqués dans la reconnaissance des mycobactéries (Hossain and Norazmi, 2013; Quesniaux *et al.*, 2004). Ainsi:

- Le TLR2 homodimère interagit avec la lipoprotéine de 19kDa, les lipoarabinomannanes (LAM) et le phosphatidyl-myoinositol mannosidases (PIMs); l'hétérodimère TLR2/TLR1 interagit avec les lipoprotéines (LP) à deux chaînes lipidiques (diacylés) et les lipomannanes (LM) et le TLR2/TLR6 interagit avec les lipoprotéines à trois chaînes lipidiques (triacylés).
- Le TLR4 interagit avec les lipomannanes, la protéine Heat Shock Protein 65 (HSP65) et la protéine ribosomale 50 S (50S RP).
- Et le TLR9 est activé par l'ADN mycobactérien.

Les différents ligands TLRs partagent à l'échelle intracellulaire avec les récepteurs de la famille de l'interleukine 1 (IL-1R) la molécule adaptatrice MyD88. Les interactions des ligands spécifiques avec les TLRs conduisent à l'activation des macrophages *via* des voies de signalisation spécifiques (Underhill *et al.*, 1999). L'activation des TLR2, 4 et 9 induit une cascade de signalisation IRAK1/2/4 – TRAF6-NF- κ B/MAPK aboutissant à la transcription des

cytokines et chimiokines proinflammatoires ainsi qu'à la production des agents antimicrobiens (Quesniaux *et al.*, 2004; Saraav *et al.*, 2014). L'activation de la voie TLR4-TRIF (indépendante de MyD88) aboutit à l'activation de NF- κ B tardif et du facteur de transcription IRF3 (Interferon Regulator Factor 3) (Doherty and Ardit, 2004; Quesniaux *et al.*, 2004; Saraav *et al.*, 2014) (Figure 22).

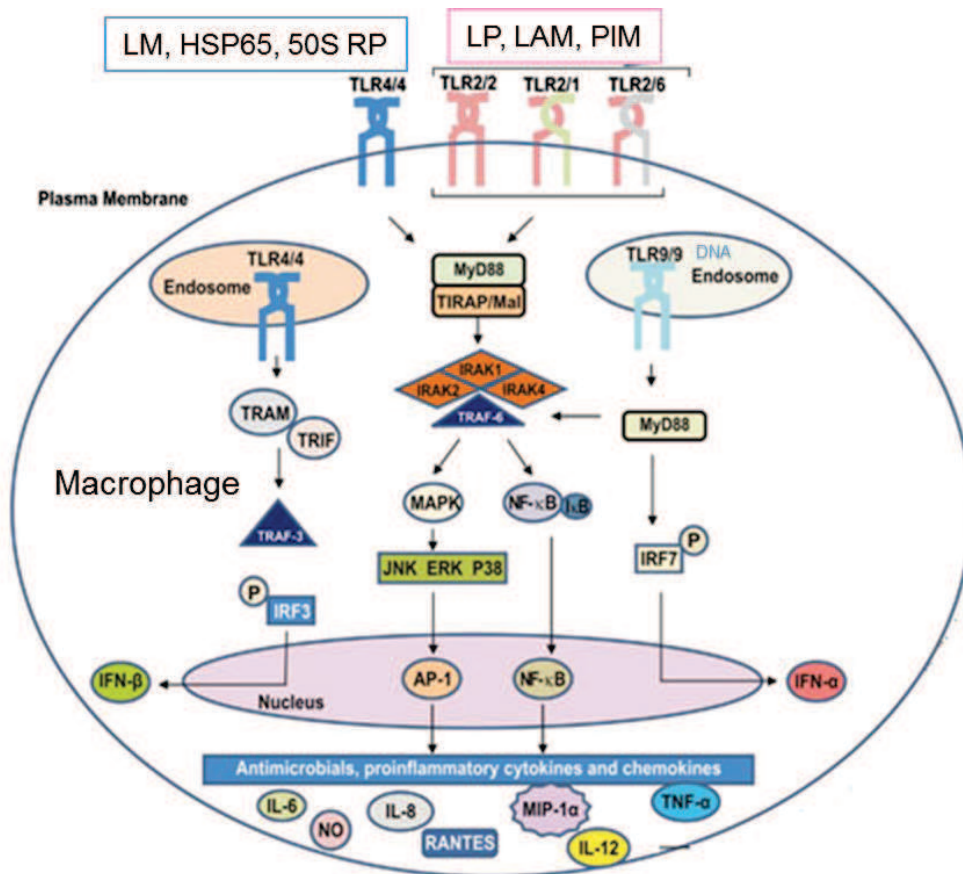


Figure 22: Interactions ligands mycobactériens et TLRs de l'hôte, et voies de signalisations intracellulaires.

L'activation de TLR2, TLR4 et TLR9 induit une cascade de signalisation médiée par les protéines intracellulaires MyD88, IRAK, TRAF conduisant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. A l'issue de cette cascade, une transcription des chimiokines et cytokines proinflammatoires est déclenchée. La voie MyD88-indépendante du TLR4 ou du TLR9 conduit également à l'expression des interférons de type 1 (modifié de (Saraav *et al.*, 2014)). LM : LipoMannane, 50S RP : Protéine Ribosomale 50S, LP : LipoProtéine, LAM : LipoArabinoMannane, PIM : Phosphatidyl Inositol Mannoside.

Des études réalisées en 2004 par Drennan *et al.*, ont montré qu'une déplétion de TLR2 chez les souris est associée à un défaut de la réponse immunitaire et une susceptibilité à l'infection par *Mtb* (Drennan *et al.*, 2004). De plus la reconnaissance par les récepteurs TLR2 et TLR4 durant une infection mycobactérienne est une étape critique dans le contrôle de l'inflammation (Drennan *et al.*, 2004; Fremond *et al.*, 2003). Initialement, la molécule adaptatrice des TLRs, le MyD88 a été décrite comme primordial dans le contrôle de l'infection mycobactérienne

puisque les souris MyD88 KO succombent à une infection par *M. tuberculosis* après 42 jours (Fremond *et al.*, 2004; Scanga *et al.*, 2004). Ultérieurement, les études ont spécifiées l'action majeure de MyD88 associée au récepteur IL-1R1 par rapport au MyD88 associé aux voies d'activations TLR2, TLR4 et TLR9 (Fremond *et al.*, 2007; Holscher *et al.*, 2008).

L'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 conduit à l'expression d'un panel de cytokines à activité pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. La sécrétion des cytokines régulent l'immunité innée tout en initiant l'immunité adaptative en réponse à *Mtb*. Les médiateurs pro-inflammatoires (TNF α , iNOS, IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, and IL-23) synthétisées durant la réponse immune contribuent à la destruction des mycobactéries. Une sécrétion excessive des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β en revanche peut compromettre la protection de l'hôte en interagissant négativement sur la production des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 23**) (Hossain and Norazmi, 2013).

IV.4.2. Immunité adaptative contre *Mtb*

Initiée par la réponse immune innée, la réponse adaptative face aux mycobactéries est activée après présentation d'antigènes aux lymphocytes T naïfs par l'intermédiaire des complexes majeurs d'histocompatibilité suite à la phagocytose de *Mtb* (**Figure 23**).

Le sensing des cellules phagocytaires de *Mtb* permet ainsi de mettre en place une réponse adaptative par un recrutement des lymphocytes T pour induire une réponse majoritairement Th1. Une réponse cellulaire T-dépendante est un facteur déterminant pour la résolution de l'infection et ses conséquences cliniques. Les cellules T CD4 sont décrites comme critiques durant une infection par *Mtb* aussi bien chez l'homme qu'en expérimentation animale. Ces cellules sont impliquées dans le contrôle de l'initiation de l'infection et sa recrudescence (Kaufmann *et al.*, 2005). Les lymphocytes T CD4 et T CD8 sont les lymphocytes majoritaires retrouvés dans les structures granulomateuses (Cooper, 2009). Ils contribuent également au profilé cytokinique de la réponse immunitaire. Par exemple les lymphocytes activés T CD4 Th1 secrètent le TNF- α et l'IFN- γ , les T CD4 Th17 secrètent l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 et les lymphocytes activés T CD8 secrètent les cytokines comme le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-2 et en plus des protéines de lyse des pathogènes comme la perforine, le granulysine et le granzyme (Etna *et al.*, 2014).

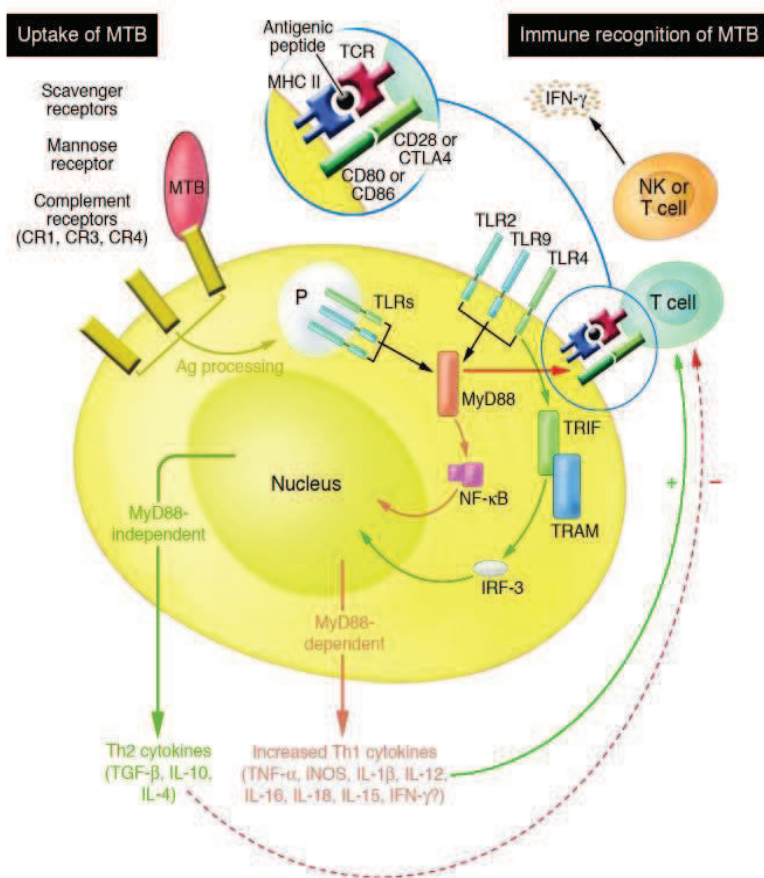


Figure 23 : Interaction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dans les cellules phagocytaires de *Mtb*.

L'internalisation de *Mtb* se fait après reconnaissance de la bactérie par les récepteurs de mannose, du complément et scavenger. Dans les phagosomes, les TLRs endosomaux sont sensibilisés induisant une activation de la voie de signalisation MyD88. La stimulation des TLRs membranaires conduit à l'activation des voies de signalisation MyD88 et TRIF activant respectivement les facteurs de transcription NF-κB et IRF3. La voie MyD88-dépendante induit une sécrétion des cytokines Th1 (TNF-α, iNOS, IL-1β, IL-12, IFN-γ) tandis que celle indépendante de MyD88 est responsable de la sécrétion des cytokines Th2 (TGF-β, IL-10, IL-4). Le processing des antigènes suite à la phagocytose de *Mtb* conduit à une présentation d'antigène aux lymphocytes par l'intermédiaire des complexes majeurs d'histocompatibilité (inspiré de (Hossain and Norazmi, 2013) (van Crevel *et al.*, 2002)).

De récentes études indiquent l'implication des cellules B dans la réponse anti-mycobactérienne. En effet Maglione *et al* en 2008 ont montré qu'en réponse à une infection mycobactérienne, l'interaction des récepteurs FCγRIIB avec les immunoglobulines conduit à une diminution de la réponse Th1 *via* une atténuation de l'IL-12p40 et de l'activation des cellules présentatrices d'antigènes provoquant une susceptibilité à l'infection (Maglione *et al.*, 2008). De plus, les souris C57BL/6 déficientes pour la chaîne γ impliquée dans l'activation de certains récepteurs (FCγR) sont plus susceptibles et montrent une immunopathologie plus prononcée en réponse à *Mtb* (Maglione *et al.*, 2008) suggérant que l'activation des différents FCγR pourrait affecter le profil cytokinique et ainsi la réponse mycobactérienne. De plus Maglione *et al* ont montré qu'une absence des cellules B en utilisant les souris déficientes pour ces cellules intensifie l'immunopathologie mycobactérienne avec un recrutement important des neutrophiles et une sécrétion abondante de l'IL-10 dans le poumon (Maglione *et al.*, 2007)

IV.4.3. Evasion de l'immunité innée par *Mtb*

L'évasion de l'immunité innée par *Mtb* commence par la non reconnaissance des PAMPs exprimés à la surface mycobactérienne par les TLRs. En effet à la surface des mycobactéries pathogènes, se trouve des lipides PDIMs (phthiocerol dimycocerosate) qui masquent les PAMPs bactériens empêchant ainsi la mise en place d'une immunité innée efficace *via* la signalisation TLR. De plus, d'autres lipides comme les PGLs (phenolic glycolipids) contribuent à la promotion du recrutement des macrophages dits « permissifs ou tolérants » permettant la survie bactérienne (Cambier *et al.*, 2014b). Une fois à l'intérieur des macrophages *via* la phagocytose, les mycobactéries pathogènes, contrairement aux mycobactéries non pathogènes, empêchent la fusion des phagosomes avec les lysosomes assurant la survie et la croissance du pathogène *via* des mécanismes multiples et complexes. A titre d'exemples nous pouvons citer la production de la protéine kinase G (PknG) dont le mode d'action est la neutralisation de la protéine kinase C α de l'hôte primordiale pour arriver au terme de la phagocytose (Vergne *et al.*, 2005). Une inhibition de la signalisation des ions calcium induite par *Mtb* a été associée avec une réduction de la fusion des phagosomes avec les lysosomes suivie d'une meilleure survie des mycobactéries dans les macrophages humains (Malik *et al.*, 2000; Trimble and Grinstein, 2007).

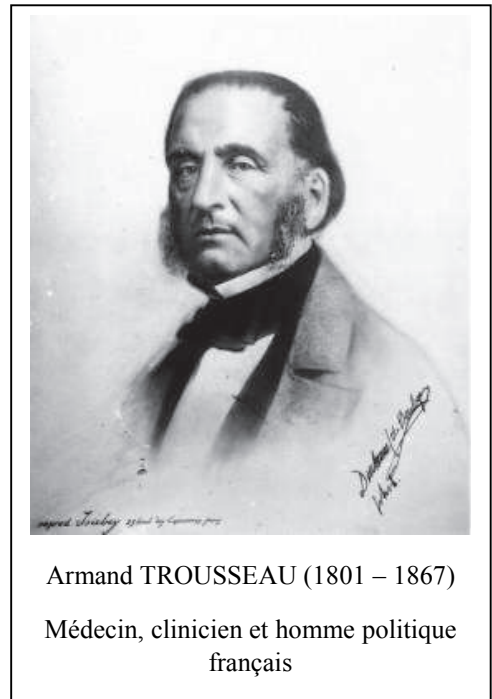
IV.4.4. Evasion de l'immunité adaptative

Nous avons fait ressortir dans le chapitre précédent un lien indissociable entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ainsi une évasion de l'immunité innée par le *Mtb* engendre des conséquences sur le même processus dans l'immunité adaptative. Les pathogènes intracellulaires possèdent des mécanismes multiples, hautement développés, limitant la médiation de l'immunité par les cellules T empêchant le processing et la présentation des antigènes (Flannagan *et al.*, 2009).

IV.4.5. Immunité nutritionnelle du fer

IV.4.5.1. Le fer et la tuberculose

Le premier lien entre le fer et la tuberculose a été établi pour la première fois par le médecin français Armand TROUSSEAU en 1872. A l'époque, il fit une observation selon laquelle les patients guéris de la tuberculose active font une rechute si ces derniers reçoivent des suppléments riches en fer (Trousseau, 1872). Par la suite, entre 1925 et 1928, une nécropsie post-mortem sur 714 sud-africains de race noire décédés de la tuberculose a montré que 90% et 16% des individus mâles et femelles respectivement avaient une surcharge en fer hépatique importante (Gordeuk *et al.*, 1996). Une autre étude clinique réalisée en Somalie a conduit à affirmer qu'une supplémentation en fer est un facteur de risque de la tuberculose. En effet chez les individus somaliens souffrant d'une déficience en fer à qui une supplémentation en fer, à raison de 900 mg par jour et par personne (71 individus) ou un placebo (67 individus) pendant 30 jours est prescrite, trois épisodes de recrudescence de la tuberculose ont été observés chez les individus ayant reçu une supplémentation en fer (Murray *et al.*, 1978).



Des études récentes ont également montré une susceptibilité à une infection par *Mtb* en condition de surcharge en fer d'origine génétique induit par une déficience de la bêta 2 microglobuline, un composant de CMH de classe 1 (Schaible *et al.*, 2002), ou par une injection intra-péritonéale de fer (Lounis *et al.*, 2001). De plus, les mutations des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, comme *NRAMP1*, affectent la résistance à une infection mycobactérienne dans les populations ouest-africaine (Gambie) et en Asie du Sud-Est (Indonésie) (Bellamy *et al.*, 1998; Liaw *et al.*, 2002; Nugraha and Anggraini, 2011).

Comme nous l'évoquons dans le chapitre 1, une déficience en fer accentue la morbidité des maladies infectieuses par une action sur la réponse immune cellulaire. En effet, en condition de déficience en fer, la prolifération des lymphocytes est moins importante ainsi la présence du fer à une concentration adéquate est essentielle pour une fonctionnalité normale et optimale des

cellules comme les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes et donc pour une lutte contre les infections mycobactériennes (Brock, 2000).

IV.4.5.2. Séquestration du fer comme mécanisme de défense inné contre une infection

En général seulement 5% de personnes infectées par les mycobactéries pathogènes développent la maladie, ce qui indique que les mécanismes de défense par l'intermédiaire du système immunitaire sont généralement efficaces pour le contrôle de l'infection. Un des mécanismes de défense innée contre l'invasion des pathogènes chez l'hôte est la diminution du fer circulant qui est assurée par l'intermédiaire de l'hepcidine, protéine de phase aigüe. En effet comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2, la fixation de l'hepcidine circulant sur la ferroportine entraîne une internalisation et une dégradation de cette dernière limitant la sortie du fer des entérocytes, des macrophages spléniques et des hépatocytes.

IV.4.5.3. L'hepcidine, « une défensine aigüe »

Les protéines de phase aigüe (APP en anglais Acute Phase Proteins) sont une classe de protéines dont la concentration dans le plasma (altérée au moins à 25%) augmente (protéines de la phase aigüe positive) ou diminue (protéine de la phase aigüe négative) en réponse à une inflammation : c'est une réponse qui intervient d'une manière précoce durant une réaction inflammatoire systémique (Gruys *et al.*, 2005). Une interaction entre les ligands TLR et leurs récepteurs active des voies de transduction de signaux conduisant à une production des cytokines inflammatoires comme IL-1, IL-6, IL-8 et le TNF- α . Ces cytokines stimulent les cellules hépatiques pour une sécrétion des protéines de la phase aigüe qui seront amenées à coordonner une réponse inflammatoire aussi bien systémique que locale suite à une infection. La particularité de ces protéines de la phase aigüe est leur fixation sur des bactéries activant ainsi les protéines du complément pour détruire les bactéries. Les APPs sont divisées en deux groupes: les APPs de type I induites par des cytokines pro-inflammatoires et les APPs de type II sont induits spécifiquement par l'IL-6 (Ebersole and Cappelli, 2000). Plusieurs APPs sont décrites dans la littérature parmi lesquelles les APPs impliquées dans l'homéostasie du fer comme : l'hepcidine, l'haptoglobine, la ferroxidase céruloplasmine et la lipocaline 2. Une diminution du taux de fer circulant contribue à réduire l'accès au fer des pathogènes intracellulaires *via* la voie endocytaire de la transferrine. En effet, l'holotransferrine circulante

se fixe sur le récepteur ubiquitaire de la transferrine (TfR1) et le complexe formé est endocyté. Une acidification du pH permet par la suite de libérer le fer ferrique qui sera converti en fer ferreux par le biais de la ferriréductase STEAP3. Le Fe^{2+} peut ainsi sortir de l'endosome limitant le fer intraphagosomal. Ainsi une interaction limitée avec les voies endocytiques de la transferrine est un mécanisme naturel de réduction de la biodisponibilité du fer pour *Mycobacterium* (Clemens and Horwitz, 1996).

IV.4.5.4. Evasion de l'immunité nutritionnelle de l'hôte par les pathogènes : rôle des sidérophores

IV.4.5.4.1. Acquisition du fer non héminique

La survie d'un pathogène dans un environnement dépend de sa capacité à satisfaire les besoins nutritifs parmi lesquels les besoins en fer. Comme la plupart des bactéries, le genre *Mycobacterium* requiert le fer pour sa croissance. Les mycobactéries ont développé des systèmes sophistiqués d'acquisition du fer du milieu environnant. Les mycobactéries pathogènes comme *Mtb* produisent deux types de sidérophores :

- Les mycobactines qui sont des sidérophores lipophiliques associés à la membrane mycobactérienne
- Les carboxymycobactines : ce sont des sidérophores sécrétés dans le milieu environnant (Snow, 1970). Les carboxymycobactines diffèrent des mycobactines principalement par la longueur de la substitution alkyl rattachée au résidu central, la L-lysine. Ceci détermine la polarité et la solubilité du sidérophore. De plus, les mycobactines ont une longue chaîne carbonée (avec 10 à 21 carbones) terminée par un groupement méthyl tandis que pour les carboxymycobactines, le groupement lié à la lysine est formé d'une courte chaîne de carbone (entre 2 et 9 carbones) qui se termine par le groupe COOH ou d'un ester de méthyl (**Figure 24**) (Gobin and Horwitz, 1996).

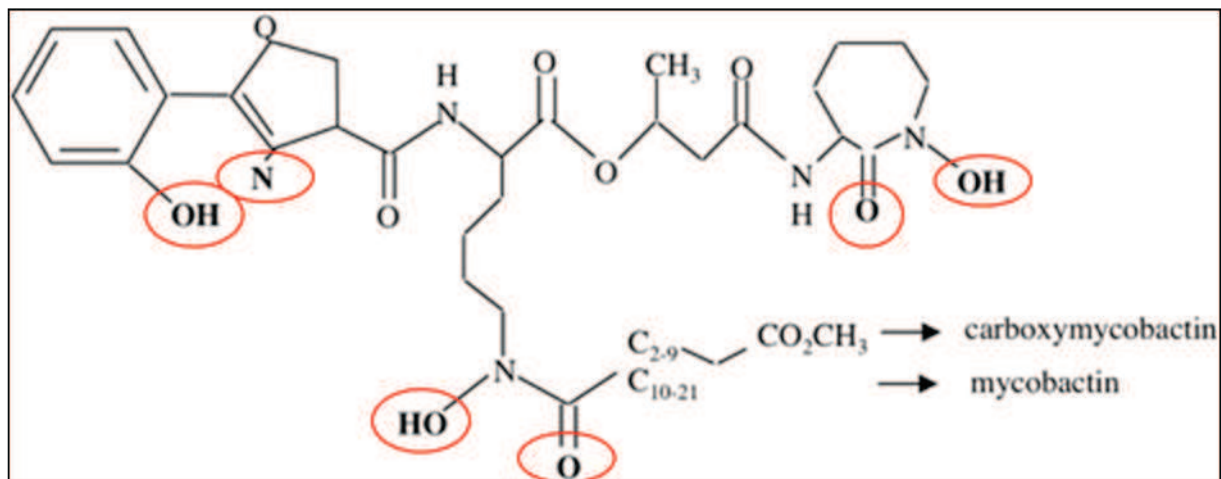


Figure 24 : Structure des sidérophores des mycobactéries pathogènes.

Les groupements impliqués dans la fixation du fer sont entourés en rouge sur la figure (modifié de (Rodriguez and Neyrolles, 2014)).

Les protéines nécessaires pour l'assemblage et la formation des sidérophores sont synthétisées grâce au cluster de gène *mbt-1* (*mbt*-IABCDEFG) (Madigan *et al.*, 2012). Une fois assemblées, les carboxymycobactines sont exportées dans le milieu environnant *via* les transporteurs MmpL4 et MmpL5 qui sont couplés avec des protéines associées MmpS4/5 (**Figure 25**) (Wells *et al.*, 2013). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré clairement l'importance des sidérophores dans la pathogénicité de *Mtb*. De Voss *et al* en 2000 ont montré qu'une mutation du gène *mbtb* codant pour la mycobactine diminuait significativement la capacité de la bactérie à se répliquer au sein des macrophages humains (De Voss *et al.*, 2000). Dans un modèle murin d'infection mycobactérienne, Jones *et al* en 2014 ont montré qu'une infection avec *Mtb* H37Rv mutée pour des protéines membranaires n'induit pas de croissance bactérienne dans les poumons et la rate, ce qui est corrélé à un taux de survie des animaux à l'infection plus élevé (Jones *et al.*, 2014).

Le fer dans le milieu extracellulaire se fixe à la carboxymycobactine formant un complexe carboxymycobactine – Fe. Il a été montré également que la carboxymycobactine est capable de dissocier les complexes protéiques de l'hôte liés au fer afin d'avoir un accès au fer libre. Le fer lié à la carboxymycobactine est alors transféré à la mycobactine (Gobin and Horwitz, 1996) ou délivré directement à l'intérieur des bactéries *via* des systèmes de transport IrtAB, un transporteur de type ABC nécessaire à l'internalisation du complexe Fe³⁺-carboxymycobactine. L'importance de IrtAB dans l'acquisition du fer par *Mycobacterium* a été montrée par Rodriguez *et al* en 2006 qui associaient les mycobactéries IrtAB déficientes avec une déficience en fer caractérisée par un défaut de répllication à l'intérieur de l'hôte (Rodriguez and Smith, 2006). La virulence de *Mycobacterium* dépend de sa capacité à acquérir le fer du milieu

environnant et donc la capacité à sécréter les sidérophores dans le milieu. En effet, il a été montré qu'une supplémentation du fer dans le milieu de culture bactérien réduit la production des sidérophores bactériens et que ces derniers étaient seulement nécessaires qu'en condition de déficience en fer (Raghu *et al.*, 1993).

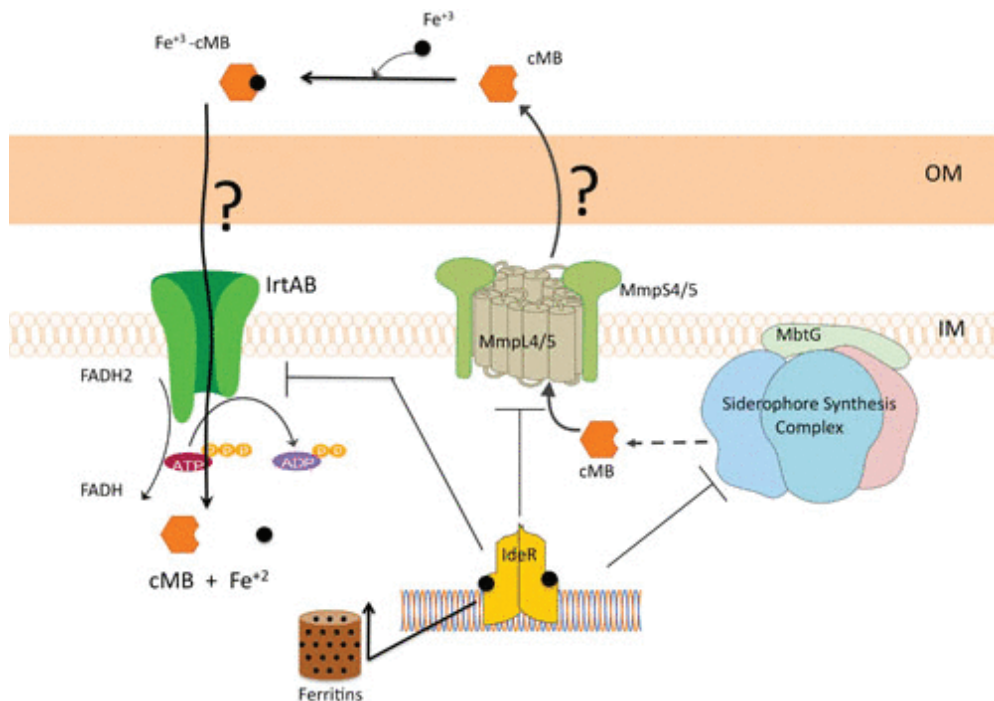


Figure 25 : Mécanisme d'acquisition du fer par *Mtb* via la carboxymycobactine.

En condition de déficience en fer, *Mtb* sécrète la carboxymycobactine (cMB) par un processus dépendant des protéines membranaires MmpL4, MmpL5, MmpS4 et MmpS5. La carboxymycobactine sécrétée fixe alors le fer ferrique du milieu environnant et ce complexe peut être internalisé à l'intérieur de *Mtb* par l'intermédiaire du transporteur IrtAB localisé au niveau de la membrane interne. Dans le cytosol, le cofacteur d'oxydo-réduction FAD (Flavine adénine dinucléotide) réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} et dissocie le complexe fer-sidérophore. Le fer ferreux est utilisé ou stocké par la ferritine. L'excès du fer se lie au régulateur du fer mycobactérien IdeR qui peut alors se fixer sur différents promoteurs des gènes impliqués dans l'acquisition du fer inhibant leur synthèse (Rodriguez and Neyrolles, 2014).

IV.4.5.4.2. Acquisition du fer hémique par *M. tuberculosis*

Les mycobactéries peuvent acquérir l'hème en utilisant les récepteurs situés au niveau des membranes périplasmiques et externes et qui peuvent pénétrer à l'intérieur des bactéries à travers des transporteurs ABC spécifiques de l'hème, ou par une sécrétion des protéines particulières appelées hémophores capables de séquestrer l'hème et de le délivrer à travers la membrane. Une fois à l'intérieur de la bactérie, le fer est extrait par des enzymes comme l'hème-oxygénase 1 (HO1) (Wilks, 2002). En l'absence des sidérophores, *M. tuberculosis* est capable d'acquérir le fer de l'hème qui pénètre à l'intérieur des bactéries à travers des

transporteurs ABC spécifiques de l'hème, ou par une sécrétion des protéines particulières appelées hémophores capables de séquestrer l'hème et de le délivrer à travers la membrane. Les gènes codant des protéines hémophores capables de se fixer au fer et des transporteurs membranaires ont été définis comme nécessaire pour une acquisition normale de l'hème et de l'hémoglobine (Tullius *et al.*, 2011). Une fois à l'intérieur de la bactérie, l'hème est dégradé par l'enzyme MhuD, l'équivalent de l'hème oxygénase pour libérer le fer et la mycobiline, sans générer le monoxyde de carbone dans le cas d'une infection à *Mtb* connu pour être toxique pour plusieurs pathogènes (Khare *et al.*, 2011). Actuellement le rôle de l'internalisation de l'hème suite à une infection à *Mtb* reste inconnu et des études ultérieures doivent être réalisées dans ce sens.

IV.4.5.4.3. Le stockage du fer par *Mycobacterium*

Le fer intramycobactérien est stocké par la bactérioferritine (BfrA) et la ferritine (BfrB) (Gupta *et al.*, 2009; Khare *et al.*, 2011). La ferritine BfrB est le réservoir du fer préféré de *Mtb* en condition de déficience de fer. De plus il a été montré que la délétion du gène *bfrB* du génome de *Mtb* augmente la susceptibilité des mycobactéries aux espèces réactives d'oxygènes issues des antibiotiques ou d'un milieu enrichi en fer (Pandey and Rodriguez, 2012).

IV.4.5.4.4. La régulation des sidérophores

La régulation de l'expression des sidérophores est effectuée par un mécanisme lié au fer impliquant le régulateur IdeR (Iron-dependent regulator) connu comme la pièce centrale du métabolisme du fer chez les mycobactéries. En effet, IdeR régule la synthèse et la sécrétion de sidérophores et inhibe l'internalisation du complexe Fe³⁺-carboxymycobactine qui pénètre dans les mycobactéries *via* IrtAB. IdeR est également impliqué dans le stockage du fer à l'intérieur des mycobactéries en induisant le stockage du fer par la ferritine (*bfrB*).

Deuxième partie : Problématique et Objectifs de thèse

Problématique

L'hepcidine initialement identifiée comme une β -défensine pour ses propriétés antibactériennes est un petit peptide produit majoritairement par les hépatocytes en réponse au fer mais également par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques en réponse à un processus inflammatoire ou à une infection microbienne. Au niveau systémique les variations du taux d'hepcidine circulant en réponse aux variations du statut en fer de l'organisme restent modérées, probablement afin de ne pas altérer le processus érythropoïétique; alors que les variations du taux d'hepcidine circulant en réponse inflammatoire, stérile ou infectieuse, sont substantielles pouvant conduire à une anémie. Ainsi, le mécanisme de l'homéostasie systémique, par l'intermédiaire de l'axe hepcidine – ferroportine pour le contrôle du relargage du fer dans la circulation sanguine, ainsi que son mode de régulation indiquent que le contrôle du taux de fer circulant s'intègre au mécanisme de défense innée pouvant réguler la croissance cellulaire et freiner ou empêcher la croissance des agents pathogènes en limitant l'accès au fer. Par ailleurs, la dissémination des macrophages dans l'organisme et la régulation de l'axe hepcidine-ferroportine dans ce type cellulaire suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle au niveau local dans la réponse immune.

Des interactions entre les voies de signalisations intracellulaires médiées par le fer et l'inflammation sont de plus en plus décrites. Ces interactions impactent indirectement le métabolisme du fer en agissant sur l'expression d'hepcidine. De plus il a été rapporté récemment qu'une cytokine inflammatoire, l'activine B pourrait agir positivement sur le récepteur BMPR initialement connu pour induire l'expression d'hepcidine, une fois l'interaction avec son ligand, le BMP effectué. Ainsi, plus que jamais, les données démontrent la relation directe entre l'homéostasie du fer et l'inflammation chez les mammifères.

Objectifs visés

Mes objectifs de thèse peuvent être divisés en deux parties :

-Une partie a consisté à améliorer nos connaissances du mécanisme de régulation de l'axe hepcidine – ferroportine en condition inflammatoire. Ainsi, les voies de signalisations intracellulaires qui interviennent dans la régulation de l'expression de l'hepcidine et de la

ferroportine dans les macrophages ont été étudiées D'autre part, le profil phénotypique des macrophages en réponse inflammatoire a été étudié sous différentes conditions de statut en fer.

- Une deuxième partie de recherche est orientée vers une étude beaucoup plus appliquée du rôle du fer en réponse à une infection mycobactérienne. De fait, l'équipe « Relations hôte-pathogène » du laboratoire « Immunologie et Neurogénétique Expérimentale et Moléculaires » s'intéresse entre autres à l'étude des mécanismes de l'immunité en réponse à une infection mycobactérienne. Ainsi, l'objectif de ce travail a été d'évaluer l'impact d'un régime alimentaire riche en fer dans le modèle murin durant une infection induite par *M. bovis* BCG. Les paramètres liés au métabolisme du fer et ceux liés à la réponse immune ont été évalués.

Troisième partie : Résultats & discussions

Chapitre 5 : Résultats

V.1. La régulation transcriptionnelle positive de l'hepcidine et négative de la ferroportine par l'inflammation est dépendante de la polarisation des macrophages.

Article 1: Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization

Rafiou Agoro & Catherine Mura,

Publié dans Blood Cells, Molecules & Diseases Vol 61 : pages 16 – 25 (2016)
doi:10.1016/j.bcmed.2016.07.006

Les macrophages sont des cellules essentielles de l'immunité innée mais également dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules représentent une population hétérogène de cellules immunitaires dont le phénotype varie en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent. Les macrophages sont principalement polarisés en cellules à activité pro-inflammatoire (Macrophages M1) ou à activité principalement anti-inflammatoire (Macrophage M2). Parallèlement à ces fonctions immunitaires, les macrophages, avec leurs activités de recyclage, de stockage, sont impliqués dans le métabolisme du fer. Les macrophages expriment l'hepcidine et la ferroportine, un couple de protéines important dans la régulation du fer systémique. L'expression de l'hepcidine et de la ferroportine est régulée par l'inflammation, conduisant à une hypoferrémie qui constitue également un mécanisme de défense innée contre les infections.

La polarisation des macrophages est modulée par une variété de signaux incluant l'environnement cytokinique et les motifs PAMPs des microorganismes. La polarisation résulte en fait d'un équilibre intracellulaire entre kinases p38, JNK, le facteur de transcription NF- κ B p65/p50 d'une part et ERK1/2 et le facteur NF- κ B p50/p50 d'autre part, ainsi que de l'activité PI3K critique pour orienter le système métabolique cellulaire. Ces diverses voies de signalisation intracellulaires sont associées aussi à l'activation et à la répression de l'expression de gènes de l'immunité.

Notre objectif principal dans ce travail a été d'étudier la régulation transcriptionnelle de l'hepcidine et de la ferroportine au niveau des macrophages. Pour ce faire, nous avons effectué essentiellement des études *in vitro* sur des macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse (BMDM) de la souris pour analyser finement l'expression d'hepcidine et de la ferroportine par le biais de l'utilisation de différents ligands TLR, de la stimulation avec différentes cytokines et d'inhibiteurs de voies de signalisation intracellulaires.

Nous avons d'abord mis en évidence le niveau d'expression de l'hepcidine et de la ferroportine dans le foie et les macrophages péritonéaux en réponse à une inflammation aiguë induite par le ligand de TLR4, le LPS. Ce traitement induit une augmentation de l'expression de l'hepcidine dans le foie et les macrophages résidant dans le péritoine de manière dose-dépendante. D'une manière remarquable, la modulation de l'expression d'hepcidine dans les macrophages est beaucoup plus importante en comparaison de la réponse hépatique, même si le niveau basal de son expression reste faible. La régulation négative de l'expression de la ferroportine en réponse au LPS est également observée et une fois de plus elle paraît plus prononcée dans les macrophages. Ceci suggère un rôle déterminant de l'inflammation sur la régulation de l'hepcidine et de la ferroportine dans les macrophages avec un impact potentiel sur l'homéostasie du fer au niveau local.

Nous avons clarifié ces régulations en fonction de la stimulation des macrophages *in vitro*. Un traitement des BMDM avec le LPS induit l'expression d'hepcidine, caractérisée par une cinétique composée d'un léger pic à 2-3 h suivi d'une forte augmentation de l'expression entre 8 et 12 h. L'expression de la ferroportine est diminuée par le LPS pour atteindre le pic négatif à 4 h après le traitement au LPS. La forte surexpression de l'hepcidine induite par le LPS est corrélée à une forte expression des cytokines connues pour induire l'hepcidine, l'inhibine b et l'IL-6 de manière importante, dont le pic d'expression transitoire précède (3-6 h) celui de l'hepcidine. La cinétique suggère que les facteurs de transcription activés par l'inflammation n'influencent que faiblement le promoteur de l'hepcidine, et que la majorité de la surexpression résulte de l'activité feed-back des cytokines.

Le rôle de la polarisation des macrophages dans la réponse de l'hepcidine et de la ferroportine a été évalué. Nous avons utilisé des cytokines impliquées dans la polarisation des macrophages qui induisent une polarisation soit M1 (IFN- γ), soit un sous type M2 (IL-4, TGF β , IL-1 β , TNF α). La polarisation des macrophages en M1 accentue l'expression d'hepcidine tandis que la polarisation en M2 atténue son expression en réponse au LPS. En ce qui concerne l'expression de la ferroportine, nous remarquons principalement que les macrophages M2,

stimulés par l'IL-1 β ou le TNF- α accentue l'effet « down –regulation » de la ferroportine tandis que les macrophages M1 l'inhibent. Ainsi la régulation de l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine dépend de l'état de polarisation des macrophages.

Nous nous sommes aussi intéressés aux voies moléculaires intracellulaires impliquées dans l'expression des ARN messagers de l'hepcidine et de la ferroportine. En effet il est connu que la polarisation des macrophages est influencée par les activités intracellulaires PI3Ks, MAPKs and NF- κ B. Nous avons ainsi utilisé des inhibiteurs sélectifs des différentes voies intracellulaires, suivi d'un traitement avec le LPS, et analysé l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine qui interviennent dans la régulation de fer. Nous montrons qu'une inhibition de l'activité PI3K, par la wortmannine permet d'induire d'une manière beaucoup plus importante l'expression d'hepcidine et abolit la diminution de l'expression de la ferroportine en réponse au LPS. Ainsi, une inhibition de la voie PI3K, un régulateur négatif de l'activation M1, appuie l'idée selon laquelle l'expression d'hepcidine est liée à la polarisation M1. Parallèlement, nous remarquons que la neutralisation des voies p38-MAPK, JNK et NF- κ B qui participent à la polarisation M1 réduit l'expression de l'hepcidine et accentue en parallèle la réduction de l'expression de la ferroportine en réponse au LPS. Ces données indiquent que la polarisation M1 est associée avec une surexpression de l'hepcidine tandis que la polarisation M2 est liée à une diminution de l'expression de la ferroportine.

L'immunité innée intervient entre autres par la reconnaissance des motifs bactériens PAMPs avec les TLR correspondants qui sont exprimés par les cellules immunes parmi lesquelles les macrophages. L'activation des TLR3, 7, 8 et 9 stimule la polarisation M1 corrélée avec une production importante de l'IL-12, tandis que le TLR2 induit la voie PI3K et ERK conduisant à une polarisation M2 des macrophages. L'expression de l'hepcidine est fortement induite après stimulation des macrophages par les agonistes des TLR7/8 et TLR7 et plus modérément avec les agonistes TLR3 et TLR9. Il avait déjà été noté qu'une stimulation de TLR2 (Guida *et al.*, 2015) n'induit pas d'expression d'hepcidine, nos résultats révèlent aussi ce phénomène dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse. Pour étudier ultérieurement l'influence de la polarisation des macrophages dans la balance transcriptionnelle de l'hepcidine et de la ferroportine, nous avons induit préalablement une polarisation des macrophages par l'IFN- γ suivie d'une stimulation avec le ligand du TLR2. Ainsi, la polarisation M1 *via* l'IFN- γ abolit l'effet de la diminution de l'expression de la ferroportine tandis qu'un prétraitement avec l'IFN- γ accentue l'expression de l'hepcidine en réponse à l'activation des TLR3, 7/8, et 9. A l'inverse une polarisation M2 *via* l'IL-4 suivie d'un traitement avec les ligands de TLR3, 7/8,

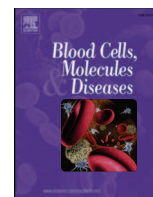
et 9 abolit la répression de la ferroportine et la surexpression de l'hepcidine. De plus, un prétraitement des macrophages avec la wortmannine abolit la répression de la ferroportine induite par le TLR1/2. Ainsi, la polarisation des macrophages induite par l'intermédiaire d'une stimulation des TLRs joue un rôle fondamental dans la régulation de l'hepcidine et de la ferroportine au niveau transcriptionnel.

En conclusion, ce travail montre que l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine en condition inflammatoire est dépendante du phénotype des macrophages.



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

Inflammation-induced up-regulation of *hepcidin* and down-regulation of *ferroportin* transcription are dependent on macrophage polarization



Rafiou Agoro, Catherine Mura*

^a Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans, France^b University of Orléans, Orléans, France

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 24 June 2016

Revised 25 July 2016

Accepted 25 July 2016

Available online 26 July 2016

Editor: Mohandas Narla

Keywords:

Hepcidin

Ferroportin

Inflammation

Macrophage polarization

ABSTRACT

Iron is essential in all organisms. In mammals systemic iron homeostasis relies on hepcidin, a peptide hormone with defensin properties, and its target, the cell iron exporter ferroportin. *Hepcidin* and *ferroportin* transcription are both upregulated by high iron levels, but are inversely regulated upon inflammation, leading to hypoferrremia. Thus, host iron genes regulation may affect the innate immune responses against infectious microorganisms. Since macrophages, which are crucial innate immune cells, express both *hepcidin* and *ferroportin*, we explored in these cells their transcriptional regulation upon inflammation which is not completely understood. Macrophages represent a heterogeneous population of immune cells resulting from cytokine and pathogen sensing, indeed macrophages polarized especially into pro-inflammatory M1 and regulatory/anti-inflammatory M2 phenotypes. We found that *hepcidin* mRNA upregulation depends on M1 polarization and *ferroportin* mRNA downregulation depends on M2 subtype polarization. All TLR agonists, except TLR2 agonist, polarize to pro-inflammatory macrophages and upregulate hepcidin mRNA expression. Cell pretreatment with IFN γ or inhibitor of PI3K, p38-MAPK and NF- κ B pathway involved in M1 polarization prior TLR4 activation, enhanced hepcidin upregulation. Conversely, *ferroportin* mRNA downregulation upon inflammation was strongly increased by macrophage polarization through TLR2- and 4-PI3K-dependent pathways, or through IL-1 β and TNF α priming prior to LPS activation.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Iron is a crucial element for growth and survival of mammals and microorganisms. In mammals systemic iron balance is maintained through the couple hepcidin hormone and ferroportin transmembrane iron transporter. Ferroportin, upregulated by iron loading, exports iron to blood circulation to control dietary iron absorption from enterocytes, macrophages iron recycling from senescent red blood cells and iron release from hepatocyte iron stock [1–7]. Hepcidin expressed mainly from hepatocytes correlates to systemic iron levels [8] through Bmp6-Smad1/5/8/4 pathway activation [9–15]. Hepcidin acts as an hormone to downregulate iron flux by interacting with ferroportin, inducing its internalization and degradation [16]. Hepcidin was initially isolated

based on its similarity to β -defensin host defense peptides, and it exhibits antimicrobial and antifungal activity [17,18]. Upon inflammation hepcidin expression is upregulated from liver and macrophages through activin B-Smad1/5/8/4 and IL-6-Stat3 pathways leading to hypoferrremia [19–26]. During inflammation, ferroportin transcription is also downregulated [5,27] and lead to hypoferrremia independently of hepcidin expression [28]. Clearly, immune responses directly affect expression of hepcidin and ferroportin in macrophages which in turns play a central role in the immune inflammatory mechanisms and in the priming of adaptative host responses to intracellular and extracellular pathogens.

Depending on microenvironment and in cellular cooperation with lymphocytes, monocytes polarize into active macrophage subpopulations [29–31]. Two functionally distinct forms of macrophages have been described, pro-inflammatory classically activated M1 macrophages, producing high level of IL-12 pro-inflammatory cytokine and low level of IL-10 anti-inflammatory cytokine (IL-12^{hi} IL-10^{lo}), and M2 (IL-12^{lo} IL-10^{hi}) immunoregulatory/anti-inflammatory, alternatively activated macrophages [32–36]. Activated M1 macrophages inhibit pathogen proliferation and kill pathogens. They secrete high levels of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, and IL-12), chemokines, and proteases, promote microbe destruction by stimulating type 1 T helper (Th1) adaptative responses and also by phagocytosis and

Abbreviations: TLR, toll-like receptor; ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; I κ B, inhibitor of NF- κ B; IKK, I κ B kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; LPS, lipopolysaccharide; BMDM, bone marrow-derived macrophages; Hamp1, hepcidin; Fpn, ferroportin; Pam₃CSK₄, triacylated lipopeptide Pam3CysSerLys4; poly(I:C), double strand poly(I:C); R848, resiquimod; ImQ, imiquimod; CpG, dinucleotide CpG-ODN.

* Corresponding author at: UMR7355, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans, France.

E-mail addresses: rafiou.agoro@cnrs-orleans.fr (R. Agoro),catherine.mura@cnrs-orleans.fr (C. Mura).<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.07.006>

1079-9796/© 2016 Published by Elsevier Inc.

production of ROS and NO toxic metabolites, through induction of the NADPH oxidase system and iNOS, respectively [36–38]. Activated M2 macrophages are associated with reduced pro-inflammatory cytokine secretion, and they have been divided into several subsets depending on the differentiation/activation signals encountered. M2 macrophages stimulate the Th2 adaptative response essential for humoral-mediated immunity, immunoregulatory and anti-inflammatory functionalities, pro-fibrotic and repair activities mediated through the production of polyamines and L-proline by arginase-1, in addition contribute to resistance to parasite infection, and tumour promotion [31,35].

Macrophage polarization is modulated by a range of signals including cytokines (IFN γ , IL-4, IL-13, TGF β , IL-10, IL-1 β or TNF α) and pathogen associated molecular patterns (PAMPs) [39–50]. Each signal engages receptors and rapidly triggers various downstream signal transduction pathways mainly through transient activation of a combination of kinases including I κ B kinase (IKK), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphoinositide 3-kinases (PI3K). The generation of M1 or M2 activated macrophages results from an intracellular equilibrium between the activation of p38- and JNK-MAP Kinase pathways promoting IL-12 as well as NF- κ B p65/p50 pro-inflammatory factors, and ERK1/2-MAP Kinase promoting IL-10 and NF- κ B p50/p50 anti-inflammatory factors [46,47,51,52]. Cell membrane phosphoinositides represent important second messengers for intracellular signaling and phosphoinositide 3-kinases (PI3K) activation is a critical metabolic signaling system in important regulator in several cellular processes and in myeloid immune cells polarization. PI3K promotes M2 polarization by triggering ERK1/2-MAPK activity and NF- κ B p50 expression in monocytes. Pharmacological inhibition of class IA PI3K, or gene deletion like in PI3K knock out mice, attenuates induction of M2 specific genes and sustains M1 polarization and high pro-inflammatory cytokine levels [53–56].

Inflammation regulates *hepcidin* and *ferroportin* expression in macrophages. According to microenvironment macrophages polarize into active subpopulations which play distinct role in immune response. In the present study, we investigated inflammation-induced *hepcidin* and *ferroportin* regulation in macrophages and in particular whether macrophage polarization could directly affect these major regulators of iron homeostasis. TLRs activation and cytokine priming revealed a differential relationship between *hepcidin* and *ferroportin* regulation related to macrophage polarization. Using specific cytokine priming and kinase inhibitors we document the link between M1 polarization and *hepcidin* upregulation while a subtype of M2-polarized macrophages leads to *ferroportin* downregulation.

2. Materials and methods

2.1. Animal models and treatments

C57BL/6 wild-type mice kept in filtered-cages were fed a standard commercial diet (R03 from Scientific Animal Food & Engineering; Augy, France) that includes 280 mg iron/kg. Groups of 4 adult mice (8–10 weeks old) reaching 22 to 25 g were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.1 mg/kg or 10 mg/kg of LPS, or with an equivalent volume of sterile saline solution (0.9% NaCl) as vehicle control. Mice were sacrificed at 4 h, and liver and peritoneal resident macrophages obtained by peritoneal cavity lavage of untreated mice with 5 mL of cold Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) were harvested. All animal experiments complied with the French Government's animal experiment regulations and were approved by the "Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans" (CCO; N° CLE CCO 2012-047).

2.2. Cell culture and treatments

Bone marrow cells were harvested from femur of C57/BL6 wild type mice. Cells were cultured for 10 days in Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM) supplemented with L-Glutamine 2 mM, HEPES 25 mM, 20% heat-inactivated horse serum, 30% L929 supernatants containing macrophage-stimulating factor (M-CSF), and streptomycin/penicillin. Then, macrophages were harvested with cold Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) and dispensed to culture plates in DMEM supplemented with L-Glutamine 2 mM, HEPES 25 mM, streptomycin/penicillin, and cultured for at least 12 h before stimulation.

When indicated cells were treated with 25 ng/mL LPS (Lipopolysaccharide *E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 100 ng/mL triacylated lipopeptide Pam₃CSK₄ (InvivoGen), 25 μ g/mL double strand poly(I:C) (InvivoGen), 100 ng/mL resiquimod (R848, InvivoGen), 1 μ g/mL imiquimod (ImQ, InvivoGen), 1 μ g/mL CpG dinucleotide (ODN 1668, InvivoGen) for indicated times before RNA extraction. When indicated cells were incubated with 5 μ M BMS-345541, 1 μ M SB203580, 10 μ M SP-600125, 10 μ M U0126, 1 μ M wortmannin for indicated time before LPS (25 ng/mL) incubation. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. For cytokine treatments, the cells were cultured with IFN γ (100 U/mL), IL-4 (10 ng/mL), TGF β (10 ng/mL), IL-1 β (10 ng/mL) or TNF α (10 ng/mL) (all from R&D systems) as indicated.

2.3. Quantitative RT-PCR

RNA was extracted by using Trizol (Sigma-Aldrich) and cDNA was synthesized by SuperScript III First-strand synthesis system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) per manufacturer's protocols. Quantitative PCR was performed with QuantiTect SYBR Green PCR system (Qiagen, Venlo, The Netherlands) on Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) by using *hepcidin* forward and reverse primers: 5'-CCTATCTCCATCAACAGATG-3' and 5'-TGCAACAGATACCACTG-3', *ferroportin* forward and reverse primers: 5'-CTCTGTCAGCCTGCTGTTG-3' and 5'-TCAGGATTGGGGCCAAGATG-3', other primers (*Il-12p40*, *Il-6*, *Inhibin b*) were Quantitect primers from Qiagen. RNA levels of the target genes were normalized against those of *Gapdh* and $-\Delta\text{ct}$ ($= -[\text{Ct target gene} - \text{Ct Gapdh}]$) or $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ method ($2^{\text{power} - [\Delta\text{ct treatment} - \Delta\text{ct vehicle}]}$) was used to calculate fold change.

2.4. Statistical analysis

GraphPad Prism Software was used for statistical analyses. Student's *t*-test was used for comparison between two groups and one-way ANOVA with Tukey's post-test correction for pairwise comparisons was used to compare more than two groups. Significance levels were indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3. Results

3.1. Upregulation of *hepcidin* and downregulation of *ferroportin* expression in liver and primary macrophages under LPS-induced acute inflammation

The expression of *hepcidin* and *ferroportin* mRNAs was analyzed in liver and resident peritoneal macrophages from LPS challenged mice kept on standard iron replete diet. LPS challenge (0.1 or 10 mg/kg) promoted an increase of *hepcidin* mRNA in liver and resident peritoneal macrophages in a dose response manner which was more pronounced in macrophages (Fig. 1), although *hepcidin* baseline was lower in macrophages than liver. In contrast LPS induced a dose dependent decrease of *ferroportin* in both liver and resident peritoneal macrophages and this regulation was more pronounced in macrophages as compared to liver (Fig. 1). The inflammation-induced regulation of *hepcidin* and *ferroportin* mRNA expression in macrophages could thus indicate an important role of macrophages in iron levels balance in host defense. However, *in vivo* macrophages represent a heterogeneous cell population with great plasticity. We thus were interested in clarifying these regulations according to macrophage differentiation.

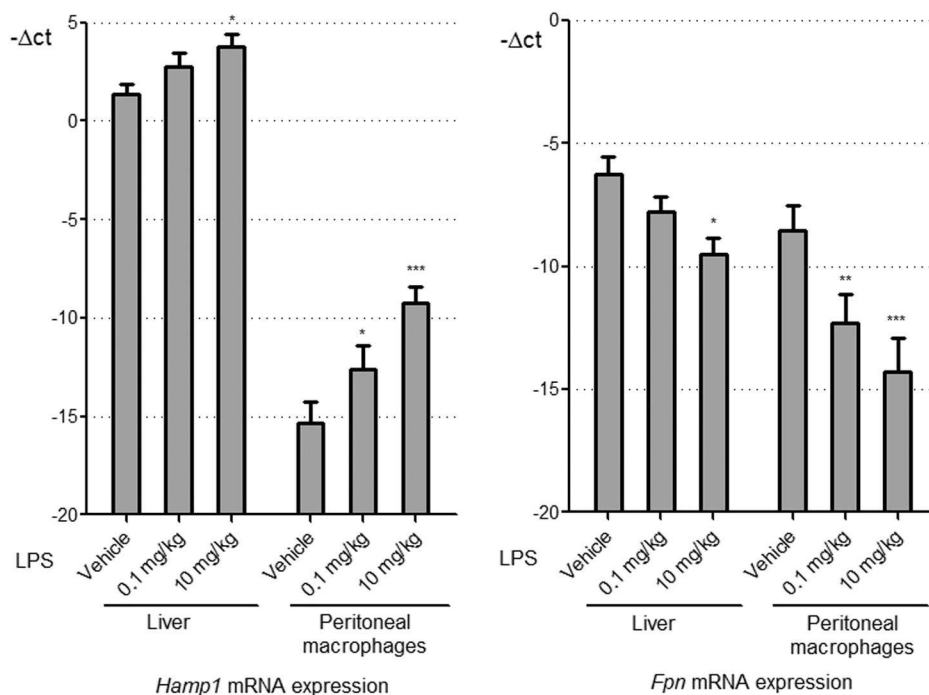


Fig. 1. LPS-induced inflammation up-regulates *hepcidin* and downregulates *ferroportin* mRNA expression. Levels of *hepcidin* (*Hamp1*) and *ferroportin* (*Fpn*) mRNA were analyzed in liver and peritoneal macrophages 4 h after LPS challenge of C57/BL6 wild-type mice with 0.1 mg/kg or 10 mg/kg i.p. in saline or vehicle. *Hamp1* and *Fpn* mRNA levels were measured from equivalent amount of total RNA by quantitative RT-PCR. Our conditions gave similar Ct for *Gapdh* in liver and macrophages. Histogram bars represent means of $-\Delta\text{ct}$ ($= -[\text{Ct target gene} - \text{Ct } \textit{Gapdh}]$) from 4 independent experiments \pm SD.

We next analyzed the kinetics of inflammation-regulated *hepcidin* and *ferroportin* gene expression in bone marrow-derived macrophages (BMDM). Time course of *hepcidin* mRNA expression in LPS-activated BMDM showed a transient upregulation pattern characterized with a modest increase at 2–3 h prior to a substantial increase with greatest expression at 8–12 h (~50–60-fold), then returning to baseline level (Fig. 2). LPS-activated BMDM displayed a rapid ~27-fold decrease of *ferroportin* mRNA levels reaching minimal levels at 4 h, then returning to essentially basal level by 12 h (Fig. 2). We next analyzed the expression of *inhibin b*, encoding activin B, and *Il-6*, known inducers of *hepcidin* transcription. Indeed, *hepcidin* expression was preceded by the transient expression of proinflammatory *inhibin b* and *Il-6* cytokines, peaking at 3 h and 6 h, respectively (Fig. 2). The results, thus, support a prominent delayed *hepcidin* mRNA upregulation by LPS consistent with an indirect secondary response resulting from feed-back activity of activin B and *Il-6* on macrophages, whereas the modest early *hepcidin* upregulation may likely result from the binding of induced transcription factors to the *hepcidin* promoter.

3.2. *Hepcidin* and *ferroportin* responses to LPS-induced inflammation depend on macrophage polarization

Monocytes differentiate into polarized macrophages according to cytokine microenvironment and can be subsequently activated by inflammatory signals such as LPS (Fig. 3). We thus asked how macrophage polarization might influence *hepcidin* and *ferroportin* regulation (Fig. 4). Macrophage were primed with $\text{IFN}\gamma$ which causes the most robust priming effects to classical pro-inflammatory M1 polarization or primed with *Il-4*, *TGF\beta*, *Il-1\beta* and $\text{TNF}\alpha$ leading to various subsets of M2 macrophages with a subsequent stimulation by LPS for 8 h. Neither of these cytokines alone could significantly induce *hepcidin* mRNA expression in these macrophage subpopulations. $\text{IFN}\gamma$ priming for 12 h prior to LPS stimulation strongly increased *hepcidin* mRNA levels as compared to treatment with LPS alone. In addition, $\text{IFN}\gamma$ primed macrophages

strongly expressed *Il-12*, a marker of pro-inflammatory polarized macrophages. While $\text{IFN}\gamma$ had no effect on *ferroportin* mRNA expression, $\text{IFN}\gamma$ priming impaired LPS-induced *ferroportin* downregulation. In contrast, *Il-4* priming prior to LPS stimulation resulted in a reduced *hepcidin* upregulation, and lower *Il-12* cytokine expression, compared to treatment with LPS alone. $\text{TGF}\beta$, *Il-1\beta*, and $\text{TNF}\alpha$ priming did not promote LPS-induced *hepcidin* upregulation, nor *Il-12* expression. Conversely, *Il-1\beta* and $\text{TNF}\alpha$ priming exacerbated LPS-induced downregulation of *ferroportin* mRNA, while *Il-4* or $\text{TGF}\beta$ did not affect *ferroportin* mRNA expression. Therefore, *hepcidin* upregulation in macrophages and *ferroportin* downregulation in response to LPS are highly related to macrophage inflammatory phenotype.

3.3. Molecular pathways involved in inflammation-regulated expression of *hepcidin* and *ferroportin* mRNAs

Macrophage polarization is influenced by intracellular PI3Ks, MAPKs and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activities. To further address the link between macrophage polarization and iron balance regulation, BMDM were treated with selective inhibitors for 1 h before LPS stimulation for 8 h (Fig. 3). No significant decline in cell viability was observed following exposure to different drugs using MTT assay (not shown), and inhibitors alone had no effect on *hepcidin* and *ferroportin* mRNA levels. PI3K activity is known to promote M2 polarization, and PI3K inhibition sustains M1 polarization. TLR4 activation triggers early M1 polarization but also recruits intracellular PI3K activity to polarize towards M2 resolution phenotype. Here, the PI3K inhibitor wortmannin (1 μM) greatly enhanced *hepcidin* mRNA upregulation in LPS treated BMDM, together with the expression of M1 pro-inflammatory cytokines such as *Il-12* (Fig. 5), *Il-6* and *inhibin b* (not shown). Conversely, wortmannin treatment abolished LPS-induced downregulation of *ferroportin* mRNA (Fig. 5). Thus the inhibition of PI3K, a negative regulator of M1 activation, supports the link between macrophage polarization and *hepcidin* upregulation coupled to *ferroportin* downregulation,

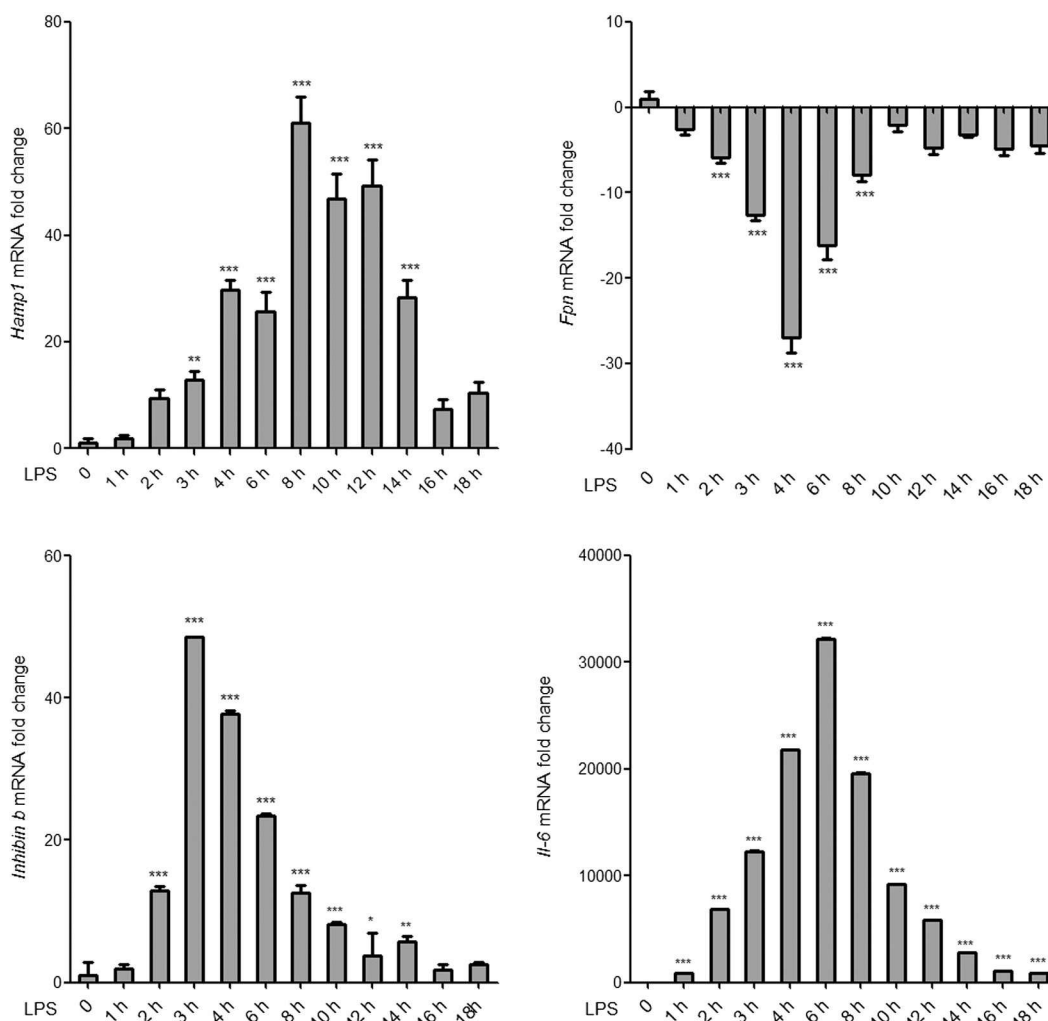


Fig. 2. Time course expression of *hepcidin* and *ferroportin* mRNA in LPS-activated macrophages. Bone marrow derived macrophages from C57/BL6 mice were incubated with LPS (25 ng/mL) or vehicle for the indicated duration of times. *Hepcidin* (*Hamp1*), *ferroportin* (*Fpn*), *inhibin b*, and *Il-6* mRNA levels were analyzed by RT-qPCR and normalized to *Gapdh* control. Fold change of mRNA levels normalized to *Capdh* are expressed relative to the level in control medium. Data are from one experiment representative of at least three independent experiments, histogram bars represent means \pm SD of triplicates.

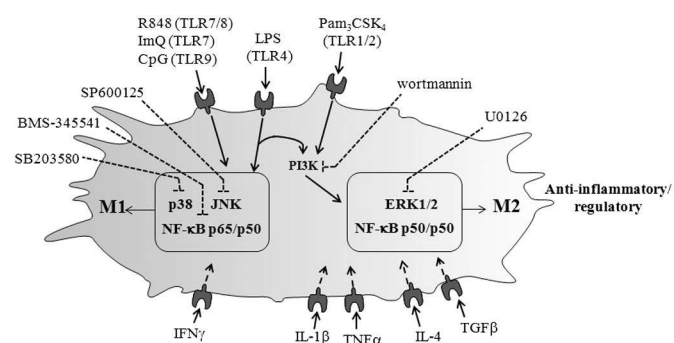


Fig. 3. Summary figure of macrophage stimuli and inhibitors for intracellular pathways used in this study. TLRs and cytokines modulate a range of functional macrophage phenotypes from pro-inflammatory M1 to anti-inflammatory/regulatory M2. M1 stimuli such as LPS, R848, ImQ, CpG signaling through TLR4, 7, 8, and 9 induce activation of p38, JNK and NF- κ B p65/p50 which leads to transcription of M1 genes. M2 stimuli, such as Pam3CSK4 signaling through TLR1/2 and late TLR4 activation, regulate M2 genes through PI3K, ERK1/2 and NF- κ B p50/p50. Pre-exposure to several cytokines (such as IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL4, TGF β) prime macrophages and modulate macrophage polarization and the response of TLR activation. A series of small molecules (wortmannin, SP600125, BMS-345541, SB203580, U0126) specifically inhibits the pathways involved in macrophage polarization.

exacerbating M1 polarization increased *hepcidin* upregulation while it abolished *ferroportin* downregulation.

Intracellular MAPKs activities play differential roles in intracellular signaling for macrophage polarization. Indeed, p38-MAPK and JNK promote M1 differentiation and pro-inflammatory cytokine production including IL-12, while ERK1/2-MAPK modulates M1/M2 homeostasis by upregulating anti-inflammatory IL-10 cytokine production which inhibits IL-12 expression. The p38-MAPK inhibitor SB203580 (1 μ M) and JNK inhibitor SP600125 (10 μ M) reduced LPS-induced *hepcidin* expression, together with the M1 marker *Il-12* mRNAs upregulation, and both inhibitors strongly accentuated the decrease in *ferroportin* mRNA expression compared to LPS alone (Fig. 5). The ERK1/2-MAPK inhibitor U0126 significantly increased *hepcidin* and slightly *Il-12* mRNA expression in LPS treated BMDM, while LPS-induced *ferroportin* mRNA downregulation was not significantly affected.

Furthermore, incubation with IKK inhibitor BMS-345541 (10 μ M) which blocks NF- κ B activation, reduced LPS-induced *hepcidin* mRNA upregulation by 50% (Fig. 5). LPS induction of *Il-12* (Fig. 5) and *Il-6* (not shown) was abrogated by IKK inhibitor, whereas *activin b* (not shown) mRNA expression was reduced. In contrast, BMS-345541 IKK inhibitor accentuated *ferroportin* mRNA downregulation as compared to LPS alone. NF- κ B activity plays a crucial role in the expression of

pro-inflammatory cytokines in M1 polarized macrophages, thus our results using inhibitor of NF- κ B activation support the role of M1 differentiation for *hepcidin* mRNA upregulation. These data strengthen

the link between M1 differentiation and *hepcidin* mRNA upregulation while M2 differentiation is associated with *ferroportin* mRNA downregulation.

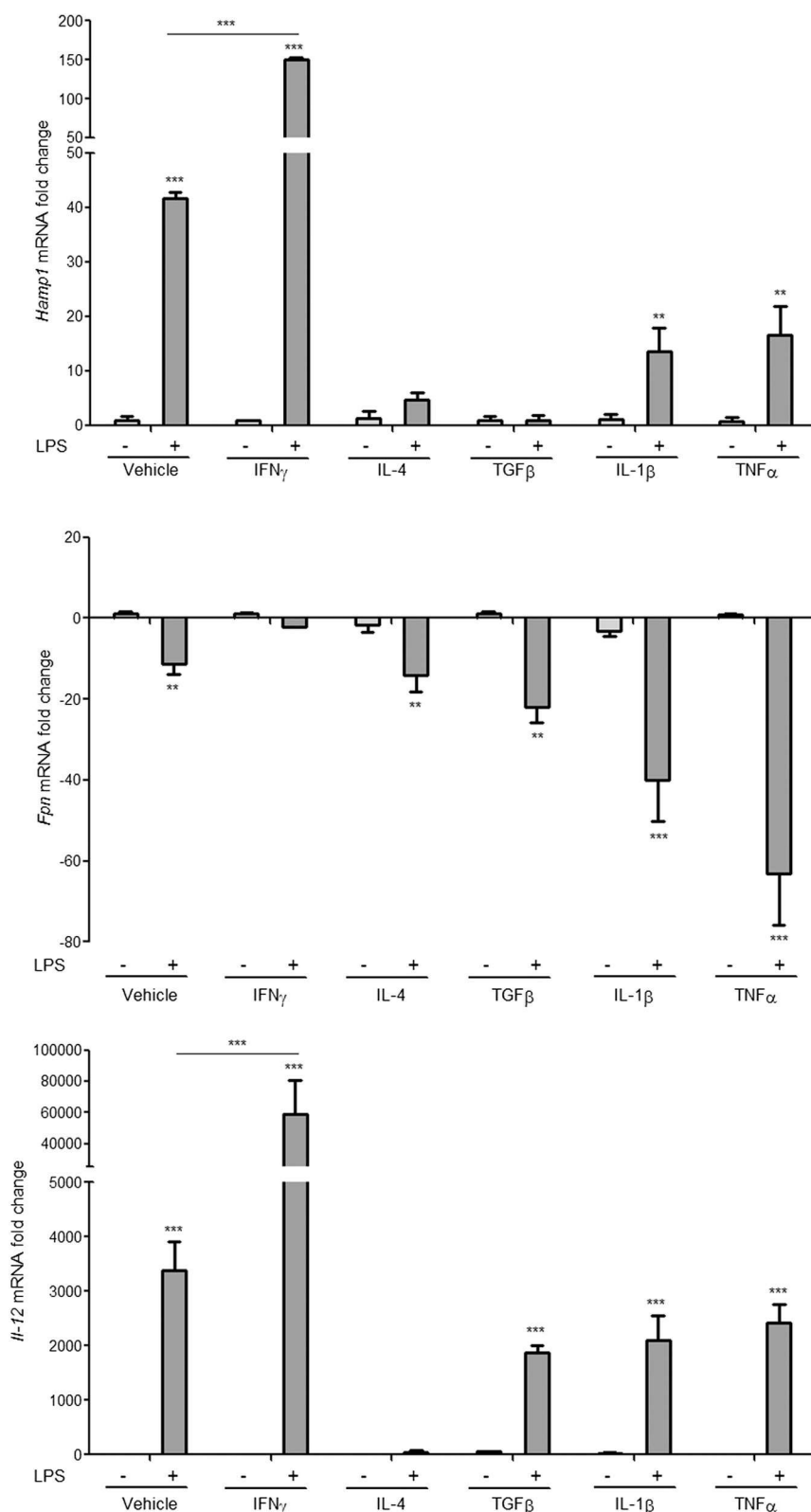


Fig. 4. *Hepcidin* and *ferroportin* mRNA expression in polarized macrophages. BMDMs were pre-incubated with IFN γ (50 U/mL), IL-4, TGF β , IL-1 β , or TNF α at 10 ng/mL for 16 h. Then cells were stimulated with vehicle or LPS (25 ng/mL) for 8 h. Levels of *hepcidin* (*Hamp1*), *ferroportin* (*Fpn*) and *Il-12* mRNA were analyzed by RT-qPCR, with fold change of mRNA level normalized to *Gapdh*, and values expressed relative to the level in vehicle treated cells in control medium. Data are from one experiment representative of at least three independent experiments, histogram bars represent means \pm SD of triplicates.

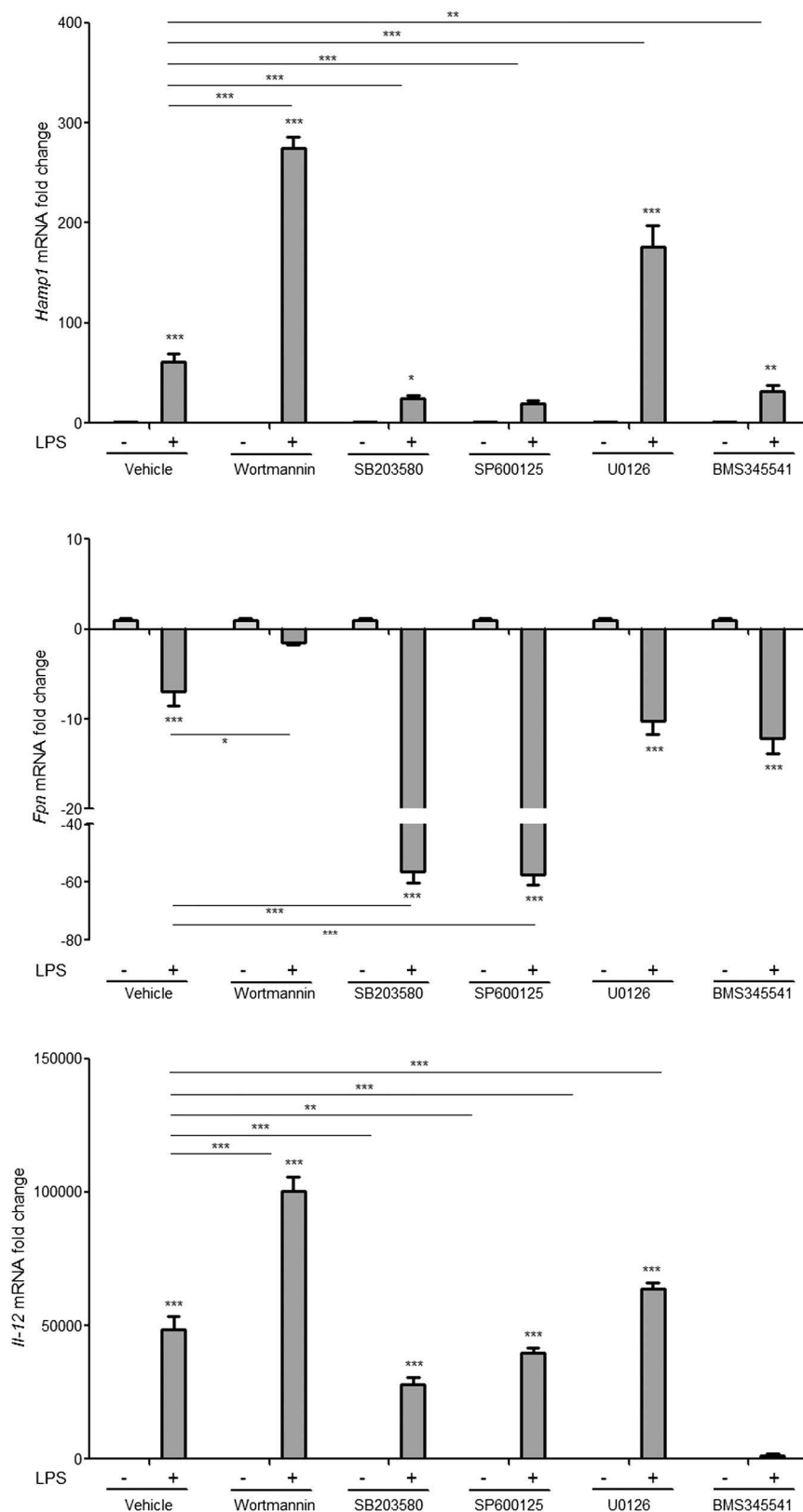
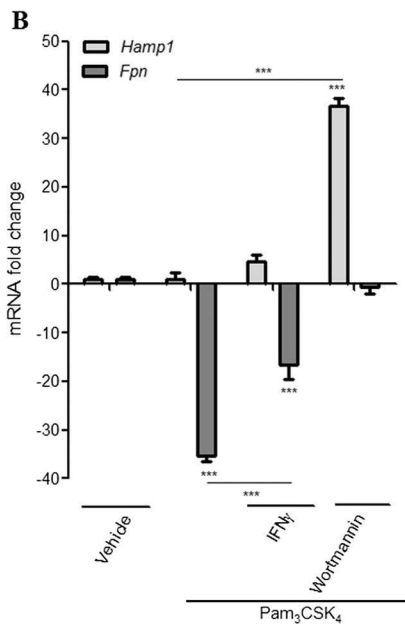
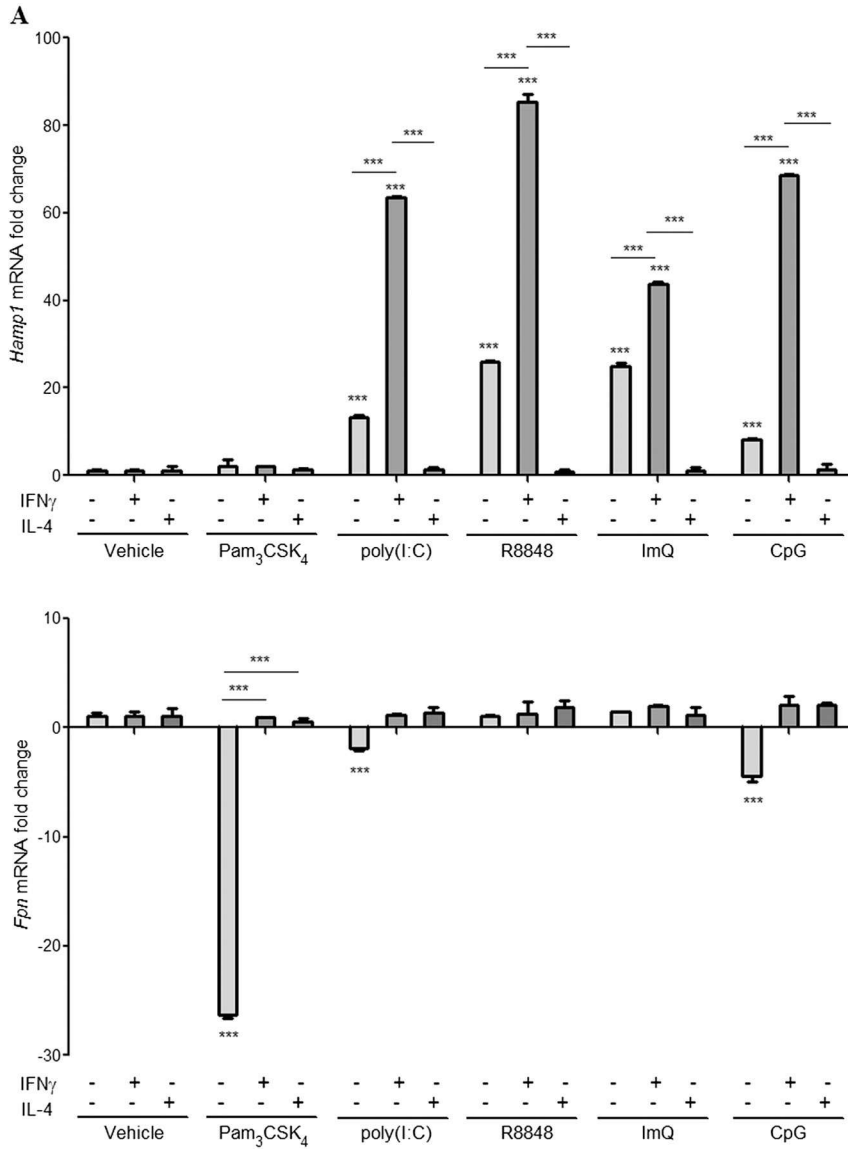


Fig. 5. Signal transduction pathway for hepcidin and ferroportin transcription regulation upon Tlr4-induced inflammation. *Hepcidin* (*Hamp1*), *ferroportin* (*Fpn*) and *Il-12* mRNA expression in BMDM using a series of selective inhibitors for signal transduction pathways. BMDM were treated for 1 h with PI3K inhibitor wortmannin, p38-MAPK inhibitor SB203580, JNK inhibitor SP600125, MEK-Erk1/2-MAPK inhibitor U0126, or NF- κ B inhibitor BMS-345541 before the addition of LPS (25 ng/mL) for 8 h. The fold change of mRNA levels normalized to *Gapdh* relative to the level in vehicle treated cells are shown. Data are from one experiment representative of at least three independent experiments, histogram bars represent means \pm SD of triplicates.



3.4. Differential regulation of hepcidin and ferroportin expression in response to TLRs activation

Immune responses are engaged through pattern recognition receptors (PRRs) including transmembrane Toll-like receptors (TLRs) and cytosolic receptors and sensors expressed in innate immune cells, such as monocytes/macrophages. Each PRR stimulated by distinct pathogen associated molecular patterns (PAMPs) initiate a specific outcome including macrophage polarization. TLR3, 7, 8, and 9 activation stimulate macrophage M1 polarization producing high IL-12 levels, while TLR2 induces PI3K pathway, and ERK/IL-10, leading to M2 subset [43,45,47,49,50,52]. To further examined the involvement of various PRRs in the *hepcidin*- and *ferroportin*-regulated inflammatory pathways, PRR activation was specifically addressed by using targeted agonists. *Hepcidin* expression was efficiently upregulated by agonists of TLR7/8 (R848) and TLR7 (ImQ) and slightly upregulated with agonists of TLR3 (poly(I:C)) and TLR9 (CpG-ODN), as compared with vehicle-treated controls cells (Fig. 6A). On the other hand, Pam₃CSK₄ lipopeptide agonist of TLR1/2 was ineffective to upregulate *hepcidin* expression. *Ferroportin* expression that was decreased by TLR4 agonist LPS, was downregulated for up to 8 h by the TLR1/2 agonist Pam₃CSK₄; TLR3 and TLR9 agonists led to a modest, but significant, reductions in *ferroportin* expression, while agonists of TLR7 and TLR8 did not alter *ferroportin* expression (Fig. 6A). Alike TLR4, TLR7, 8 and 9 agonists were also great inducers of *Il-6*, *inhibin b* and *Il-12* (not shown), whereas the TLR1/2 agonist moderately induced these cytokines compared to LPS alone. TLR2 pathway has been reported to favor M2 polarization [45,47,50]. To further address the influence of macrophage polarization on TLR2 induced *hepcidin/ferroportin* gene balance, we next primed BMDM prior to TLR2 activation. Interestingly, M1 polarization through IFN γ priming prevented TLR1/2-induced *ferroportin* downregulation (Fig. 6A), while IFN γ priming potentiated *hepcidin* upregulation by TLR3, 7, 8 and 9 agonists (Fig. 6A). Conversely, M2 polarization through IL-4 priming prior to TLR3,7,8 or 9 stimulation abrogated *ferroportin* downregulation and *hepcidin* upregulation. Thus, macrophage polarization induced through various TLR stimulation plays a fundamental role in *hepcidin* and *ferroportin* mRNA regulation. Furthermore, wortmannin PI3K-inhibitor pretreatment prevented *ferroportin* downregulation in response to TLR1/2 agonist while it restored *hepcidin* mRNA upregulation (Fig. 6B). Thus, macrophage polarization directly affects *hepcidin/ferroportin* balance regulation.

4. Discussion

Macrophages play an important role in the innate and acquired host responses to pathogens and represent a heterogeneous cell population of immune cells. Depending on microenvironment monocytes polarize into active macrophage subpopulations, classical pro-inflammatory M1 or either one of the M2 subtypes, and acquire specific phenotype characterized by distinct signatures of gene expression and functional programs. Here, we show that inflammatory stimuli induced a differential *hepcidin* and *ferroportin* mRNA regulation depending on macrophage polarization. Selective stimulation of TLR4,7,8 or 9 triggers *hepcidin* expression, and IFN γ priming potentiates *hepcidin* upregulation. Conversely, TLR2 stimulation downregulates *ferroportin* expression. TLR4 stimulation also slightly downregulates *ferroportin* expression and this is exacerbated after priming with IL-1 β and TNF α pro-inflammatory cytokines. The differential *hepcidin* and *ferroportin* mRNA regulation is influenced by PI3K and MAPKs pathways. PI3K

inhibition enhances LPS/TLR4 induced *hepcidin* expression and abrogates *ferroportin* downregulation in LPS/TLR4- and Pam₃CSK₄/TLR2-activated BMDM. ERK1/2 inhibition also enhances *hepcidin* expression, whereas p38-MAPK inhibitor impairs *hepcidin* expression and exacerbated *ferroportin* downregulation in LPS-stimulated macrophages. Indeed, the engagement of TLR3, 4, 7, 8, and 9 stimulates macrophage M1 polarization through p38-MAPK and NF- κ B [43–51]. However, plasma membrane expressed TLRs, TLR4 and TLR3, have been shown to recruit intracellular PI3K activity promoting ERK1/2-MAPK to polarize to M2 as one of the multiple safety processes preventing excessive and prolonged activation of pro-inflammation [53,57]. Conversely, plasma membrane TLR2 induces early PI3K pathway, and ERK1/2-MAPK activation, leading to M2 polarization [43,45,47,49,50,52]. In macrophages, *hepcidin* upregulation is thus influenced by pro-inflammatory M1 conditions while *ferroportin* downregulation is influenced by a subtype of M2-polarized macrophages.

Microorganisms require iron for the biosynthesis of macromolecules and enzyme functions, and pathogen developed systems to take up iron from their host. Thus, a major innate immune strategy is to limit iron availability by regulating host genes involved in iron homeostasis. A model for local analysis of host and pathogen responses revealed a cross-talk for iron acquisition. Upon infection, innate immune defenses trigger host-induced metal iron limitation by regulating several components of iron metabolism including *hepcidin* and other acute phase proteins usually produced by the liver, as well as pro-inflammatory cytokines, while pathogenic bacteria upregulate a series of genes to acquire host iron [58]. Here, we show that LPS-challenged mice exhibit *hepcidin* mRNA upregulation and *ferroportin* mRNA downregulation in the liver, but also, with a greater magnitude in peritoneal macrophages. Although the basal levels of *hepcidin* mRNA in macrophages is much lower than in liver, macrophage polarization to M1 according to micro-environment, such as the presence of IFN γ , significantly enhanced *hepcidin* upregulation, while a subtype of M2-polarized macrophages significantly exacerbated *ferroportin* downregulation. Macrophages are widely distributed immune cells in peripheral tissues and are rapidly recruited to sites of inflammation to play major roles in defense, and thus, the correlation of *hepcidin* and *ferroportin* regulation to macrophage differentiation supports a local role of these proteins in activated macrophages. Therefore, *hepcidin* produced from liver is a mediator of innate immunity by addressing *ferroportin* to induce hypoferrremia, but host immune response to bacterial infection may also include *hepcidin* and *ferroportin* regulation in macrophage. Indeed, activated M1 in a Th₁-IFN γ producing environment trigger *hepcidin* expression that may play both a paracrine role by decreasing *ferroportin* activity to inhibit iron release from macrophages, as well as an innate defensin antimicrobial peptide through bacterial cell wall damage. Conversely, M2-activated macrophages subsets, by decreasing *ferroportin* levels also contribute to sustain locally the role of inflammation by holding iron in macrophages.

Authorship contributions

RA and CM contributed to the investigations, data analysis and interpretation. CM design the study and wrote manuscript, RA reviewed and provided comments on this manuscript, and approved the final version.

Conflicts of interest declaration

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Fig. 6. Regulation of the inflammation-induced *hepcidin* and *ferroportin* mRNA levels *in vitro*. A. BMDM were stimulated with Pam₃CSK₄ (100 ng/mL), poly(I:C) (25 μ g/mL), R848 (100 ng/mL), ImQ (1 μ g/mL), and CpG-ODN (1 μ g/mL) as indicated. After 8 h the mRNA levels of *hepcidin* (*Hamp1*) and *ferroportin* (*Fpn*) were analyzed by RT-qPCR. B. BMDM were primed with either IFN γ (50 U/mL) for 16 h or treated with PI3K inhibitor wortmannin (1 μ M) for 1 h before Pam₃CSK₄ (100 ng/mL) stimulation. *Hepcidin* (*Hamp1*) and *ferroportin* (*Fpn*) mRNA levels were analyzed by RT-qPCR, after 8 h. The fold change of mRNA levels normalized to the level in vehicle treated cells are shown. Data are from one experiment representative of at least three independent experiments, histogram bars represent means \pm SD of triplicates.

Funding

This study was supported by CNRS (permanent funding for CNRS unit INEM 7355) and University Orléans. The funding source had no role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Acknowledgements

We thank Valérie Quesniaux and François Erard of INEM-CNRS, for helpful discussion and manuscript review. RA was supported by a fellowship from Ministère de la Recherche, France.

References

- [1] S. Abboud, D.J. Haile, A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism, *J. Biol. Chem* 275 (2000) 19906–19912.
- [2] A. Donovan, A. Brownlie, Y. Zhou, J. Shepard, S. Pratt, J. Moynihan, B.H. Paw, A. Drejer, B. Barut, A. Zapata, T.C. Law, C. Brugnara, S. Lux, G.S. Pinkus, J.L. Pinkus, P.D. Kingsley, J. Palis, M.D. Fleming, N.C. Andrews, L.I. Zon, Positional cloning of zebrafish *ferroportin 1* identifies a conserved vertebrate iron exporter, *Nature* 403 (2000) 776–781.
- [3] A.T. McKie, P. Marciani, A. Rolfs, K. Brennan, K. Wehr, D. Barrow, S. Miret, A. Bomford, T.J. Peters, F. Farzaneh, M.A. Hediger, M.W. Hentze, R.J. Simpson, A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation, *Mol. Cell* 5 (2000) 299–309.
- [4] A. Donovan, C.A. Lima, J.L. Pinkus, L.I. Zon, S. Robine, N.C. Andrews, The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis, *Cell Metab* 1 (2005) 191–200.
- [5] F. Yang, X.B. Liu, M. Quinones, P.C. Melby, A. Ghio, D.J. Haile, Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation, *J. Biol. Chem* 277 (2002) 39786–39791.
- [6] M.K. Knutson, M.R. Vafa, D.J. Haile, M. Wessling-Resnick, Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages, *Blood* 102 (2003) 4191–4197.
- [7] C. Delaby, N. Pilard, A.S. Gonçalves, C. Beaumont, F. Canonne-Hergaux, Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin, *Blood* 106 (2005) 3979–3984.
- [8] C. Pigeon, G. Ilyin, B. Courselaud, P. Leroyer, B. Turlin, P. Brissot, O. Loreal, A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload, *J. Biol. Chem* 276 (2001) 7811–7819.
- [9] R.H. Wang, C. Li, X. Xu, Y. Zheng, C. Xiao, P. Zerfas, S. Cooperman, M. Eckhaus, T. Rouault, L. Mishra, C.X. Deng, A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression, *Cell Metab* 2 (2005) 399–409.
- [10] J.L. Babitt, F.W. Huang, D.M. Wrighting, Y. Xia, Y. Sidis, T.A. Samad, J.A. Campagna, R.T. Chung, A.L. Schneyer, C.J. Woolf, N.C. Andrews, H.Y. Lin, Bone morphogenetic protein signaling by hepcidin regulates hepcidin expression, *Nat. Genet* 38 (2006) 531–539.
- [11] G. Casanovas, K. Mleczo-Sanecka, S. Altamura, M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD, *J. Mol. Med* 87 (2009) 471–480.
- [12] L. Kautz, D. Meynard, A. Monnier, V. Darnaud, R. Bouvet, R.H. Wang, C. Deng, S. Vaulont, J. Mosser, H. Coppin, M.P. Roth, Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Id1, and Atoh8 in the mouse liver, *Blood* 112 (2008) 1503–1509.
- [13] B. Andriopoulos Jr., E. Corradini, Y. Xia, S.A. Faasse, S. Chen, L. Grgurevic, M.D. Knutson, A. Pietrangolo, S. Vukicevic, H.Y. Lin, J.L. Babitt, BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism, *Nat. Genet* 41 (2009) 482–487.
- [14] D. Meynard, L. Kautz, V. Darnaud, F. Canonne-Hergaux, H. Coppin, M.P. Roth, Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload, *Nat. Genet* 41 (2009) 478–481.
- [15] E. Corradini, D. Meynard, Q. Wu, S. Chen, P. Ventura, A. Pietrangolo, J.L. Babitt, Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice, *Hepatology* 54 (2011) 273–284.
- [16] E. Nemeth, M.S. Tuttle, J. Powelson, M.B. Vaughn, A. Donovan, D.M. Ward, T. Ganz, J. Kaplan, Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization, *Science* 306 (2004) 2090–2093.
- [17] A. Krause, S. Neitz, H.J. Mägert, A. Schulz, W.G. Forssmann, P. Schulz-Knappe, K. Adermann, LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity, *FEBS Lett* 480 (2000) 147–150.
- [18] C.H. Park, E.V. Valore, A.J. Waring, T. Ganz, Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J. Biol. Chem* 276 (2001) 7806–7810.
- [19] G. Nicolas, C. Chauvet, L. Viatte, J.L. Danan, X. Bigard, I. Devaux, C. Beaumont, A. Kahn, S. Vaulont, The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation, *J. Clin. Invest* 110 (2002) 1037–1044.
- [20] E. Nemeth, E.V. Valore, M. Territo, G. Schiller, A. Lichtenstein, T. Ganz, Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein, *Blood* 101 (2003) 2461–2463.
- [21] C. Peyssonneaux, A.S. Zinkernagel, V. Dalta, X. Lauth, R.S. Johnson, V. Nizet, TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens, *Blood* 107 (2006) 3727–3732.
- [22] N.B. Nguyen, K.D. Callaghan, A.J. Ghio, D.J. Haile, F. Yang, Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 2091 (2006) L417–L425.
- [23] A.U. Steinbicker, C. Sachidanandan, A.J. Vonner, R.Z. Yusuf, D.Y. Deng, C.S. Lai, K.M. Rauwerdink, J.C. Winn, B. Saez, C.M. Cook, B.A. Szekeley, C.N. Roy, J.S. Seehra, G.D. Cuny, D.T. Scadden, R.T. Peterson, K.D. Bloch, P.B. Yu, Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation, *Blood* 117 (2011) 4915–4923.
- [24] C. Besson-Fournier, C. Latour, L. Kautz, J. Bertrand, T. Ganz, M.P. Roth, H. Copin, Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling, *Blood* 120 (2012) 431–439.
- [25] D.M. Wrighting, N.C. Andrews, Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3, *Blood* 108 (2006) 3204–3209.
- [26] M.V. Verga Falzacappa, M. Vujic Spasic, R. Kessler, J. Stolte, M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation, *Blood* 109 (2007) 353–358.
- [27] X.B. Liu, N.B.H. Nguyen, K.D. Marquess, F. Yang, D.J. Haile, Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages, *Blood Cells Mol. Dis* 35 (2005) 47–56.
- [28] C. Guida, S. Altamura, F.A. Klein, B. Galy, M. Boutros, A.J. Ulmer, M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferrremia, *Blood* 125 (2015) 2265–2275.
- [29] A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, A. Sica, Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends Immunol* 23 (2002) 549–555.
- [30] A.J. Fleetwood, T. Lawrence, J.A. Hamilton, A.D. Cook, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation, *J. Immunol* 178 (2007) 5245–5252.
- [31] A. Sica, A. Mantovani, Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas, *J. Clin. Invest* 122 (2012) 787–795.
- [32] B. Passlick, D. Flieger, H.W. Ziegler-Heitbrock, Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood, *Blood* 74 (1989) 2527–2534.
- [33] H.W.L. Zeigler-Heitbrock, G. Fingerle, M. Strobel, W. Schraut, F. Stetler, C. Schütt, B. Passlick, A. Pforte, The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages, *European J. Immunol* 23 (1993) 2053–2058.
- [34] C.D. Mills, K. Kincaid, J.M. Alt, M.J. Heilman, A.M. Hill, M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm, *J. Immunol* 164 (2000) 6166–6173.
- [35] C.F. Anderson, D.M. Mosser, A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage, *J. Leukoc. Biol* 72 (2002) 101–106.
- [36] F. Geissmann, S. Jung, D.R. Littman, Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties, *Immunity* 19 (2003) 71–82.
- [37] T. Okamoto, K. Gohil, E.I. Finkelstein, P. Bove, T. Akaike, A. van der Vliet, Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 286 (2004) L198–L209.
- [38] P.C. Zeidler, L.M. Millecchia, V. Castranova, Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced pulmonary inflammation, *Toxicol. Appl. Pharmacol* 195 (2004) 45–54.
- [39] C.F. Nathan, H.W. Murray, M.E. Wiebe, B.Y. Rubin, Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J. Exp. Med* 158 (1983) 670–689.
- [40] R.B. Lorschach, W.J. Murphy, C.J. Lowenstein, S.H. Snyder, S.W. Russell, Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem* 268 (1993) 1908–1913.
- [41] G.J. Jurkovich, W.J. Mileski, R.V. Maier, R.K. Winn, C.L. Rice, Interferon gamma increases sensitivity to endotoxin, *J. Surg. Res* 51 (1991) 197–203.
- [42] R. Kamijo, J. Le, D. Shapiro, E.A. Havell, S. Huang, M. Aguet, M. Bosland, J. Vilcek, Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide, *J. Exp. Med* 178 (1993) 1435–1440.
- [43] M. Hirschfeld, J.J. Weis, V. Toshchakov, C.A. Salkowski, M.J. Cody, D.C. Ward, N. Qureshi, S.M. Michalek, S.N. Vogel, Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages, *Infect. Immunity* 69 (2001) 1477–1482.
- [44] B. Pulendran, P. Kumar, C.W. Cutler, M. Mohammadzadeh, T. Van Dyke, J. Bancheau, Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo, *J. Immunol* 167 (2001) 5067–5076.
- [45] V. Toshchakov, B.W. Jones, P.Y. Perera, G. Thomas, M.J. Cody, S. Zhang, B.R.G. Williams, J. Major, T.A. Hamilton, M.J. Fenton, S.N. Vogel, TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages, *Nat. Immunol* 3 (2002) 392–398.
- [46] S. Agrawal, A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke, B. Pulendran, Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos, *J. Immunol* 171 (2003) 4984–4989.
- [47] S. Dillon, A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, B. Pulendran, A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells, *J. Immunol* 172 (2004) 4733–4743.

- [48] G. Napolitani, A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells, *Nat. Immunol* 6 (2005) 769–776.
- [49] X. Hu, P.K. Paik, J. Chen, A. Yarilina, L. Kockeritz, T.T. Lu, J.R. Woodgett, L.B. Ivashkiv, IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins, *Immunity* 24 (2006) 563–574.
- [50] M.H. Wenink, K.C.M. Santegoets, J.C.A. Broen, L. van Bon, S. Abdollahi-Roodsaz, C. Popa, R. Huijbens, T. Remijn, E. Lubberts, P.L.C.M. van Riel, W.B. van den Berg, T.R.D.J. Radstake, TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop, *J. Immunol* 183 (2009) 6960–6970.
- [51] J. Bohuslav, V.V. Kravchenko, G.C. Parry, J.H. Erlich, S. Gerondakis, N. Mackman, R.J. Ulevitch, Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF- κ B, *J. Clin. Invest* 102 (1998) 1645–1652.
- [52] A. Agrawal, S. Dillon, T.L. Denning, B. Pulendran, ERK1 $-/-$ mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol* 176 (2006) 5788–5796.
- [53] N. Wang, H. Liang, K. Zen, Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance, *Frontiers Immunol* 5 (2014) 1–9.
- [54] T. Fukao, S. Koyasu, PI3K and negative regulation of TLR signaling, *Trends Immunol* 24 (2003) 358–363.
- [55] D. Ruckerl, S.J. Jenkins, N.N. Laqtom, I.J. Gallagher, T.E. Sutherland, S. Duncan, A.H. Buck, J.E. Allen, Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo, *Blood* 120 (2012) 2307–2316.
- [56] A. Byles, A.J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D.W. Lamming, D.M. Sabatini, B.D. Manning, T. Horng, The TSC–mTOR pathway regulates macrophage polarization, *Nat. Commun* 4 (2013) 2834.
- [57] E. Aksoy, W.V. Berghe, S. Detienne, Z. Amraoui, K.A. Fitzgerald, G. Haegeman, M. Goldman, F. Willems, Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF- κ B activation and IFN- β synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4, *Eur. J. Immunol* 35 (2005) 2200–2209.
- [58] S.T. Motley, B.J. Morrow, X. Liu, L.L. Dodge, A. Vitiello, C.K. Ward, K.J. Shaw, Simultaneous analysis of host and pathogen interactions during an in vivo infection reveals local induction of host acute phase response proteins, a novel bacterial stress response, and evidence of a host-imposed metal ion limited environment, *Cell. Microbiol.* 6 (2004) 849–865.

V.2. La polarisation des macrophages est associée à un régime en fer

Article 2: Cell iron status modulates macrophage polarization

Rafiou Agoro, Valerie F. J. Quesniaux and Catherine Mura

Manuscrit en préparation

La réaction inflammatoire est un processus de défense de l'organisme activé par des PAMPs ou des signaux de danger « Danger Associated Molecular Pattern » (DAMPs). Cependant, une réponse inflammatoire exacerbée est associée à des dommages tissulaires. Deux types de cytokines interviennent au cours du processus inflammatoire: les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires. La production de ces diverses cytokines dépend de plusieurs facteurs de transcription exprimés différemment dans les sous types de macrophages matures. Ces cytokines sont produites par plusieurs types de cellules de l'immunité parmi lesquelles les macrophages. Dans cette partie de thèse, nous avons évalué l'impact du fer sur la polarisation des macrophages M1 et M2 *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons utilisé des souris C57/BL6 soumises soit à un régime enrichi en fer pendant 3 jours (25000 mg de fer carbonyle/kg d'aliments) soit à un régime déficient en fer pendant 14 jours (moins de 20 mg de fer carbonyle/kg d'aliments) ou à un régime standard (280 mg de fer/kg), les macrophages péritonéaux et le foie sont prélevés et analysés pour caractériser le profil phénotypique des macrophages dans ces compartiments. *In vitro*, nous avons travaillé essentiellement sur les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM) afin d'analyser l'influence du fer sur leur réponse immune.

Nous observons qu'une augmentation de la concentration de fer dans un régime alimentaire est associée à une expression plus élevée de marqueurs de macrophages de types M2 tels que l'arginase 1 (*Arg1*), la chitinase 1 (*ym1*) dans le foie et les macrophages péritonéaux. De plus, l'augmentation du taux de fer est également corrélée à une expression significativement plus élevée des marqueurs des macrophages M2 comme Stat6 et l'IL-10, suggérant ainsi un changement de la balance M1/M2 de phénotype des macrophages en réponse au fer.

Pour comprendre le rôle potentiel du taux de fer dans l'organisme en association avec un changement de la réponse inflammatoire, nous avons soumis les souris à un régime soit enrichi soit déficient en fer suivi d'un traitement avec une molécule inflammatoire, le LPS à une dose subléthale (50 µg/kg par voie intra-péritonéale). Nous remarquons qu'un régime alimentaire de déficience en fer est associé à une diminution de l'expression d'hepcidine (*Hamp*) et de *Bmp6* et cet effet induit une augmentation de l'IL-12 suivie d'une diminution de l'IL-10 en réponse au LPS suggérant un rôle pro-inflammatoire d'un régime déficient en fer. Ainsi, un changement de la balance en fer nutritionnel impacte la réponse immunitaire en affectant le phénotype des macrophages.

Pour mieux comprendre le changement du profil inflammatoire observé par une modification du taux de fer alimentaire, nous avons par la suite prélevé des BMDM que nous prétraitions dans un milieu enrichi en fer (ferric ammonium citrate, FAC) suivi d'une stimulation avec le LPS. Un traitement des macrophages avec le FAC augmente le taux de fer intracellulaire mesuré par l'effet « chélateo-fluorescent » de la calcéine associé à une production plus élevée des espèces réactives oxygénées. Nous avons par la suite caractérisé le profil phénotypique des macrophages traités avec le FAC et nous remarquons une diminution de l'expression des marqueurs de macrophages M1 comme le CD86 et le marqueur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH-II). De plus, nous avons aussi remarqué que l'induction de ces marqueurs lors de la polarisation des macrophages M1 par l'IFN- γ est réduite avec un prétraitement en fer.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du changement de profil des macrophages entraîné par le fer sur la réponse immune induite par le LPS. Des analyses, transcriptionnelles et protéiques ont été ainsi réalisées sur les macrophages traités par le FAC en combinaison avec le LPS. Dans nos conditions, le traitement des macrophages avec le FAC seul n'induit pas l'expression ou la sécrétion des cytokines. Par ailleurs, nous observons aussi qu'une augmentation du taux de fer intracellulaire impacte négativement la translocation de NF- κ B dans le noyau, suivie d'une réduction drastique des marqueurs pro-M1 comme l'IL-12, l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1 β au niveau transcriptionnel et protéique en réponse au LPS. D'une manière intéressante l'expression d'*iNOS*, marqueur des macrophages M1 nécessaire à la production du monoxyde d'azote (NO) est également réduite avec le FAC en réponse au LPS.

Nous avons décrit dans l'article précédent que l'expression d'hepcidine est associée aux macrophages M1. Nous avons donc cherché à déterminer l'effet d'une augmentation du fer intracellulaire sur l'expression d'hepcidine en réponse au LPS. L'expression d'hepcidine en

réponse au FAC seul dans les macrophages reste stable, alors que celle de la ferroportine est surexprimée et corrélée à l'augmentation de fer intracellulaire. Nous notons cependant que le traitement au fer diminue d'une manière dose-dépendante l'expression de l'hepcidine. A l'inverse, comme déjà décrit, nous notons une abolition de la réduction de l'expression de la ferroportine en réponse au LPS. Ces effets semblent similaires à ceux décrits lors du traitement des macrophages avec des cytokines conduisant à une polarisation de type M2 comme mentionné dans l'article 1.

En conclusion ce travail suggère *in vivo* et *in vitro* un changement du phénotype des macrophages en réponse au fer.

Cell iron status modulates macrophage polarization

Rafiou Agoro^{a, b}, Valerie F. J. Quesniaux^{a, b} and Catherine Mura^{a, b}

^a Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans, France; ^bUniversity of Orléans, Orléans, France

Corresponding author:

Catherine Mura

UMR7355

3B rue de la Ferrollerie

45071 Orléans, France

Fax : +33 238 25 79 79

e mail : catherine.mura@cnrs-orleans.fr

ABSTRACT

Macrophages are characterized by their phenotypic plasticity with a crucial role in both innate and adaptive immunity. Reprogramming intracellular metabolism, in response to microenvironmental signals, is required for the proper M1/M2 polarization and functions of macrophages. To assess the impact of iron on polarization of the immune response, a series of phenotype markers were analyzed *in vivo* and *in vitro*. We showed that iron-enriched diet was correlated with the increase of M2 markers expression such as *Arg1* or *Ym1* in liver and peritoneal macrophages, while iron deficiency decreased *Arg1* expression. Further, intracellular iron loading reduced the percentage of macrophages expressing M1 constitutive cell surface co-stimulatory CD86 and CMH-II molecules. We also used acute LPS-induced inflammation *in vivo* and *in vitro* to evidence the immune outcome depending on the iron status. *In vivo* and *in vitro* the IL-12/IL-10 balance decreased with macrophage iron loading thus polarizing to type 2 response. In addition, *in vitro*, iron loaded macrophages modulated the pro-inflammatory response induced by LPS by reducing NF- κ B p65 nuclear translocation as well as the expression of iNos and IL-1 β , IL-6, and TNF- α at the mRNA and products level. The increase of intracellular iron induced a reduction of LPS-induced *hepcidin* gene expression and abolished *ferroportin* down-regulation in macrophages, which was previously shown to be regulated according to macrophage polarization. Together, the results indicate that iron can modulate inflammatory responses outcome, elevated iron level reduced M1 phenotype and LPS-induced inflammatory response.

Keyword: Macrophages, Inflammation, Iron, Heparin

Abbreviations: Hamp1, hepcidin; Inhbb, inhibin b; Fpn, ferroportin; Bmp, bone morphogenetic protein; IL, interleukin; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; Arg, arginase; Ym, chitinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; BMDM, bone marrow-derived macrophages; LPS, lipopolysaccharide; TLR; toll-like receptor.

Acknowledgements: RA was supported by a fellowship from Ministère de la Recherche, France.

INTRODUCTION

Macrophages play a central role in both immunity and tissue homeostasis, protecting the organism from infection as well as completing essential tissue-specific functions. Macrophages are key modulator and effector cells in the immune response, their activation influences and responds to other arms of the immune system, coordinating both initiation and resolution of immune response. They are involved in pathogen recognition, antigen processing, inflammation, phagocytic clearance, immune regulation as well as tissue repair (1). Macrophages are elicited by various stimuli, including pathogen pattern recognition, as well as cell and molecular microenvironment such as cytokines, chemokines, growth hormone, nutrients and danger signals (2-5). Macrophages represent a heterogeneous cell population of immune cells, a dynamic spectrum of functional states whose extremes are pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages exhibiting distinct phenotypes with marked signatures of gene expression and effector functions have been defined (6-13).

M1 and M2 macrophages can be discriminated according to cytokine production, functions, and expression of various membrane proteins. M1 pro-inflammatory, or classically activated macrophages, produce high level of IL-12 pro-inflammatory cytokine (IL-12^{hi}) and IFN γ as well as other pro-inflammatory associated cytokines (TNF- α , IL-1 β), chemokines, and proteases, and low level of IL-10 anti-inflammatory cytokine (IL-10^{lo}). Activated M1 macrophages inhibit pathogen proliferation and kill pathogens by stimulating type 1 T helper (Th1) adaptive responses and also by phagocytosis and production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) through induction of the NADPH oxidase system and iNOS, respectively (10-12, 14, 15). Immunoregulatory, anti-inflammatory or alternatively activated M2 macrophages have been divided into several subsets depending on the differentiation/activation signals encountered. M2 are associated with reduced pro-inflammatory cytokine secretion (IL-12^{lo} IL-10^{hi}) (6, 7, 16), and they stimulate the Th2 adaptive response essential for humoral-mediated immunity, immunoregulatory and anti-inflammatory functionalities, pro-fibrotic and repair activities mediated through the production of L-proline and polyamines by arginase-1 and in addition contribute to resistance to parasite infection, and tumour promotion (11, 16). Metabolic status contribute to the control of macrophage activation and acquisition of context-dependent effector activities. Thereby, metabolic switch controlled through intracellular Pi3K and mTOR signaling enable M1 to use glycolytic metabolism triggering production of high levels of inflammatory factors required for rapid eradication of pathogens, whereas M2 utilize oxidative metabolism and fatty acid oxidation supporting secretory capacity, and production of lipid mediators providing energy for tissue repair and

wound healing (17-20). Differential L-arginine metabolism is also an important downstream pathway in myeloid-induced functions. Nitric-oxide synthase (iNOS) and arginase 1 (ARG1) enzymes, alternatively regulated by Th1 and Th2 cytokines, compete for L-arginine as a substrate and the metabolic products, either NO radical or ornithine promoting polyamine synthesis are important moderators of cell function and distinct feature of M1 and M2 macrophages, respectively (9, 15, 21-26). M2 macrophages also expressed specifically chitinase family proteins (such as Ym1 and Ym2 in mice) (27-30). Besides, polarized macrophages express a series of membrane proteins, thereby CD86 co-stimulatory or MHC class II (I-A/I-E) molecules are highly expressed in M1 macrophages, while M2 programme is characterized by upregulation of C-type mannose receptor 1 (CD206) active in antigen processing, endocytosis and phagocytosis of pathogens. Finally, the generation of M1 or M2 activated macrophages results also from intracellular activation of transcription factors (STAT, IRF, NF- κ B). The differential forms of NF- κ B are essential in polarization, indeed NF- κ B p65/p50 heterodimer is a pro-inflammatory factor found in M1 while NF- κ B p50 subunit homodimers has been shown to be essential for M2 polarization *in vitro* and *in vivo* (31, 32).

Iron is a crucial transition metal for living organisms. In mammals, most of the iron is used for erythrocyte production through hemoglobin synthesis. Most erythrocyte iron is recycled from senescent red blood cells by macrophages, while only small amounts of dietary iron is absorbed through enterocytes to enter into blood circulation to compensate for iron losses. Systemic iron balance is maintained through the couple hepcidin hormone and ferroportin cellular iron exporter (33-35). Hepcidin, mainly synthesized from hepatocytes (36) and upregulated during iron overload through Bmp6-Smad1/5/8/4 pathway activation (37, 38) is released in blood circulation and binds to the cellular iron exporter ferroportin, leading to its internalization and degradation (39). Thus, hepcidin systemic signal decreases the transfer of iron to the body from enterocytes and iron recycling from macrophages. The expression of *hepcidin* and *ferroportin* genes is altered upon inflammation. *Hepcidin* expression is upregulated from the liver and macrophages through activin b-Smad1/5/8/4 and IL-6-Stat3 pathways (40, 41), while *ferroportin* transcription is downregulated, both independent regulation leading to hypoferremia (42-46). The regulation of *hepcidin* and *ferroportin* expression in macrophages is correlated to cell polarization. Indeed, *hepcidin* upregulation is related to M1 polarization while *ferroportin* downregulation correlates with M2 subtype polarization (47).

Macrophages play a central role in the immune inflammatory mechanisms and in the priming of adaptive host responses to intracellular and extracellular pathogens, and exhibit considerable heterogeneity and plasticity. Here, we addressed the influence of iron on immune markers expression and macrophages polarization *in vivo* and *in vitro*, and its impact during LPS-induced inflammation. We showed that iron-rich status promote M2-like phenotype and reduce type 1 immune response markers, impairs LPS-induced pro-inflammatory markers and cytokines expression, and to differential regulation of *hepcidin* and *ferroportin* mRNA expression upon inflammation.

MATERIALS AND METHODS

***In vivo* experiments**

Six to seven-week old C57BL/6 wild-type mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed in the Transgenose Institute animal facility (CNRS UPS44, Orleans) and were fed with either iron-rich diet (25000 mg of iron carbonyl/kg) for three days, iron-deficient diet (less than 20 mg iron carbonyl/kg) for two weeks, or iron-replete diet (280 mg iron carbonyl/kg) as control diet (R03 from Scientific Animal Food & Engineering; Augy, France). Acute inflammation was induced by a single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS *E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 50 µg/kg). Injection with an equivalent volume of sterile saline solution (0.9% NaCl) was used as vehicle control. Mice were sacrificed 4 hours after LPS injection (see supplementary figure). Liver and peritoneal exudate cells isolated by NaCl wash were sampled. The experimental protocol were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans accordingly to the French government's animal experiment regulations.

BMDM cell culture and stimulation

Murine bone marrow cells were isolated from femurs and differentiated into macrophages after culturing at 10^6 cells/ml for 7 days in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with (10 mM glutamine, 25 mM Hepes, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (all from Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA), plus 20% horse serum (HyClone Laboratories, Utah, USA) and 30% L929 cell-conditioned medium as a source of M-CSF (48). Three days after washing and re-culturing in fresh medium, the cell preparation contained a homogenous population of macrophages. When indicated cells were treated with 100 ng/mL LPS (Lipopolysaccharide *E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich), ferric ammonium citrate (FAC, 10, 50 or 100 µM, Sigma-Aldrich). For cytokine treatments, the cells were cultured with IFN- γ (100 U/mL) or IL-4 (10 ng/mL, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA) as indicated.

Labile cell iron and reactive oxygen species measurement

Bone marrow-derived macrophages plated in 96-well microplate (OptiPlate, PerkinElmer-Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) were incubated 5 min with 5 µM of calcein acetoxymethyl (calcein-AM, Life Technologies-Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) or 30 min with 5 µM of fluorogenic probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Life Technologies) for labile cell iron and intracellular ROS measurement, respectively. After wash, cells were further treated with ferric ammonium citrate (FAC, Sigma-

Aldrich) as indicated and fluorescence intensity was measured using fluorescent plate reader (Clariostar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

NF- κ B staining by immunofluorescence analysis

Bone marrow derived macrophages (BMDM) were plated in 12-well microculture plates containing round slides (0.5×10^6 cells/well) and then treated with or without FAC (Sigma-Aldrich) overnight followed by LPS (Sigma-Aldrich) treatment for 30 minutes. BMDM were then washed by PBS and fixed by paraformaldehyde 4% (Sigma Aldrich) for 10 minutes followed by a blotting with TBS containing 10% FCS (HyClone), 1% BSA (Eurobio, Courtaboeuf, France) and 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 45 minutes. Thereafter, slides were removed from the microplate, and treated with the anti-NF- κ B p65 antibody (R&D systems Inc) overnight. Subsequently, cells were washed with TBS and treated with the appropriate secondary antibody for 2 hours. Cells were then treated with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI, Sigma Aldrich) for 1 min washed and pictures were acquired using Axio OBSERVER Z1 microscope plan-Apochromat 63x/1,40 Oil (Carl ZEISS, Oberkochen, Germany).

Cytokine determination in cell culture medium

After stimulation, cell supernatants were harvested for cytokine IL-12p40, IL-1 β , IL-6 and TNF- α measurements using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (DuoSet, R&D).

Nitric oxide production

The production of nitric oxide (NO) was measured in culture supernatants by the Griess assay (49). Fifty microliters of culture supernatants was mixed with 25 μ L of Griess 1 (1% sulfanilamide in 2.5% phosphoric acid) and 25 μ L of Griess 2 reagent (0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid) and incubated for 30 min. All the chemicals were from Sigma-Aldrich. Absorbance was measured at 562 nm. A standard curve of NaNO₂ was used to establish the NO₂ concentration in the samples.

Flow cytometry analysis

Macrophages were plated in Petri dish at 5×10^6 cells per dish. Cells were then stimulated with FAC, IFN- γ or IL-4 as indicated. were washed and stained with 7- Aminoactinomycin D (7-AAD), anti-CD86 PE (BD Cells Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-IA/IE APC (BD

Pharmingen), anti-CD206 (Bio Legend, San Diego, CA, USA), or anti-F4/80 (eBioscience, San Diego, CA, USA). Then cells were detached with cold PBS and analyzed by flow cytometry.

Quantitative PCR analysis

Total RNA from tissue samples or cells was isolated using TRI Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription of 1 µg of total RNA was performed with Promega synthesis system (Promega, Madison, WI, USA) in a total volume of 20 µL. The mRNA levels of selected genes were measured using QuantiTect SYBR Green PCR system (Qiagen, Hilden, Germany) and Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All primers used in qRT-PCR for analysis were listed in table 1 (supplementary data table 1). The mRNA levels were normalized to the housekeeping gene *Gapdh* in the same RT sample and relative transcript expression of genes was given as $\Delta C_t = C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ reference}}$. Fold change of genes expression compared with untreated mice was determined as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ treated}} - \Delta C_{t \text{ control}}$).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM), as indicated in the figure legends. Statistical evaluation of differences between the experimental groups were performed with GraphPrism software (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The parametric one-way ANOVA test with multiple comparison post hoc Bonferroni's test for pairwise comparisons was used to compare more than 2 groups and the Student's t-test was used to compare two groups. Significant levels were indicated as *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

Results

Host iron status controls M2 marker expression in liver and peritoneal macrophages

Adult C57BL/6 mice received specific iron diet to induce dietary iron loading or dietary iron deficiency. Then liver gene expression of *hepcidin* anti-microbial peptide (*Hamp1*) and bone morphogenic protein (*Bmp6*) the key iron-inducer of *Hamp1* transcription, was assessed to confirm the change of iron metabolism parameters induced by the specific diets. As shown in Figure 1 A, *Hamp1* and *Bmp6* mRNA expression in liver was increased with iron-rich diet and decreased with iron-deficient diet confirming the hallmark of iron status. We next determined whether the modification of liver iron level was correlated with markers of immune response. Interestingly, in liver the expression of type 2 immune response markers *Arginase 1* (*Arg1*) and *Chitinase-like 3* (*Ym1*) was increased with high iron status correlating with a trend of increase expression of *IL-10* anti-inflammatory cytokine (**Figure 1B**), yet *iNos* expression did not change significantly with iron load conditions in liver (data not shown). Conversely, low iron status reduced the expression of *Arg1* in liver. Further, we assessed the impact of iron status in macrophages in the peritoneum compartment. Peritoneal macrophages were isolated from mice receiving iron-rich or iron-deficient diet. *Hamp1* and *Bmp6* gene expression were not altered in peritoneal fluid cells (data not shown) in response to iron treatments. However, gene expression of *Arg1*, *Ym1*, *Stat6* and *IL-10*, a series of genes expressed in M2 polarized macrophages, was increased with high iron condition, while the expression of *Arg1* and *IL-10* was significantly decreased with iron deficiency status (**Figure 1 C**). Overall, these results showed that elevated iron level correlates with gene expression of type 2 immune response markers conversely with iron deficiency.

Iron deficiency disrupts IL-12/IL-10 axis balance during endotoxin LPS-induced inflammation in peritoneal macrophages

Our results indicated that iron diet-induced body iron status impacted directly the expression of markers correlating to immune polarization. Next, we hypothesized that changes of iron status could alter the inflammation process in macrophages. We thus assessed the lipopolysaccharide (LPS)-induced pro-inflammatory response in peritoneal macrophages. Adult C57BL/6 mice fed with high or low iron diet were treated with sublethal concentration of LPS (50 µg/kg) or vehicle and after 4 hours cytokine gene expression was determined in peritoneal cells. In mice fed with high or low iron diet, we did not observed any significant difference in terms of the expression of *Il-12*, *Il-10* and *Il-1β* gene expression while the expression of *IL-12*, *IL-10* and *IL-1β* was increased in response to LPS treatment (**Figure 2**). Remarkably iron deficiency promoted *IL-*

IL-12 gene expression and decreased *IL-10* gene expression in response to LPS. Further we observed *IL-1 β* was significantly reduced in mice with high iron status. Thus, iron status modulates immune response, dietary iron deficiency exacerbated pro-inflammatory effects of endotoxin whereas dietary iron loading induced anti-inflammatory effects.

Macrophages iron loading impairs IFN- γ -induced M1 polarization

To assess the influence of cell iron loading on macrophage polarization we aimed to determine the profile of macrophages in response to cell iron loading by using BMDM incubated with ferric ammonium citrate. First we verify that cell viability in response to iron loading showed that iron concentration used in this study did not induce cell death (**Figure 3A**). Then we confirmed that increasing the concentration of ferric ammonium citrate in culture medium correlated with the increase of intracellular iron using calcein fluorescence method (**Figure 3B**). Further, the increase of intracellular reactive oxygen species was determined using the general oxidative stress indicator 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA). The increased in intracellular iron was correlated with the increase of reactive oxygen species which was significantly induced after 16 hours of incubation with ferric ammonium citrate (**Figure 3B**). Thereafter, we determined macrophage polarization based on CD86 co-stimulatory and I-A/I-E MHC class II molecules as well as CD206 mannose receptor as cell surface membrane proteins highly expressed on M1 and M2 polarized macrophages, respectively. Interestingly, after 24 hours of incubation with ferric ammonium citrate macrophages were associated with the decrease of CD86 and I-A/I-E positive cells as visualized by the F4/80 percentage (**Figure 3C**), suggesting that cell iron loading decreased the basal constitutive expression of these molecules. The expression of CD206 remained unchanged in response to iron loading. Remarkably, the IFN- γ -induced CD86 and I-A/I-E expression was impaired with the pretreatment of BMDM with ferric ammonium citrate and impairment extent correlated with iron concentration. Besides, the decrease of CD86 and I-A/I-E expression induced by iron loading was accentuated with IL-4 incubation, while no additional effect of ferric ammonium citrate was observed in terms of CD206 expression in response to IL-4 (**Figure 3C**). Thus, cell iron loading affects the expression membrane molecules associated with macrophage polarization, higher iron level reducing M1 marker expression.

Alteration of endotoxin LPS-induced pro-inflammatory response with cell iron overload

To confirm the anti-inflammatory role of cell iron loading, we assessed the functional consequences of iron cell loading on the immune response by analyzing the impact of cell iron loading on LPS-induced inflammation response in BMDM. Macrophages were treated with ferric ammonium citrate overnight followed by TLR4 stimulation with lipopolysaccharide (LPS) during 4 h for gene expression and 24 h for secretion of mediators analysis. The mRNA expression of *IL-12b*, *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α* genes (**Figure 4A**) was drastically reduced in BMDM after ferric ammonium citrate treatment correlated with reduction in their respective pro-inflammatory cytokines IL-12p40, IL-1β, IL-6 and TNF-α secretion into medium (**Figure 4B**). In addition, the expression of *iNos*, a marker of M1 macrophage and its chemical product of reaction NO (nitric oxide) was increased in response to LPS treatment in BMDM. Interestingly as observed with the pro-inflammatory cytokines, iron loading impaired *iNos* expression and NO production (**Figure 4A, B**).

Early activation of TLR4 pathway leads to M1 polarization of macrophage characterized inter alia by the activation of NF-κB p65/p50 heterodimer leading to the expression of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide production. To assess the role of NF-κB p65/p50 in the modulation of the immune response by iron loading we evaluated the activation NF-κB p65. Macrophages were treated with ferric ammonium citrate overnight followed by TLR4 stimulation with lipopolysaccharide (LPS) during 30 min for NF-κB p65 nuclear translocation. As shown in **Figure 4C**, neither medium nor ferric ammonium citrate incubation allowed NF-κB p65 nuclear translocation, whereas LPS treatment on macrophages lead to translocation of NF-κB p65. Interestingly, pretreatment of macrophages with 100 μM of ferric ammonium citrate drastically impaired the LPS-induced nuclear translocation of the NF-κB p65. Thus, cell iron loading drastically reduced NF-κB p65 nuclear translocation, *iNOS* and pro-inflammatory cytokine expression in macrophages.

Intracellular iron differentially modulates *hepcidin* and *ferroportin* expression in response to LPS in macrophages.

Iron-loaded macrophages impairs pro-inflammatory gene expression associated with a decrease of the expression of CD86 and I-A/I-E cell surface molecules associated with M1 polarization. We previously highlighted that in response to TLR stimulation *hepcidin* upregulation was associated with M1 polarized macrophages, and conversely *ferroportin* downregulation to M2 (47). Thus, we next analyzed how iron cell loading might influence the expression of *hepcidin*

and *ferroportin* in macrophages. As shown in **Figure 5**, a dose-dependent intracellular iron loading decreased the LPS-induced *hepcidin* mRNA expression in macrophages while iron treatment alone had no effect. The *ferroportin* expression was increased in response to iron, and strongly downregulated after LPS exposure in macrophages. Interestingly, the LPS-induced downregulation of *ferroportin* mRNA in macrophages was completely abrogated by ferric ammonium pretreatment (**Figure 5**).

Discussion

Immune response is modulated through various mechanisms including cell stimulation and differentiation, microenvironment, nutrients and cell metabolism. Iron is a crucial nutrient in cell and iron metabolism in macrophages play essential role in iron homeostasis. Macrophages which exhibit distinct phenotypes play central role in regulating immune response, we thus investigated the role of iron on macrophage polarization and immune functions. Our data show that high iron level influences monocyte polarization towards a M2-like phenotype and influence immune response, while the iron deficiency had the opposite effect. *In vivo* iron-rich diet stimulates expression of M2-associated markers and cytokines, and repress type 1 immune response to TLR4 stimulation. On the other hand, iron deficiency promotes pro-inflammatory cytokine expression in response to TLR4 stimulation. *In vitro*, iron-loaded macrophages represses the expression of M1-associated markers while promoting M2-associated markers, and decreases NF- κ B p65 nuclear translocation and pro-inflammatory cytokines in response to TLR4 stimulation. Therefore changes in cell iron concentration can modulate macrophage phenotype and function with clear implications in immune response.

Metabolic adaptation is a key component of macrophage plasticity and polarization, instrumental to their function in homeostasis, immunity, and inflammation. Here, we evidenced that cell iron status may influence macrophage metabolic programs. Specifically, our results showed that higher gene expression of arginase-1 enzyme in mice liver and macrophages was strongly correlated with iron-rich diet. Interestingly, further *in vitro* investigations showed that intracellular iron impaired LPS-induced *iNos* and NO secretion by macrophages, suggesting that intracellular iron changes disrupted the L-Arginine metabolism. In mammalian cells, the amino-acid L-Arginine is a precursor for the synthesis of several compounds participating in vital processes, among them immunity. In macrophages L-Arginine can be catabolized by two major enzymes nitric oxide synthase and arginase, *iNos* and *Arg1*, alternatively activated in M1 and M2 polarized macrophage (22, 23). These two enzymes produce NO messenger molecule exhibiting bactericidal and tumoricidal activities and L-ornithine a precursor of polyamines which are involved in growth and differentiation, respectively (50-52). Several other markers of polarized immune functions are also altered by iron status. Thereby, the level of *Ym1* chitinase-like proteins expression is also increased with the iron loading status suggesting that iron loading could affect the L-Arginine and chitin-induced enzyme activities. In addition, in macrophages iron overload was correlated with a decrease of M1 membrane molecule markers CD86 and I-A/I-E expression. Our data are consistent with previous results reporting that M2 polarized macrophages treated by iron chelator deferoxamine decreases the expression of CD86

and I-A/I-E (53). We also noticed an increase in gene expression of *IL-10* anti-inflammatory cytokine in mice with iron-rich diet. Therefore, overall iron status impacts on gene expression of markers of polarized macrophages even without inflammatory stimulation.

Changes in cell iron status interfere with the inflammation process by impairing LPS-induced pro-inflammatory response. Above all, by using acute LPS-induced inflammation *in vivo* and *in vitro* we noticed that IL-12/IL-10 ratio was significantly increased in response to LPS under iron deficiency suggesting a pro-inflammatory role of iron deficiency in macrophages, and conversely with iron rich status. Further, in cultured macrophages the impairment of LPS-induced pro-inflammatory response with iron overload was associated with a drastically decrease in the expression and secretion of IL-1 β , IL-6, and TNF- α pro-inflammatory cytokines. Interestingly, we showed that NF- κ B p65 translocation into the nucleus was strongly reduced in iron loaded macrophages that thus could result in the reduced pro-inflammatory cytokine expression. NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor, and ROS are clearly implicated in its activation (54-56). It has been also shown that NF- κ B binding and activity was increase in isolated Kupffer cells treated with ferrous sulfate and suppressed with iron chelator (57).

The p65/p50 heterodimer form of NF- κ B is a pro-inflammatory transcription factor known to be involved in the M1 profile, conversely to the homodimer p50/p50 form involved in the M2 profile (31). In our experimental conditions of non-polarized macrophages treated with iron, we observed an increase in ROS production together with a decrease in NF- κ B nuclear translocation. Thus the decrease in NF- κ B p65 nuclear translocation in iron loaded macrophages may be a consequence of the decrease in M1 polarization and could result in the change in the expression of pro-inflammatory genes.

The presented data illustrate how modifications in iron metabolism could alter cell metabolism, leading to a rupture of macrophage phenotype balance and leading to an alteration of the inflammatory response. We recently showed that *hepcidin* and *ferroportin* expression was correlated with LPS-induced inflammation and that this correlated with M1/M2 balance (47). Here, we found that the LPS-induced *hepcidin* expression was decreased in iron loaded macrophages and this reduction was correlated with the loss of M1 pro-inflammatory phenotype. This result corroborates with the observation that iron deprivation exacerbates the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 in liver, spleen macrophages and serum in LPS treated mice (58). However, controversial roles of iron status modulating innate immune responses during inflammation context had been described. Thereby in a mice

model of T-cell dependent acute liver inflammation induced by lectin concanavalin A, iron deficiency dampens inflammatory liver changes associated with a marked decrease in T cell and NKT cell activation (59). Thus iron deficiency results in attenuated immune-mediated hepatitis following concanavalin A injection. Likewise, in a model of *M. bovis* BCG infected mice fed with a moderate iron-rich diet we recently showed reduced inflammation and growth of *M. bovis* BCG via enhanced ROS production and immune T cell activation (submitted). M1/M2 balance play a critical role in inflammation to trigger the defense response and in the resolution of inflammation. Therefore, the mechanisms by which M2 markers are decreased by iron loading remains to be further investigated, the role of iron status in the modulation of immune response potential consequences in inflammation and infection outcome should be thoroughly studied.

Authorship contributions

RA contributed to the investigations, data analysis and interpretation, drafting the original manuscript, CM contributed to the investigations, data analysis and interpretation and wrote manuscript, RA, and CM designed the study, VQ reviewed and provided comments on this manuscript, and approved the final version.

References

1. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):21-35.
2. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011 Oct 12;366(1579):2748-55.
3. Yin Q, Fu TM, Li J, Wu H. Structural biology of innate immunity. *Annual review of immunology*. 2015;33:393-416.
4. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Kothe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerdts S. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):473-86.
5. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in immunology*. 2014;5:614.
6. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2527-34.
7. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2053-8.
8. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166-73.
9. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6:13.
10. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002 Nov;23(11):549-55.
11. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Mar;122(3):787-95.
12. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov;11(11):750-61.
13. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*. 2014 Jan 07;2(1):1.
14. Okamoto T, Gohil K, Finkelstein EI, Bove P, Akaike T, van der Vliet A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004 Jan;286(1):L198-209.
15. Zeidler PC, Millecchia LM, Castranova V. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced pulmonary inflammation. *Toxicology and applied pharmacology*. 2004 Feb 15;195(1):45-54.
16. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Journal of leukocyte biology*. 2002 Jul;72(1):101-6.
17. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nature communications*. 2013;4:2834.
18. Covarrubias AJ, Aksoylar HI, Horng T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Seminars in immunology*. 2015 Aug;27(4):286-96.
19. Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends in immunology*. 2003 Jul;24(7):358-63.
20. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism*. 2012 Apr 4;15(4):432-7.
21. Okamoto M, Sato M. Toll-like receptor signaling in anti-cancer immunity. *J Med Invest*. 2003 Feb;50(1-2):9-24.
22. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):641-54.
23. Nieves C, Jr., Langkamp-Henken B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2002 Dec;56(10):471-82.

24. Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology*. 2015;6:212.
25. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 14;11(11):723-37.
26. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145342.
27. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, He CH, Takyar S, Elias JA. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual review of physiology*. 2011;73:479-501.
28. Chang NC, Hung SI, Hwa KY, Kato I, Chen JE, Liu CH, Chang AC. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May 18;276(20):17497-506.
29. Webb DC, McKenzie AN, Foster PS. Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Nov 9;276(45):41969-76.
30. Welch JS, Escoubet-Lozach L, Sykes DB, Liddiard K, Greaves DR, Glass CK. TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Nov 8;277(45):42821-9.
31. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, Ulevitch RJ. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Nov 1;102(9):1645-52.
32. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Seminars in immunology*. 2015 Aug;27(4):237-48.
33. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jun 30;275(26):19906-12.
34. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):776-81.
35. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular cell*. 2000 Feb;5(2):299-309.
36. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Mar 16;276(11):7811-9.
37. Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature genetics*. 2009 Apr;41(4):482-7.
38. Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaultont S, Mosser J, Coppin H, Roth MP. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1503-9.
39. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090-3.
40. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation*. 2004 May;113(9):1271-6.
41. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth MP, Coppin H. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood*. 2012 Jul 12;120(2):431-9.
42. Motley ST, Morrow BJ, Liu X, Dodge IL, Vitiello A, Ward CK, Shaw KJ. Simultaneous analysis of host and pathogen interactions during an in vivo infection reveals local induction of host

- acute phase response proteins, a novel bacterial stress response, and evidence of a host-imposed metal ion limited environment. *Cellular microbiology*. 2004 Sep;6(9):849-65.
43. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3727-32.
 44. Liu XB, Nguyen NB, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood cells, molecules & diseases*. 2005 Jul-Aug;35(1):47-56.
 45. Nguyen NB, Callaghan KD, Ghio AJ, Haile DJ, Yang F. Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006 Sep;291(3):L417-25.
 46. Guida C, Altamura S, Klein FA, Galy B, Boutros M, Ulmer AJ, Hentze MW, Muckenthaler MU. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood*. 2015 Apr 2;125(14):2265-75.
 47. Agoro R, Mura C. Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 2016;61:16 - 25.
 48. Muller M, Eugster HP, Le Hir M, Shakhov A, Di Padova F, Maurer C, Quesniaux VF, Ryffel B. Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. *Mol Med*. 1996;2(2):247-55.
 49. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB, Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods in enzymology*. 1996;268:142-51.
 50. Fozard JR, Part ML, Prakash NJ, Grove J, Schechter PJ, Sjoerdsma A, Koch-Weser J. L-Ornithine decarboxylase:an essential role in early mammalian embryogenesis. *Science*. 1980 May 2;208(4443):505-8.
 51. Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer research*. 1988 Feb 15;48(4):759-74.
 52. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annual review of biochemistry*. 1984;53:749-90.
 53. Corna G, Campana L, Pignatti E, Castiglioni A, Tagliafico E, Bosurgi L, Campanella A, Brunelli S, Manfredi AA, Apostoli P, Silvestri L, Camaschella C, Rovere-Querini P. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*. 2010 Nov;95(11):1814-22.
 54. Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Nov 22;91(24):11527-31.
 55. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*. 1991 Aug;10(8):2247-58.
 56. Shi X, Dong Z, Huang C, Ma W, Liu K, Ye J, Chen F, Leonard SS, Ding M, Castranova V, Vallyathan V. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Mol Cell Biochem*. 1999 Apr;194(1-2):63-70.
 57. She H, Xiong S, Lin M, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H. Iron activates NF-kappaB in Kupffer cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002 Sep;283(3):G719-26.
 58. Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, Silvestri L. Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*. 2011 Jul 21;118(3):736-46.
 59. Bonaccorsi-Riani E, Danger R, Lozano JJ, Martinez-Picola M, Kodela E, Mas-Malavila R, Bruguera M, Collins HL, Hider RC, Martinez-Llordella M, Sanchez-Fueyo A. Iron Deficiency Impairs Intra-Hepatic Lymphocyte Mediated Immune Response. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136106.

Figure 1

Figure 1. Association of iron status and immune response marker expression in liver and peritoneal macrophages.

C57BL/6 mice were fed with iron replete diet (IR), iron-rich diet for 3 days (High) or iron-deficient diet for 14 days (Low). Liver (A, B) and peritoneal macrophages (C) gene expression were then quantified using quantitative PCR analysis. Data are expressed as genes fold change relative to IR mice. Data are representative of two independent experiments (n=3 mice) and presented as mean ± SD (n=6 mice per group). ns, non significant; * p≤ 0.05; ** p≤ 0.01; *** p≤ 0.001.

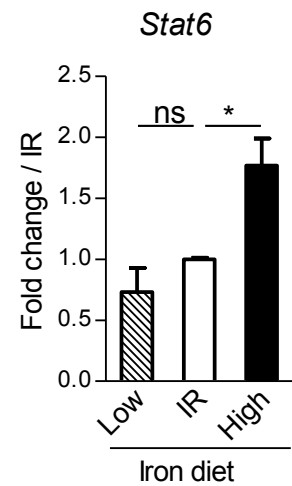
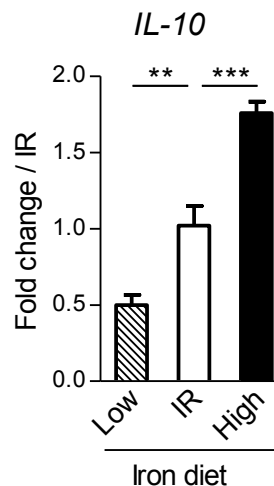
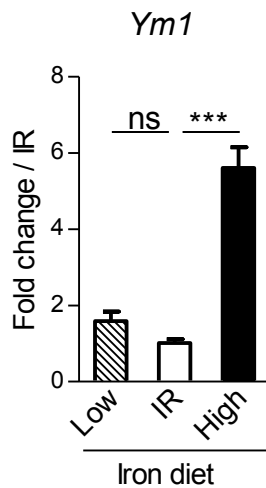
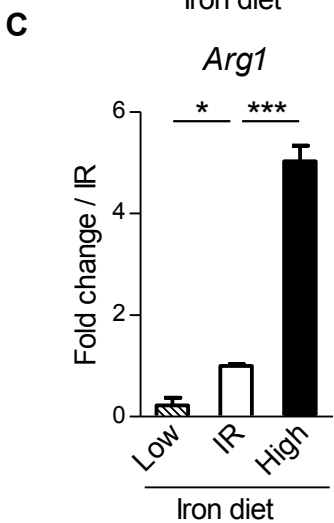
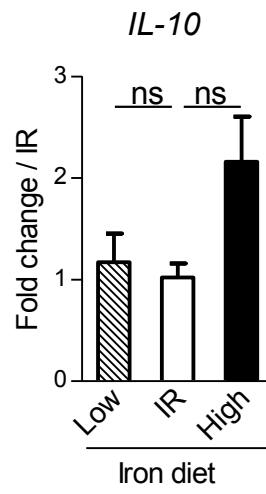
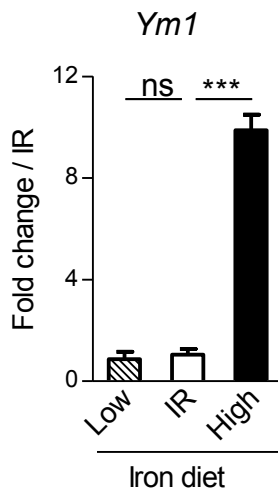
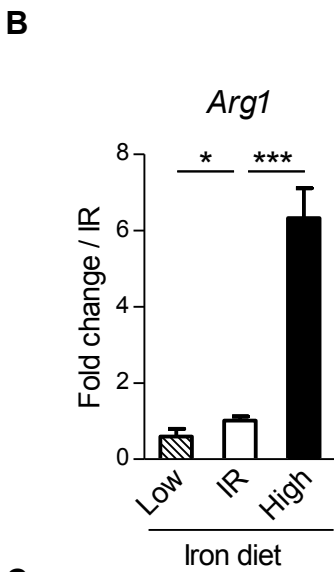
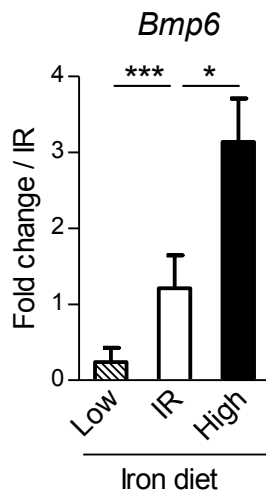
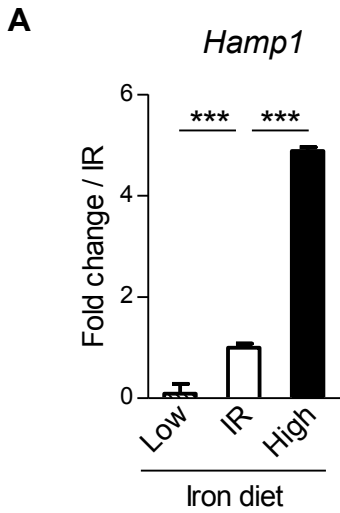


Figure 2

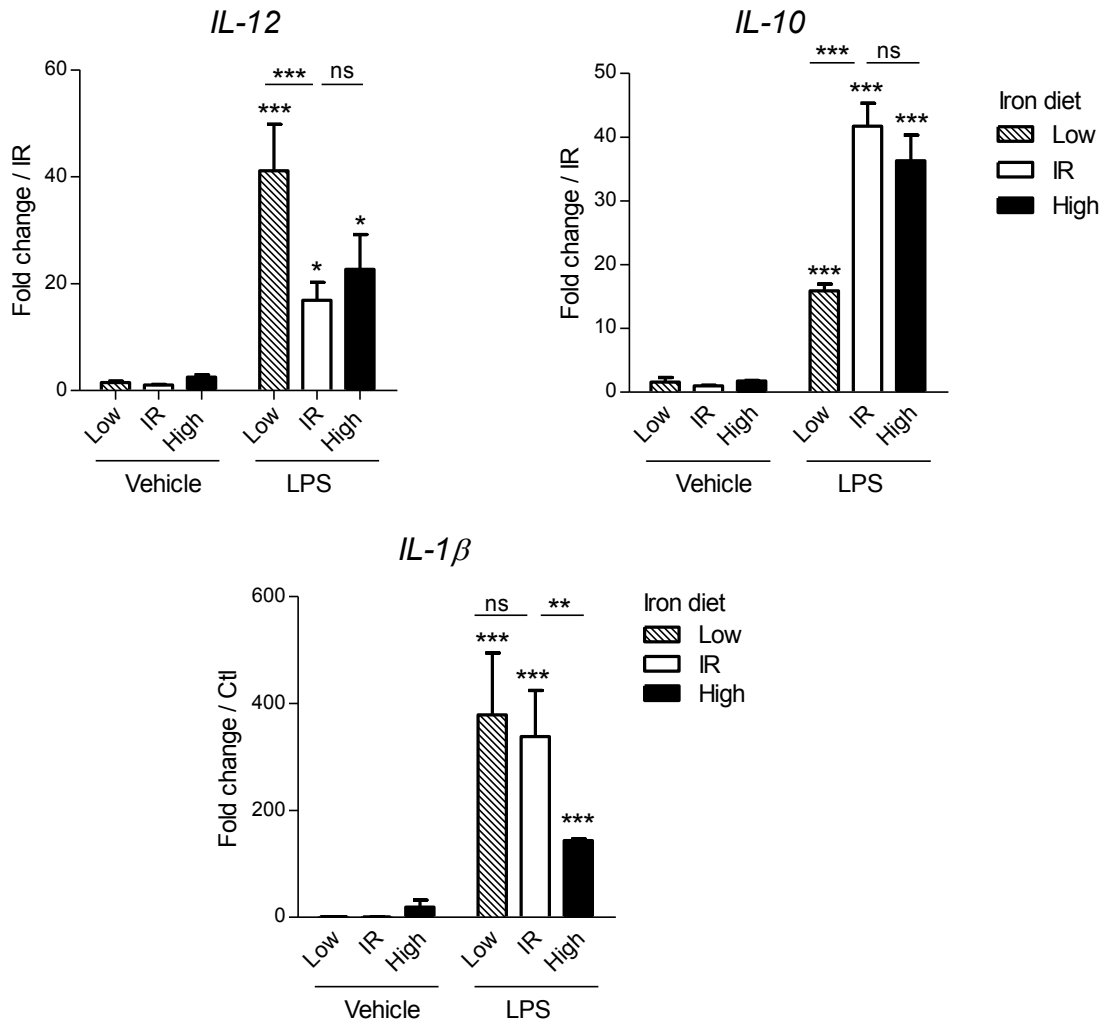


Figure 2. Iron deficiency imbalanced LPS-induced IL-12/IL-10 response *in vivo*.

C57BL/6 mice were fed with iron replete diet (IR), iron-rich diet for 3 days (High) or iron-deficient diet for 14 days (Low). Mice were then treated by LPS (i.p 50 µg/kg) and after 4 h were sacrificed. Peritoneal cells were then collected to assess the *Il-12*, *Il-10* and *Il-1β* gene expression using quantitative PCR. Data are expressed as genes fold change relative to IR mice. Data are representative of two independent experiments (n=3) and presented as mean ± SD (n=6 mice per group). ns, non significant; ** p≤ 0.01; *** p≤ 0.001.

Figure 3

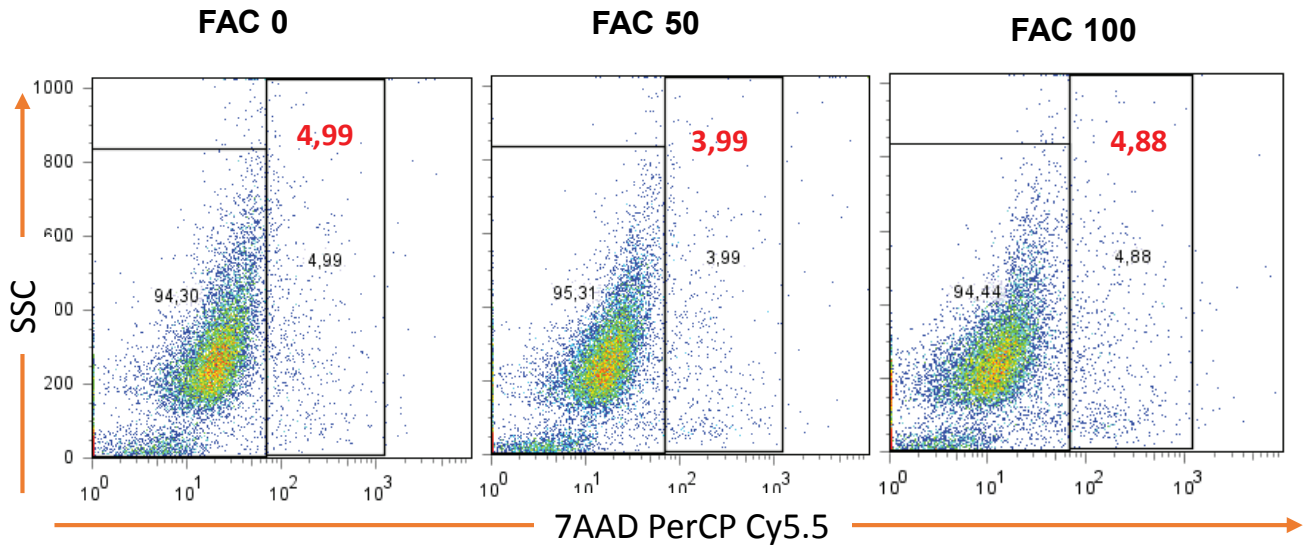
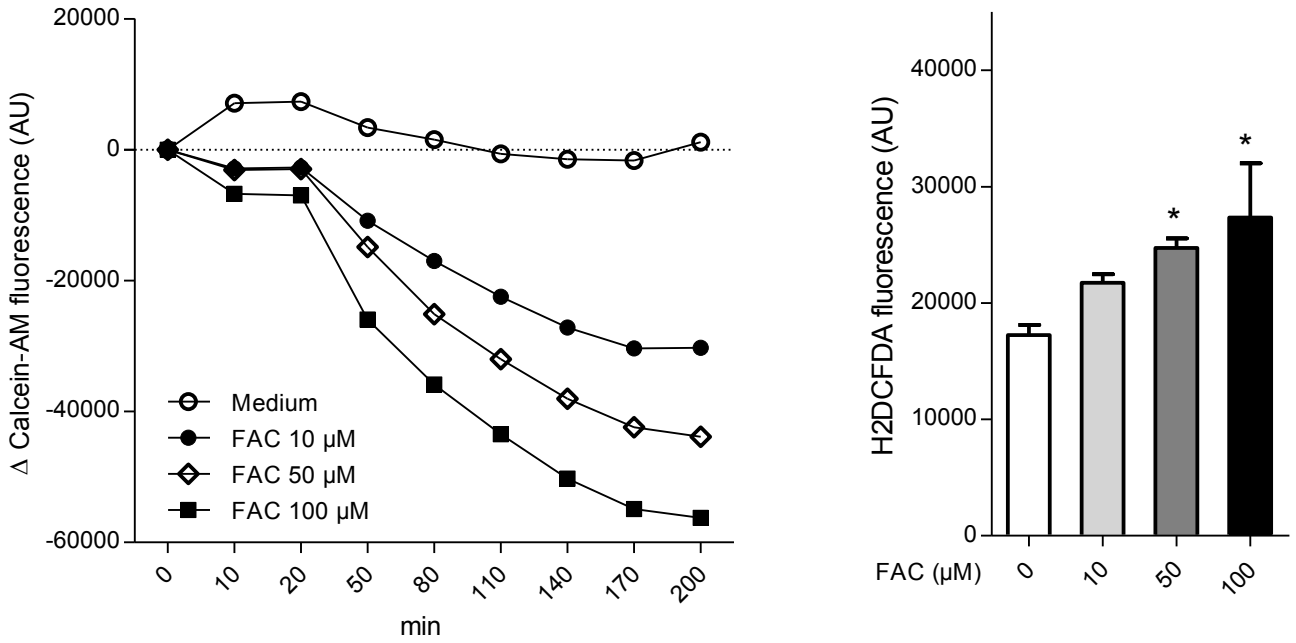


Figure 3. Iron loaded primary macrophages express constitutive M1 cell surface markers *in vitro*.

A: Bone marrow-derived macrophages were treated with FAC (0, 50 or 100 µM) as indicated. Thereafter, cells were stained by 7- Aminoactinomycin D (7-AAD) and analyzed by flow cytometry to measure membrane integrity. **B:** Bone marrow-derived macrophages plated in 96 well microplate overnight were washed with PBS and treated with either calcein-AM (5 µM, 5 min) for labile cell iron measurement or with H2DCFDA (5 µM, 30 min) for intracellular reactive oxygen species (ROS) assessment. Then, cells were treated with ferric ammonium citrate (FAC, 10, 50 or 100 µM). Thereafter fluorescence measurements were performed at different time points to determine the level of labile cell iron or after 16 hours for intracellular ROS. **C:** Bone marrow-derived macrophages were preincubated 2 hours with ferric ammonium citrate (FAC, 50 or 100 µM), then incubated with IL-4 (10 ng/mL) or IFN γ (100 U/mL) overnight. The percentage of CD86⁺, I-A/I-E⁺ and CD206⁺ cells were then assessed gated on F4/80⁺ cells. Data are representative of two independent experiments and presented as mean \pm SD (n=4). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Figure 3

B



C

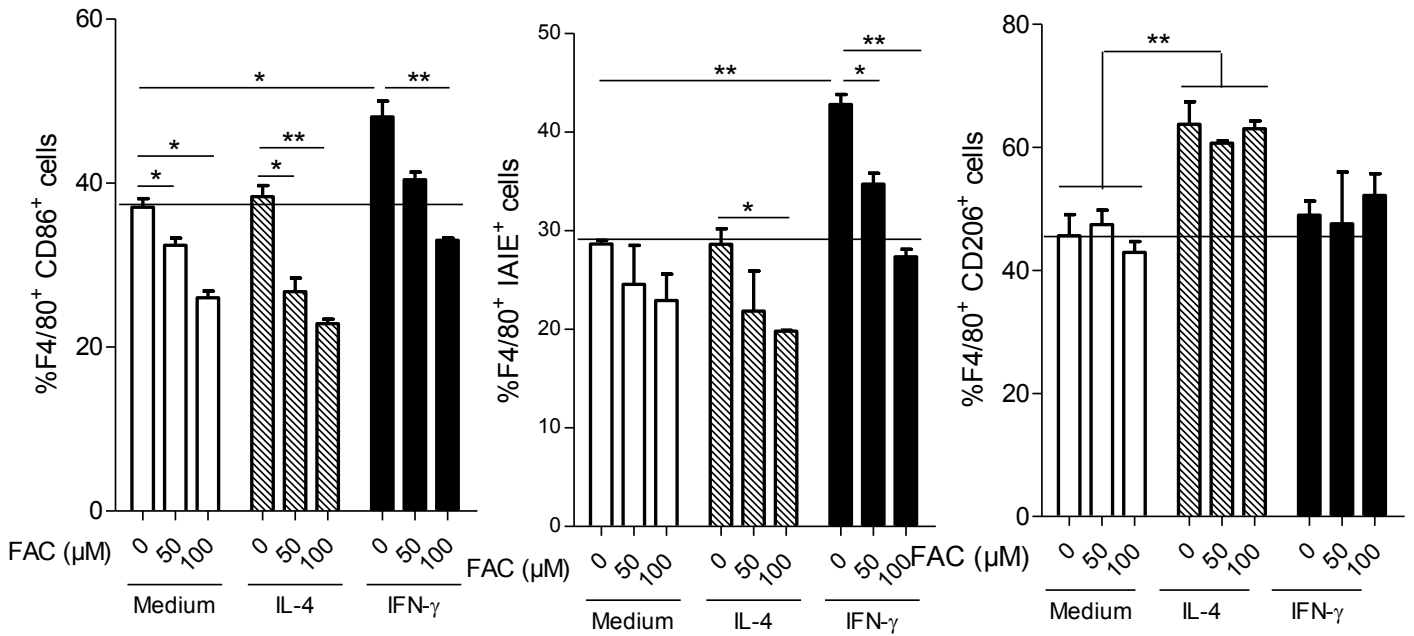


Figure 4

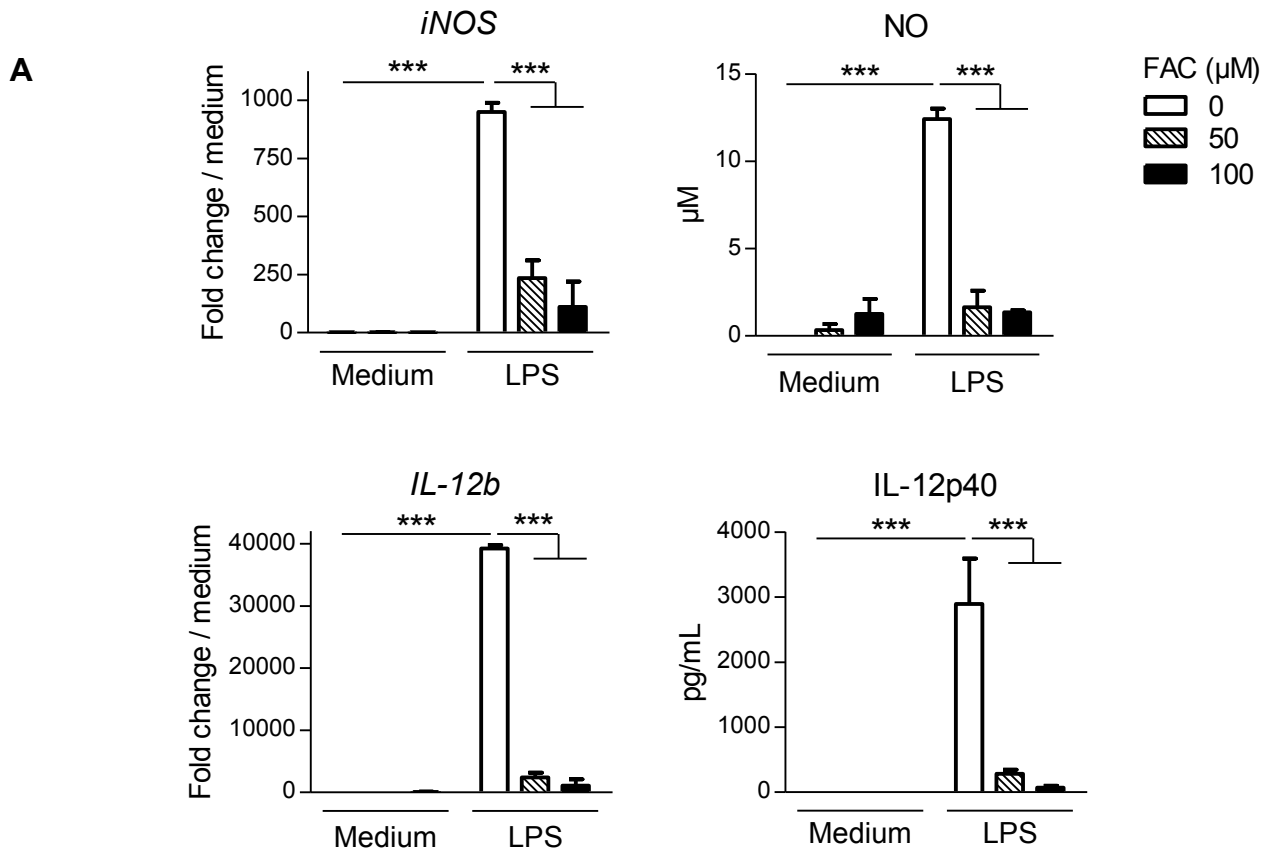


Figure 4. Iron loaded primary macrophages impairs LPS-induced pro-inflammatory response.

Bone marrow derived-macrophage were preincubated with ferric ammonium citrate (FAC, 50 or 100 μM) overnight followed by LPS stimulation (100 ng/mL) for 4 h, 24 h or 30 min to assess *Nos2*, *IL-12b*, *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF α* mRNA gene expression by quantitative PCR analysis (A) or cytokine *IL-12p40*, *IL-1 β* , *IL-6* *TNF α* and nitric oxide measurement in cell medium by ELISA and Griess assay (B), and NF- κB nuclear translocation by immunofluorescence method (C), respectively. Data are representative of at least two independent experiments and presented as mean \pm SD. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Figure 4

B

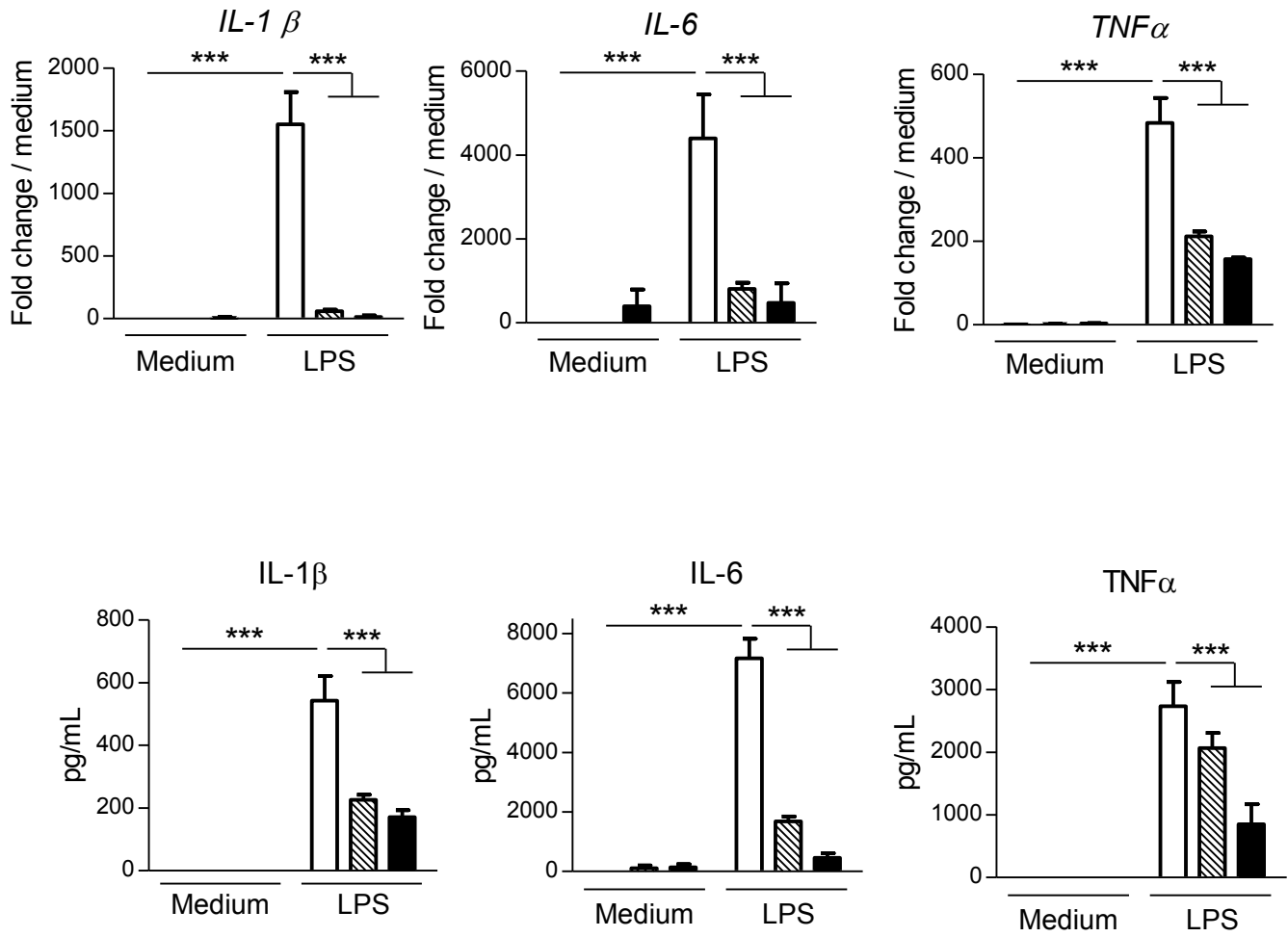


Figure 4

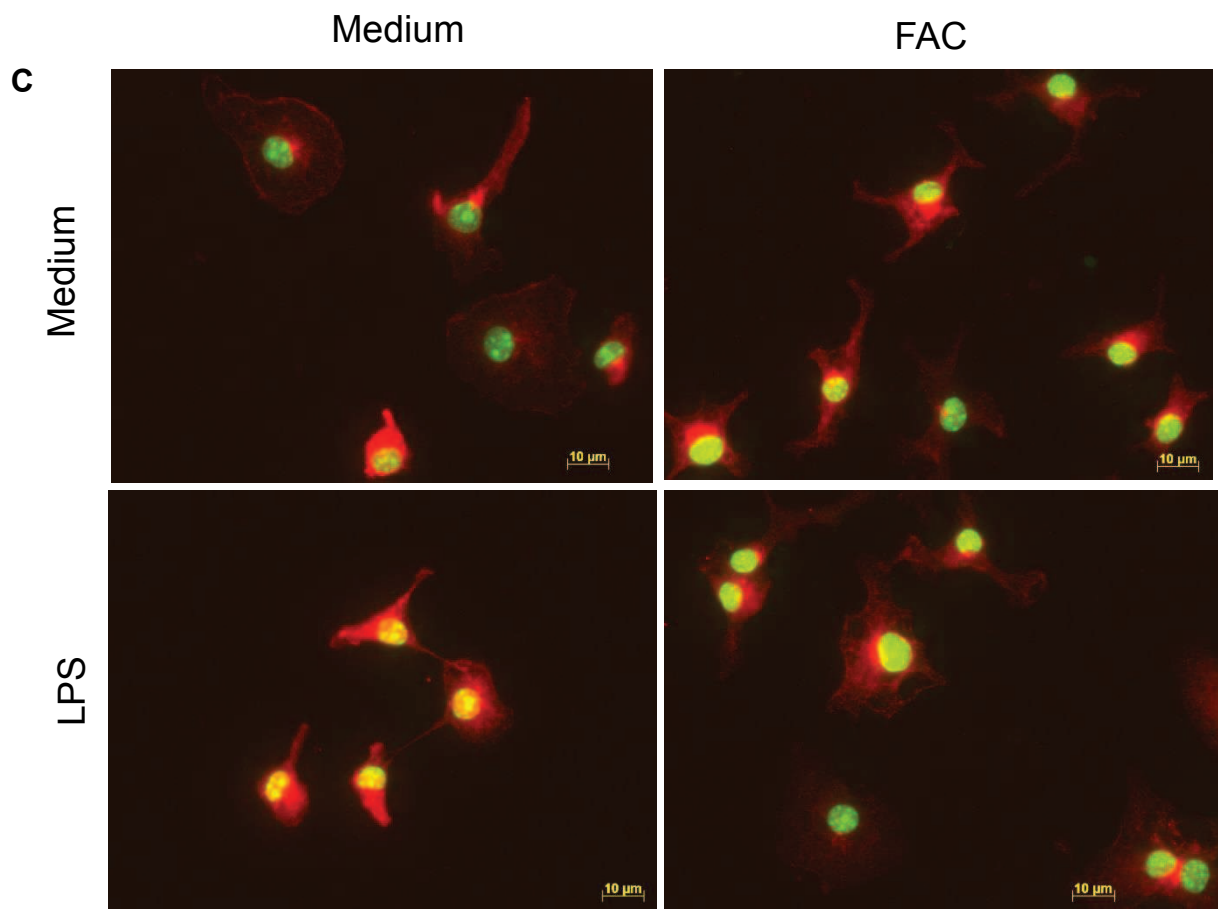


Figure 5

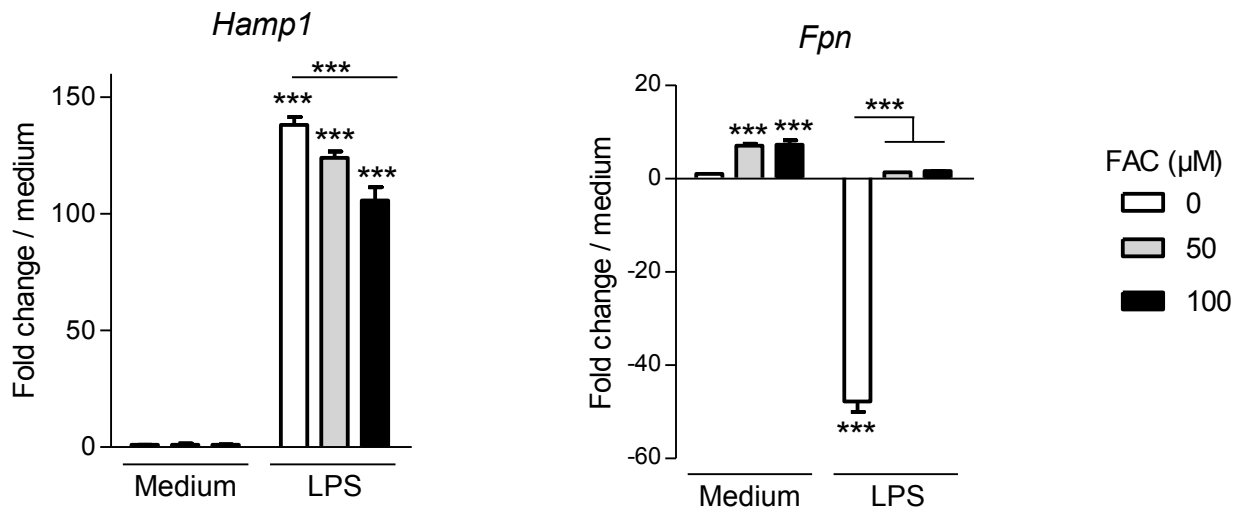
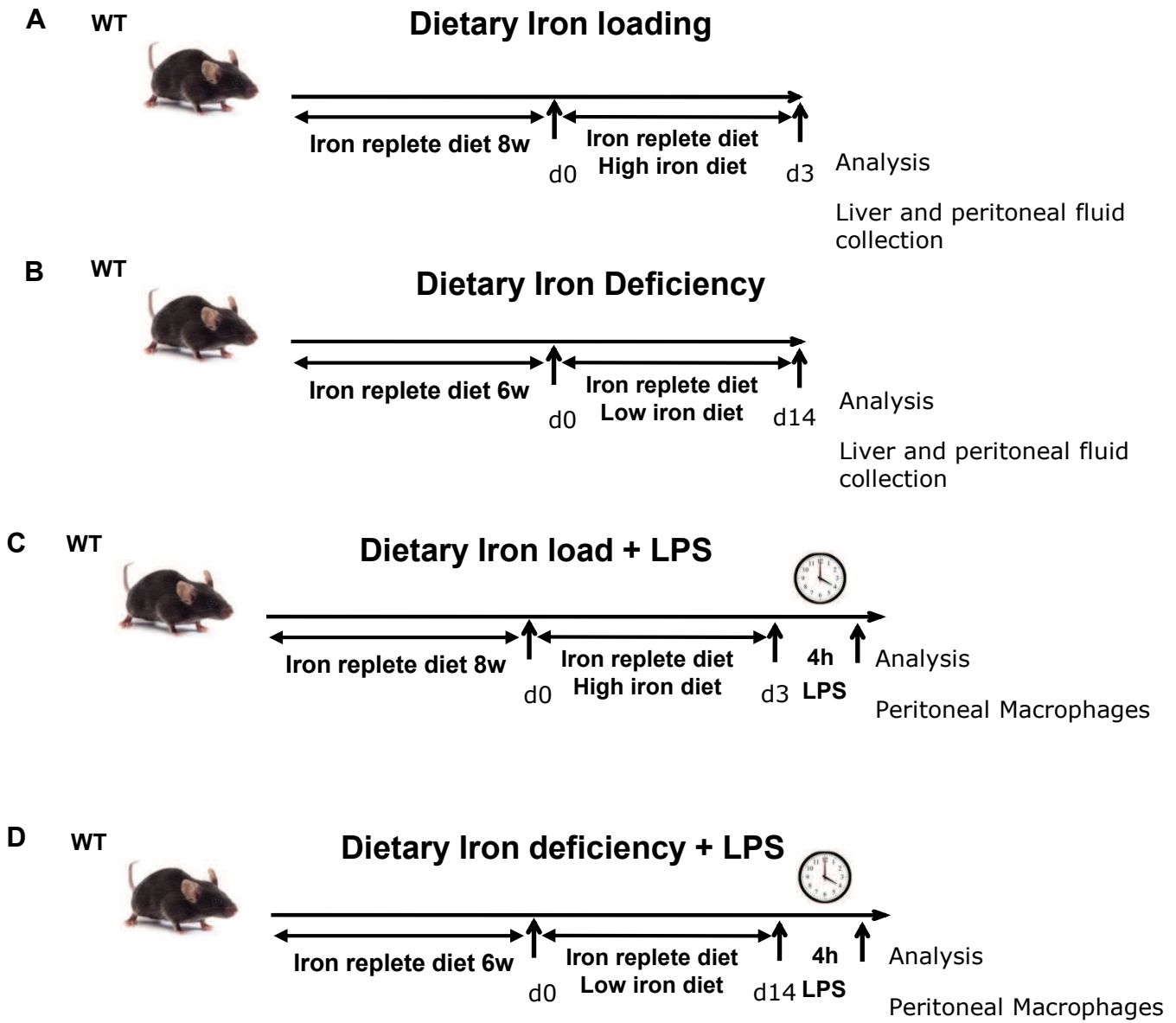


Figure 5. Iron loading modulates LPS-induced *hepcidin* and *ferroportin* expression in BMDM.

Bone marrow derived-macrophage were incubated with ferric ammonium citrate (FAC, 50 or 100 μ M) overnight followed by LPS stimulation (10 ng/mL). *Hepcidin* (*Hamp1*) and *ferroportin* (*Fpn*) mRNA expression were determined after 4 h (*Fpn*) or 12 h (*Hamp1*) using quantitative PCR analysis. Data are normalized to *Gapdh* gene and presented as fold change gene expression relative to the expression in untreated cells. Data are representative of at least three independent experiments and presented as mean \pm SD (n=4). *** $p \leq 0.001$.

Supplementary figure :



Supplementary Table : Reference of primers

Genes	Sequence	Reference
Hepcidin	5'- CCTATCTCCATCAACAGATG -3'	Sigma
	5'- TGCAACAGATACCACACTG -3'	
Ferroportin	5'-CTCTGTCAGCCTGCTGTTG-3'	Sigma
	5'-TCAGGATTTGGGGCCAAGATG -3'	
Inhibin	QT00245259	Qiagen
Stat6	QT01042503	Qiagen
GADPH	QT01658692	Qiagen
IL-1 β	QT01048355	Qiagen
TNF- α	QT00104006	Qiagen
IL-12b	QT00153643	Qiagen
iNOS	QT00100275	Qiagen
IL-10	QT00106169	Qiagen
ym1	QT01549156	Qiagen
Arg1	QT00134288	Qiagen

V.3. Un régime riche en fer atténue la croissance bactérienne durant une infection à *M. bovis* BCG

Article 3: Iron-rich diet decreases mycobacterial burden and correlates with hepcidin upregulation, lower pro-inflammatory mediators and higher T cell recruitment.

Rafiou Agoro, Stéphanie Rose, Raffaella Gozzelino, Irène Garcia, Bernhard Ryffel, Valerie F. J. Quesniaux and Catherine Mura

Soumission à Journal of Infectious Diseases (09/2016)

Le rôle précis du fer dans une infection mycobactérienne reste controversé. Des études ont mis en relation une susceptibilité à une infection mycobactérienne avec une surcharge de fer par voie parentérale ou par modification génétique par l'intermédiaire d'un dysfonctionnement du gène *HFE* (Lounis *et al.*, 2001; Schaible *et al.*, 2002). Le fer comme tout oligo-élément peut avoir des activités variées dépendantes de sa concentration. Le fer n'est pas seulement responsable de la promotion de la croissance bactérienne; en effet une régulation positive de l'hepcidine, décrite comme un peptide antimicrobien à large spectre couvrant le pathogène *Mycobacterium tuberculosis* (Sow *et al.*, 2007) peut également être induite en réponse au fer.

Dans cette partie de la thèse, nous avons étudié l'influence d'un régime modérément riche en fer (2500 mg de fer carbonyle/kg d'aliments) dans un modèle murin d'infection mycobactérienne. L'enrichissement en fer dans l'alimentation choisi n'induit aucun dommage tissulaire et le dépôt de fer au niveau hépatique reste très faible. Le protocole consiste à soumettre les souris à ce régime modérément enrichi en fer pendant 4 semaines dans l'objectif de modifier les paramètres liés au métabolisme du fer préalablement à l'infection par *M. bovis* BCG tout en poursuivant les mêmes régimes alimentaires. Les analyses ont été réalisées à plusieurs stades du développement de la pathologie à savoir 7, 28 et 63 jours post-infection pour l'étude de la phase d'initiation, de développement et de la résolution de l'infection, respectivement.

L'analyse de la charge bactérienne en réponse à l'infection par *M. bovis* BCG exprimant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) effectuée par cytométrie en flux indique clairement qu'un régime enrichi en fer atténue le pourcentage des cellules myéloïdes contenant la bactérie après 7 jours d'infection. Après 28 et 63 jours d'infection mycobactérienne, un dénombrement de la charge bactérienne en utilisant des échantillons des broyats de poumons, du foie et de la

rate des souris traitées avec un régime standard *versus* enrichi en fer confirme la réduction de la charge bactérienne après une surcharge en fer. Nous avons par ailleurs remarqué que l'infection à *M. bovis* BCG est associée à une rupture de l'homéostasie du fer en impactant positivement l'expression des transcrits de l'hepcidine, la ferroportine, l'inhibine b, la lipocaline 2, et le Bmp6 dans le foie. Dans le poumon, une induction de l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine est également observée.

Le recrutement des neutrophiles à une phase précoce de l'infection a aussi été étudié. Nous avons remarqué une réduction du nombre de neutrophiles dans le foie en condition de régime enrichi en fer, ce qui suggère une réduction de l'inflammation durant les phases critiques de l'infection. Nous avons aussi déterminé l'expression au niveau transcriptomique des médiateurs de l'inflammation dans le foie et le poumon et nous observons en général qu'un régime riche en fer atténue d'une manière significative l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme *TNF- α* , *IL-1 β* , *IFN- γ* et la *Lcn2* à 28 jours post-infection.

Le recrutement des lymphocytes au niveau des granulomes hépatiques 28 jours post-infection a également été analysé. D'une manière intéressante, nous avons remarqué une présence significativement plus importante des lymphocytes au niveau des granulomes hépatiques des souris ayant reçu un régime enrichi en fer comparé au régime standard. Nous avons pu mettre en évidence un recrutement plus élevé des lymphocytes T CD8⁺ dans le foie des souris traitées avec un régime riche en fer.

L'expression d'hepcidine a aussi été évaluée dans le foie et le poumon des souris après une infection à *M. bovis* BCG soumises à des régimes enrichis ou standards de fer. L'expression d'ARNm de l'hepcidine est fortement induite en réponse à une infection par *M. bovis* BCG et cette réponse est plus prononcée chez les souris soumises à un régime riche en fer. Nous avons aussi remarqué que l'infection *in vivo* par *M. bovis* BCG n'induit pas de diminution de l'ARNm de la ferroportine, au contraire nous notons une augmentation au jour 28 post-infection suggérant un mécanisme de défense qui viserait à exporter un maximum de fer de la cellule. Cependant, nous avons observé une expression beaucoup moins importante de la ferroportine à 28 jours post-infection dans le foie des souris soumises à un régime enrichi en fer. Ainsi un régime riche en fer exacerbe l'expression d'hepcidine et réduit celle de la ferroportine en réponse à *M. bovis* BCG.

Des études *in vitro* ont été réalisées en utilisant des macrophages dérivés de la moelle osseuse auxquels un traitement par *M. bovis* BCG a été effectué. Nous observons ainsi en

réponse à *M. bovis* BCG une expression d'hepcidine après 5 h d'infection suivie d'une exacerbation de l'expression à 18 et 24 h. L'expression de l'hepcidine est précédée d'une expression importante des marqueurs inflammatoires comme l'IL-6 et la lipocaline 2 entre 4 et 24 h. En réponse à *M. bovis* BCG, une diminution progressive de la ferroportine a été observée. Ainsi, une stimulation *in vitro* par *M. bovis* BCG induit une expression de l'IL-6 et de la lipocaline 2 associée à une expression plus importante d'hepcidine et une diminution de la ferroportine.

Pour finir, nous avons évalué le rôle du fer intracellulaire sur la croissance et l'internalisation dans les macrophages. Une modification de taux de fer intracellulaire par incubation avec du citrate d'ammonium ferrique (FAC) ou des chélateurs de fer (deferoxamine et deferiprone) a été réalisée. Les traitements des macrophages avec le FAC corrèlent positivement avec les espèces réactives oxygénées intracellulaires et négativement avec les chélateurs de fer. Nous remarquons ainsi qu'une présence importante du fer intracellulaire altère l'internalisation de *M. bovis* BCG et diminue également la croissance mycobactérienne à l'intérieur des macrophages.

Pour conclure, un régime enrichi en fer modérément est associé avec une diminution de la charge bactérienne et de l'inflammation en réponse à *M. bovis* BCG.

1 **Iron-rich diet decreases mycobacterial burden and correlates with**
2 **hepcidin upregulation, lower pro-inflammatory mediators and**
3 **higher T cell recruitment**

4
5 Rafiou Agoro^{1, 2}, Stéphanie Rose^{1, 2}, Raffaella Gozzelino³, Irene Garcia⁴, Bernhard
6 Ryffel^{1, 2}, Valerie F. J. Quesniaux^{1, 2} and Catherine Mura^{1, 2}

7
8 ¹Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, 3B
9 rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans, France; ²University of Orléans, 45071 Orléans,
10 France, ³Inflammation and Neurodegeneration Laboratory, Chronic Diseases
11 Research Centre (CEDOC)/NOVA Medical School, 1150 Lisbon, Portugal;
12 ⁴Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, University of
13 Geneva, 1211 Geneva, Switzerland.

14
15 **Corresponding author:** Catherine Mura. University of Orleans and CNRS, UMR7355,
16 Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, 3b rue de la ferrollerie, 45071
17 Orléans, France, catherine.mura@cnrs-orleans.fr.

18
19 **Running head:** Iron and mycobacteria infection interplay

20
21 Abstract word count :200 words

22 Text word count : 3494 words

23

24 **FOOTNOTES**

25

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

28

29 **Financial support.** This work was supported by le Centre National de la Recherche
30 Scientifique, the University of Orléans, le Ministère de l'Education Nationale, de la
31 Recherche et de la Technologie to RA as PhD fellowship, FEDER (N° 2016-
32 00110366) and FNS.

33

34 **Correspondence and requests for materials** should be addressed to V.F.J.Q
35 (email: quesniaux@cnrs-orleans.fr) and C. M. (email: [catherine.mura@cnrs-](mailto:catherine.mura@cnrs-orleans.fr)
36 [orleans.fr](mailto:catherine.mura@cnrs-orleans.fr)) University of Orleans and CNRS, UMR7355, Experimental and Molecular
37 Immunology and Neurogenetics, 3b rue de la ferollerie, 45071 Orléans, France.

38

39 **Abbreviations:** BCG, Bacillus Calmette–Guérin; Hamp, Hecpidin antimicrobial
40 peptide; Fpn, Ferroportin; Lcn2, Lipocalin 2; TNF, Tumor Necrosis Factor; IFN- γ ,
41 Interferon-gamma; iNOS, Inducible Nitric Oxide Synthase; Arg1, Arginase 1; IL,
42 interleukin; ROS, Reactive Oxygen Species; CFU, Colony-Forming Unit; FAC, ferric
43 ammonium citrate; DFO, deferoxamine; DFP, deferiprone; Cyto D, Cytochalasine D;
44 ALT, alanine transaminase, AST, aspartate transaminase.

45

46

47 **ABSTRACT**

48 **Background** Recent evidence indicates a robust competition between host and
49 mycobacteria for iron acquisition during infection. Variable consequences of iron
50 supplementation have been reported on the susceptibility to mycobacterial infection.
51 In this study, we revisited the effects of experimental iron-enriched diet on
52 *Mycobacterium bovis* BCG infection.

53 **Methods** Mice fed with standard diet or diet moderately enriched with iron were
54 infected with *Mycobacterium bovis* BCG-GFP. CFU, host myeloid cells, cell
55 recruitment, cytokine production and iron gene expression were determined at
56 different stages of infection. Bone marrow derived macrophages incubated
57 with/without iron were also used to measure bacterial uptake, inflammation marker
58 and iron gene expression.

59 **Results** In vivo a moderate iron supplementation reduced Inflammation in terms of
60 pro-inflammatory cytokines and neutrophil recruitment and enhanced T cell
61 recruitment in granulomas, together with lower bacterial load, in BCG infected mice.
62 Enhanced bacterial clearance in liver correlated with *hepcidin* upregulation known to
63 have anti-microbial proprieties, and sequestration of iron in tissues. In cultured
64 macrophages, iron supplementation induced reactive oxygen species (ROS),
65 reduced bacterial uptake and intracellular growth of BCG.

66 **Conclusion** On the whole, moderate iron increase diminished inflammation and
67 growth of *Mycobacterium bovis* BCG via enhanced ROS production, immune cell
68 activation and local hepcidin expression.

69 **Keywords:** *Mycobacterium bovis* BCG infection; Iron; Heparin; Inflammation

70

71 INTRODUCTION

72

73 Iron is a crucial metal element for protein structure and catalytic process in
74 mammals and microorganisms. Pathogens have developed iron acquisition systems,
75 which are essential for their growth and pathogenicity. In mammals, one of the first
76 lines of defense against bacterial infection is the scavenging of nutrients or nutritional
77 immunity, especially iron, that prevents bacterial growth [1]. Bacterial infection
78 induces the transcription of host genes involved in iron sequestration, such as
79 lipocalin 2, siderocalin, calprotectin, lactoferrin and ferritin with the aim to restrict iron
80 availability to pathogens [2-3]. Cell iron redistribution resulting mainly from ferroportin
81 iron cell exporter degradation induced by hepcidin antimicrobial peptide (Hamp) [4-
82 5], as well as Nramp1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1)
83 pumping out divalent metals from phagosomes [6], is also increased by infection.
84 Hepcidin peptide structurally similar to β -defensin exhibits a direct bactericidal effect
85 and also controls systemic iron level. Its expression is regulated upon high iron level
86 through Bmp6-Smad1/5/8/4 pathway and inflammation through activin b-
87 Smad1/5/8/4 and IL-6-Stat3 signaling [7-9]. *Ferroportin* transcript level is also
88 downregulated during acute inflammatory condition mediated by Toll-like receptors 4
89 and 2 [10]. Therefore, upon inflammation both hepcidin and ferroportin regulation
90 can independently lead to hypoferremia that could be considered as a host defense
91 strategy against infection.

92 Mycobacteria can be classified into several groups, of which the
93 *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), which can cause tuberculosis in
94 humans or other organisms. MTBC include *M. bovis* and *M. tuberculosis*. BCG is an

95 attenuated bovine tuberculosis bacillus, developed as vaccine and widely used as
96 model in mice due to its slow growth rate similar to that observed in *M. tuberculosis*.
97 MTBC infection is often described by two distinct phases: an active phase of growth
98 and a latent infection. After inhalation, MTBC mycobacteria are phagocytosed by
99 macrophages which move to deeper tissues [11]. Intracellular mycobacteria prevent
100 the fusion of the phagosome with the acidic lysosome, which permits bacterial
101 growth and triggers pro-inflammatory response and recruitment of immune cells. The
102 myeloid and lymphoid cell recruitment at the site of infection contributes to the
103 formation of granuloma which is formed by a core of infected macrophages
104 surrounded by T lymphocytes, CD8⁺ and CD4⁺ T cells. Granuloma contain the
105 infection but support bacterial survival over long periods of time Coordinated innate
106 and adaptive immune responses are required for the efficient control of mycobacteria
107 infection, including macrophages, T cells, and the expression of cytokines, reactive
108 oxygen (ROS) and reactive nitrogen intermediates [12-16].

109 Iron plays multiple and somewhat conflicting roles. Controversial results have
110 been reported on the relationship between host iron levels, modulated through eating
111 habits or supplementation, and bacterial pathogenicity, particularly in malaria,
112 salmonellosis and tuberculosis [17-19]. Here, we demonstrated that mice with
113 moderate iron enriched diet are more resistant to BCG infection, presenting a
114 reduced mycobacterial burden, correlated to a higher T cell recruitment and hepcidin
115 expression, and lower production of pro-inflammatory mediators. In vitro, we
116 observed that macrophage iron loading reduced BCG uptake and growth.

117 MATERIAL AND METHODS**118 BCG infection in mice**

119 Four-week old male mice C57BL/6 (JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, France)
120 were fed with either iron-rich or standard iron diet, 2500 mg or 280 mg of iron
121 carbonyl per kg of food (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) during
122 4 weeks plus the duration of infection. Then mice were infected intravenously with
123 2×10^6 *M. bovis* BCG expressing green fluorescent protein (GFP) (prepared as
124 previously described [20] and sacrificed on day 7, 28 and 63 post-infection. All
125 animal experiments complied with the French Government's animal experiment
126 regulations and approved by the Ethics Committee of CNRS (CCO; N° CLE CCO
127 2012–1001). Bacterial load in tissue was assessed as described [20].

128 Haematology analysis and iron measurement

129 Hematological parameters were determined as described [21] Hepatic and splenic
130 iron concentration were measured by the ferrozine colorimetric method as described
131 [22].

132 Flow cytometry analysis

133 Mononuclear livers cells were obtained as described previously [23]. Spleen and
134 inguinal lymph node mononuclear cells were obtained as already described [24].
135 Immunostaining for flow cytometry were performed following standard procedures
136 (See supplementary materials). Data were processed with FlowJo software (version
137 7.6.5 for Windows, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

138 Histopathological analysis

139 Liver were fixed in 4% phosphate buffered formalin, paraffin-embedded, and 4-5 μ m
140 sections stained with haematoxylin and eosin. Granulomas were counted in a total
141 area of 0.4 mm² of liver section per sample. Lymphocytes in liver granulomas were

142 counted in 12 to 15 representative granulomas per sample. Tissue iron deposition
143 was monitored by Perl's staining.

144 **Pulmonary cytokine determination**

145 Lung samples were weighed and defined aliquots were homogenised into Tris-HCl.
146 Homogenates were then centrifuged, filtrated and stored at -80°C until determination
147 of cytokines levels by ELISA (DuoSet R&D systems, Minneapolis, MN, USA).

148 **Cell culture**

149 Murine bone marrow cells (BMDM) were isolated from femurs and differentiated into
150 macrophages as described [20]. Macrophages were then plated at 10^6 cells/well,
151 treated with ferric ammonium citrate (FAC) at 10 μ M overnight and stimulated with
152 BCG.

153 **Quantitative PCR analysis**

154 Total RNA from tissue samples or cells was isolated and reverse transcription was
155 performed as described [24]. The mRNA were normalized to the housekeeping gene
156 *Gapdh* in the same RT sample and relative transcript expression of genes was given
157 as $\Delta C_t = C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ reference}}$. Fold change of genes expression compared with untreated
158 mice was determined as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ treated}} - \Delta C_{t \text{ control}}$).

159 **Unbound cell iron and reactive oxygen species measurement**

160 BMDM plated in 96-well microplate were incubated with calcein-AM (Life
161 Technologies) or H2DCFDA (Life Technologies) for labile cell iron and intracellular
162 ROS measurement, respectively, and cells were treated with ferric ammonium citrate
163 (FAC) or iron chelators as indicated.

164

165

166

167 **Intracellular BCG-GFP assessment**

168 For intracellular mycobacteria detection, BCG GFP-infected macrophages were
169 stained with Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 647 conjugate (Invitrogen) and
170 DAPI (Sigma Aldrich). Pictures were acquired using Axio OBSERVER Z1
171 microscope (Carl ZEISS, Oberkochen, Germany). For internalization investigation,
172 plated macrophages were stained with pHrodo (pHrodo Green AM, Life
173 Technologies) for fluorescence intracellular pH measurement. Macrophages CFU
174 assay were performed as described [25].

175 **Statistical analysis**

176 Statistical comparison was performed by the post hoc Bonferroni's test and the
177 Student's t-test to compare more than 2 or two groups respectively using
178 GraphPrism software (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla,
179 California, USA).

180 **RESULTS**181 **Reduction of in vivo bacterial burden after BCG infection under iron-rich diet.**

182 Adult C57BL/6 mice kept on standard or iron-rich diet for 4 weeks were
183 infected with BCG. We then examined the bacterial burden in the liver, spleen and
184 lung at several time points corresponding to infectious stage (day 7), granuloma
185 formation (day 28) and infection resolution (day 63) (**Figure 1**). A decrease of bacilli
186 levels (CFU) in liver, lung and spleen was observed in mice infected with BCG-GFP
187 under iron-rich diet as compared to infected animals fed with standard diet at 28 and
188 63 days after infection (**Fig 1A**). The lower bacilli loads in mice under iron-rich diet
189 correlated with the level of mycobacteria uptake by host myeloid cells determined by
190 flow cytometry. Indeed, the level of BCG-GFP⁺ CD11b⁺ cells in liver (2.2%) and
191 spleen (30.4%) 7 days after infection was slightly reduced in mice fed with iron-rich
192 diet, as compared to standard iron diet (**Fig 1B, C**). Therefore, 4 weeks of iron
193 supplemented diet protected from BCG growth.

194 BCG infection induces anaemia [26]. Indeed, red blood cell counts and
195 haematocrit were decreased 7 days post-infection, as compared to vehicle treated
196 mice (**Fig 2A**). Iron-rich diet increased haemoglobin levels in both naïve and BCG
197 infected mice and prevented the reduction of red blood cell counts and haematocrit
198 in BCG infected mice (**Fig 2A**). Thus, our data suggest that the early anaemia upon
199 BCG infection reversed by iron-rich diet could be due to hypoferrremia.

200 Under our experimental conditions iron rich diet increased the levels of
201 hepatic and splenic iron, and scarce iron deposition was noticed in the liver (**Fig 2B**),
202 and no significant changes in AST and ALT serum levels were observed indicating
203 the absence of hepatotoxicity (data not shown). Second, BCG infection also

204 increased iron levels (d7) in liver and spleen (**Fig 2B**). Combining high iron diet and
205 BCG infection enhanced splenic iron levels as compared to BCG infection or high
206 iron diet alone, whereas no significant further increase of iron levels was noticed in
207 the liver. Therefore, BCG infection altered host iron homeostasis leading to anaemia
208 and iron retention in liver and spleen tissues.

209 **BCG infection modulates iron regulating genes *in vivo***

210 The expression of genes involved in the regulation of iron homeostasis were
211 analysed during acute BCG infection. *Hepcidin (Hamp1)* and *ferroportin (Fpn)* genes
212 were upregulated in both liver and lung in C57BL/6 mice after one week of BCG
213 infection, under standard diet (**Fig 2C**). Furthermore, *Inhibin b* and *Bmp6* genes
214 encoding activin b and BMP6 proteins, known to induce hepcidin expression [7],
215 were upregulated in the liver (**Fig 2C**). In addition, the expression of *Lcn2*, a host
216 defense proteins involved in the sequestration of bacterial siderophores [2, 27], was
217 also strongly upregulated 7 days post BCG infection. Thus, the imbalance of iron
218 control genes was indicative of BCG-induced rupture of iron homeostasis in liver and
219 lung.

220 **Iron rich diet disrupted cell recruitment during BCG infection**

221 Infection triggers an innate immune response characterized by the production
222 of chemokines and cytokines, recruiting and activating neutrophils, macrophages
223 and T cells during infection. At an early stage of infection (7 days) an increase in
224 CD11b⁺Gr1^{high} neutrophils, the main BCG phagocytic cells, was observed by flow
225 cytometry in liver and spleen, together with some increase in CD11b⁺Gr1^{low}
226 macrophages in liver, which both were prevented in mice fed iron supplemented diet
227 (**Fig. 3A, B**). Therefore, iron supplementation attenuates the recruitment of myeloid

228 cells. Second, CD8⁺ T lymphocytes cells were analysed by flow cytometry at late
229 phase of infection (d63). As shown in **Fig 3C**, the recruitment of CD8⁺ T cells in liver
230 upon BCG infection was increased significantly in mice fed with iron rich diet. We
231 also determined the mobilization of CD8⁺ T lymphocytes from spleen and lymph
232 nodes. As shown in **Fig 3C**, the proportion of CD8⁺ T cells in isolated spleen and
233 lymph nodes was significantly lower upon d63 BCG infection as compared to
234 uninfected mice fed with standard iron diet. Moreover iron rich diet prevented this
235 decrease in spleen and lymph nodes after BCG infection.

236 Granuloma formation is a manifestation of cell-mediated immune response,
237 crucial for inhibiting mycobacterial growth. We therefore asked whether iron rich diet
238 altered granuloma formation during BCG infection. Liver histology was not altered in
239 uninfected mice fed an iron rich diet as compared with standard diet. In BCG infected
240 mice the number of granuloma at 28 days post-infection was similar in mice fed
241 standard (11 ±0.1) or iron rich diet (12 ±0.4 per mm² liver section). However,
242 remarkably liver histology from BCG infected mice under iron rich diet was
243 characterized by higher numbers of lymphocytes in granuloma at 4 weeks post-
244 infection, as compared with infected mice fed with standard diet (**Fig 3D**). Therefore,
245 iron-induced, increased bacterial clearance in liver was associated with an increase
246 of CD8⁺ T cells population in the liver and higher lymphocytic recruitment in
247 granuloma.

248 **Reduction of BCG-induced inflammation in liver and lung under iron rich diet.**

249 We then hypothesized that changes during the initial phase of infection might
250 alter the kinetics of infection in terms of inflammation one and two months after
251 infection. The expression of inflammatory genes was assessed in liver and lung one

252 to eight weeks after BCG infection in mice fed with either standard or iron rich diet. In
253 the liver, the expression of pro-inflammatory cytokines *IL-12b*, *Tnf- α* , *Lcn2*, *IL-1 β* and
254 *Ifn- γ* , and of *iNOS* was increased after BCG infection, peaking at four weeks (d28)
255 **(Fig 4A)**. The expression of inflammatory genes was mostly back to baseline levels
256 at day 63 post-infection, with the control of infection and resolution of inflammation.
257 Remarkably, in conditions of iron rich diet the expression of pro-inflammatory genes
258 was significantly lower at day 28. Interestingly, the expression of anti-inflammatory
259 genes *IL-10* and *Arg1* showed a similar profile as the pro-inflammatory genes in the
260 liver **(Fig 4A)**.

261 In the lung the level of *iNOS*, *Tnf- α* , *Lcn2*, *Ifn- γ* and *IL-1 β* gene expression
262 also reached a maximum at day 28 **(Fig 4B)**, and returned to low or baseline levels
263 by day 63, with lower levels under high iron diet, as compared to standard diet
264 condition. *IL-12b* expression was induced in the lung after BCG infection and iron
265 rich diet did not alter this expression. The anti-inflammatory cytokine *IL-10* was more
266 upregulated in the context of iron rich diet in the lung during the late phase of BCG
267 infection. *Arg1* expression was increased at early stage of infection, half so after iron
268 rich diet, and returned to basal level at 1-2 months post-infection **(Fig 4 B)**.

269 The overall inflammatory status was further assessed at the level of cytokine
270 release in the lungs of BCG infected mice fed with standard and iron-rich diet **(Fig**
271 **4C)**. Pro-inflammatory cytokines IFN- γ , IL-1 β , IL-12p40, TNF- α and *Lcn2* were
272 increased in lungs at day 28 after BCG infection. Although iron diet had no direct
273 effect on steady-state cytokine levels, cytokine overexpression in response to
274 infection was significantly impaired under iron diet context **(Fig 4C)**. Therefore, iron

275 rich diet has a definite down-modulatory influence on BCG induced liver and lung
276 pro-inflammatory cytokines expression.

277 **Liver and lung hepcidin are strongly upregulated after BCG infection under**
278 **iron rich diet context**

279 Hepcidin is known to be upregulated in liver by iron, inflammation and
280 infection [4, 28-29], whereas *ferroportin* transcript level is upregulated by iron and
281 downregulated upon inflammation. Here, *hepcidin* mRNA expression was induced in
282 liver and lung (**Fig 5**) following BCG infection and this was strongly exacerbated in
283 mice fed with an iron rich diet. Interestingly, the increase of *hepcidin* by infection did
284 not correlate with a decrease in *ferroportin* mRNA (**Supplementary Figure 1**). The
285 level of *ferroportin* mRNA was strongly upregulated during BCG infection in liver,
286 thus favouring iron export and reducing iron availability for intracellular bacteria. Iron
287 rich diet reduced this overexpression of *ferroportin* mRNA in the liver 28 days after
288 BCG (**Supplementary Figure 1A**). Thus iron rich diet exacerbated BCG induced
289 hepcidin upregulation in liver and lung while down-modulating ferroportin in liver.

290 **Alteration of hepcidin-ferroportin axis after BCG infection *in vitro***

291 We then further examined *hepcidin* expression during BCG infection *in vitro* in
292 primary bone marrow derived macrophages. Time course studies revealed an
293 upregulation of *hepcidin* gene expression within 5h after BCG infection, with a strong
294 exacerbation at 18-24h (**Fig 6A**). *Hepcidin* upregulation was preceded by *lipocalin 2*
295 and *IL-6* expression 4-24h post BCG infection (**Fig 6C, D**). A progressive decrease
296 in *ferroportin* gene expression in macrophages was detected from 1h post infection,
297 reaching a maximal downregulation after 18-24h (**Fig 6B**).

298

299 Iron treatment impairs BCG internalization and growth in macrophages

300 We next assessed the role of iron on BCG infection growth and host cell
301 response in bone marrow derived macrophages (BMDMs). Intracellular iron was
302 efficiently increased in macrophages following ferric ammonium citrate (FAC)
303 addition, iron chelators, deferoxamine (DFO) and deferiprone (DFP), had the
304 opposite effect as measured by calcein AM quenching method (**Fig 7A**). *Hepcidin*
305 expression level was not altered in macrophages treated with FAC, however we
306 found that BCG induced upregulation of *hepcidin* expression was reduced by
307 intracellular iron loading. Furthermore, iron upregulated *ferroportin* mRNA expression
308 and partially prevented BCG infection-induced *ferroportin* gene downregulation
309 (**Supplementary Fig 3**). Thus macrophage-iron loading impairs BCG growth in spite
310 of a decreased *hepcidin* expression.

311 Furthermore, the increased cellular iron levels correlated with production of
312 ROS and iron chelators reduced ROS production (**Fig 7A**). Since ROS are known to
313 kill bacteria, we hypothesized that the bacterial uptake and survival in macrophage
314 should be lower in the presence of iron. To investigate this hypothesis, we infected
315 macrophages with BCG GFP and analysed the intracellular bacteria by fluorescence
316 microscopy. As shown in **Fig 7C**, intracellular cell iron impaired the uptake of BCG-
317 GFP within macrophages. Further support of reduced BCG internalization in
318 macrophages was shown by the reduction of intracellular pH in macrophage by iron
319 (**Fig 7D**). Increasing ROS by intracellular iron was associated with reduced bacterial
320 growth in BCG infected cells at 48 h of culture (**Fig 7B**). Conversely decreased iron
321 content by DFO and DFP iron chelators led to an increased bacterial load in BCG
322 infected BMDM (**Fig 7B**). However, BCG growth assessed by CFU in cell-free media

323 was increased by supplementation of iron in the culture media while iron chelators
324 reduced its growth (**Supplementary Fig 2**).

325

326 **DISCUSSION**

327 In this study, we demonstrated that mice fed with a diet moderately enriched with
328 iron, exhibit decreased liver, lung and spleen bacterial burden of BCG infection, as
329 compared to mice under standard diet. This decrease was associated with reduced
330 neutrophils and macrophages recruitment in liver and neutrophils in spleen, and
331 attenuation of mediators of inflammation at early stage of infection, whereas higher T
332 cell recruitment, noticeably in granulomas was observed at a later stage. In vitro
333 analysis highlighted that supplementation of iron to cell culture media impairs BCG
334 cell uptake and intracellular growth in macrophages.

335 In mice fed with a standard diet, the most important decrease in bacterial burden
336 was observed between day 28 and day 63 in the liver, correlating with an early (d28)
337 increase in *hepcidin* gene expression. Upon iron supplementation in our model
338 consisting in a diet moderately enriched which did not induce liver toxicity nor iron
339 deposition, but induced hepcidin expression, mice exhibited a sharper decline in
340 bacterial burden. Hpcidin is expressed in stimulated hepatocytes but also in
341 phagocytic cells during *M. tuberculosis* infection [30] and as shown here with primary
342 macrophages. Thus, we could assume a role for hepcidin activity in BCG clearance
343 as this peptide has proved anti-microbial properties, altering *Mycobacterium*
344 structure.

345 Although BCG uptake was reduced in macrophages when the cells were loaded
346 with iron, in cell-free culture, BCG growth was boosted by iron overload, confirming
347 that iron promotes bacterial growth [17]. The lower bacterial load in iron enriched
348 conditions was associated with a reduced recruitment of neutrophils and
349 macrophages, involved in engulfment and destruction of bacteria a key process in

350 the containment of mycobacteria infection. Moreover, the reduced inflammatory cell
351 recruitment was accompanied by a decrease in pro-inflammatory cytokines
352 expression in the liver and lung. Previous studies in mouse models characterized by
353 high iron overload, obtained either by iron intraperitoneal injection (50 mg/kg) or oral
354 administration (25 mg/kg diet), or in β 2-microglobulin deficient mice [18, 31] reported
355 a raise of lung bacterial load after *M. tuberculosis* infection. Our results suggest that
356 moderate enriched diet with iron or moderate iron-cell loading impairs
357 *Mycobacterium* uptake and growth while high iron loading promotes *Mycobacterium*
358 growth.

359 During mycobacteria infection, granuloma follicle-like structures resembling
360 secondary lymphoid organs are sites of immune-mediated containment. Granuloma
361 formation greatly relies on immune cell recruitment, and is characterized by high
362 proliferative activity found in the peripheral structure [32]. We show higher CD8⁺ T
363 cell levels in infected organs, with granuloma displaying higher lymphocyte
364 population, in BCG infected mice fed with iron-rich diet, as compared to standard
365 diet. In another inflammation model induced by concanavalin A, iron deficiency
366 dampened inflammatory liver changes associated with a marked decrease in T cell
367 and NKT cell activation [33]. Therefore, iron supplementation which promotes T cell
368 response in infected mice, with higher CD8⁺ T cells able to recognize infected
369 macrophages and activate them by secreting IFN γ , would promote BCG clearance.

370 Mammalian developed several strategies to deprive bacteria for metals
371 acquisition especially iron [34]. *Nramp1* is known as the first gene of host resistance
372 against intracellular bacteria [7]. Several mice strains, including C57BL/6 and Balb/c,
373 were described to be unfunctional for *Nramp1*, leading to susceptibility of these

374 strains to intracellular infections [35-37]. Using C57BL/6 mice, we can thus rule out
375 that the increased resistance to BCG under iron-rich diet relies on Nramp1 activity.
376 Our results show that the hepcidin-ferroportin mechanism of iron regulation may
377 contribute to mycobacteria resistance. However, iron rich condition may also
378 modulate host defense independently of hepcidin upregulation. In vitro study
379 highlighted that iron-loaded macrophages reduced bacteria uptake ability and
380 growth, although hepcidin level was decreased compared to infection alone.
381 Impaired downregulation of ferroportin during BCG infection that should increase the
382 export of iron from macrophages, higher reactive oxygen species (ROS) generated
383 by higher intracellular iron and crucial for cell defense and signaling pathways [38],
384 as well as partial macrophage phenotype switch to M2 polarisation thus decreasing
385 phagocytosis ability, may explain the reduced bacteria uptake in our iron enriched
386 diet condition [39-41].

387 Our results highlight the controversial role of host iron status in mycobacterial
388 infection condition. Iron promotes bacterial cell growth but actually moderate
389 increase in iron level, as in our study, enhances the population of immune cells, like
390 T cells, and alters cell differentiation, like macrophages, which seemingly allow better
391 defense. In addition, higher intracellular iron level increases ROS production which
392 also helps to fight against bacteria. Further investigations will be necessary
393 especially for a better understanding on the implication of iron supplementation and
394 eating habits on bacterial infection in human.

395 **ACKNOWLEDGMENTS**

396 We thank Guillaume Blaser (University of Geneva) and David Gosset (Plateforme
397 Pacific CBM, CNRS Orléans) for technical assistance.

398

399

400 **REFERENCES**

- 401 1. Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese
402 and zinc. *Curr Opin Chem Biol* **2010**;14:218-24.
- 403 2. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response
404 to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **2004**;432:917-21.
- 405 3. Guglani L, Gopal R, Rangel-Moreno J, et al. Lipocalin 2 regulates inflammation
406 during pulmonary mycobacterial infections. *PLoS One* **2012**;7:e50052.
- 407 4. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding
408 a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed
409 during iron overload. *J Biol Chem* **2001**;276:7811-9.
- 410 5. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by
411 binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **2004**;306:2090-3.
- 412 6. Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, et al. The *lty/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to
413 infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1*
414 gene. *J Exp Med* **1995**;182:655-66.
- 415 7. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, et al. Induction of activin B by inflammatory
416 stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through
417 *Smad1/5/8* signaling. *Blood* **2012**;120:431-9.
- 418 8. Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, et al. Hepcidin regulation by innate immune
419 and infectious stimuli. *Blood* **2011**;118:4129-39.
- 420 9. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through
421 *STAT3*. *Blood* **2006**;108:3204-9.
- 422 10. Guida C, Altamura S, Klein FA, et al. A novel inflammatory pathway mediating
423 rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood* **2015**;125:2265-75.

- 424 11. Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, et al. Mycobacteria manipulate macrophage
425 recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* **2014**;505:218-
426 22.
- 427 12. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development.
428 *Tuberculosis (Edinb)* **2004**;84:93-101.
- 429 13. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **2001**;19:93-
430 129.
- 431 14. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **2004**;22:599-
432 623.
- 433 15. Korbel DS, Schneider BE and Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis:
434 myths and truth. *Microbes Infect* **2008**;10:995-1004.
- 435 16. Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, et al. Nitric oxide controls the
436 immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent
437 processing of IL-1beta. *Nat Immunol* **2013**;14:52-60.
- 438 17. Drakesmith H, Prentice AM. Heparin and the iron-infection axis. *Science*
439 **2012**;338:768-72.
- 440 18. Lounis N, Truffot-Pernot C, Grosset J, Gordeuk VR and Boelaert JR. Iron and
441 *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Virol* **2001**;20:123-6.
- 442 19. Gangaidzo IT, Moyo VM, Mvundura E, et al. Association of pulmonary
443 tuberculosis with increased dietary iron. *J Infect Dis* **2001**;184:936-9.
- 444 20. Bourigault ML, Segueni N, Rose S, et al. Relative contribution of IL-1alpha, IL-
445 1beta and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and
446 attenuated *M. bovis* BCG. *Immun Inflamm Dis* **2013**;1:47-62.
- 447 21. Palomo J, Reverchon F, Piotet J, et al. Critical role of IL-33 receptor ST2 in
448 experimental cerebral malaria development. *Eur J Immunol* **2015**;45:1354-65.

- 449 22. Barry M, Sherlock S. Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy
450 specimens. *Lancet* **1971**;1:100-3.
- 451 23. Ronet C, Mempel M, Thieblemont N, Lehuen A, Kourilsky P and Gachelin G.
452 Role of the complementarity-determining region 3 (CDR3) of the TCR-beta chains
453 associated with the V alpha 14 semi-invariant TCR alpha-chain in the selection of
454 CD4+ NK T Cells. *J Immunol* **2001**;166:1755-62.
- 455 24. Segueni N, Benmerzoug S, Rose S, et al. Innate myeloid cell TNFR1 mediates
456 first line defence against primary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep*
457 **2016**;6:22454.
- 458 25. Sharma M, Bose M, Abhimanyu, et al. Intracellular survival of *Mycobacterium*
459 *tuberculosis* in macrophages is modulated by phenotype of the pathogen and
460 immune status of the host. *Int J Mycobacteriol* **2012**;1:65-74.
- 461 26. Marchal G, Milon G. Decreased erythropoiesis: the origin of the BCG induced
462 anaemia in mice. *Br J Haematol* **1981**;48:551-60.
- 463 27. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN and Strong RK.
464 The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with
465 siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **2002**;10:1033-43.
- 466 28. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A and Vaulont S. Heparin,
467 a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* **2002**;29:327-35.
- 468 29. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A and Ganz T.
469 Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase
470 protein. *Blood* **2003**;101:2461-3.
- 471 30. Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS and Lafuse
472 WP. Expression and localization of heparin in macrophages: a role in host
473 defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol* **2007**;82:934-45.

- 474 31. Schaible UE, Collins HL, Priem F and Kaufmann SH. Correction of the iron
475 overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes
476 their increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med* **2002**;196:1507-13.
- 477 32. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S and Altare F. Foamy macrophages
478 and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol*
479 **2009**;10:943-8.
- 480 33. Bonaccorsi-Riani E, Danger R, Lozano JJ, et al. Iron Deficiency Impairs Intra-
481 Hepatic Lymphocyte Mediated Immune Response. *PLoS One* **2015**;10:e0136106.
- 482 34. Moller M, Hoal EG. Current findings, challenges and novel approaches in human
483 genetic susceptibility to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **2010**;90:71-83.
- 484 35. Bradley DJ. Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*.
485 *Nature* **1974**;250:353-4.
- 486 36. Forget A, Skamene E, Gros P, Miallhe AC and Turcotte R. Differences in
487 response among inbred mouse strains to infection with small doses of
488 *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* **1981**;32:42-7.
- 489 37. Brown IN, Glynn AA and Plant J. Inbred mouse strain resistance to
490 *Mycobacterium lepraemurium* follows the *Ity/Lsh* pattern. *Immunology*
491 **1982**;47:149-56.
- 492 38. Ray PD, Huang BW and Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis
493 and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **2012**;24:981-90.
- 494 39. Corna G, Campana L, Pignatti E, et al. Polarization dictates iron handling by
495 inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*
496 **2010**;95:1814-22.
- 497 40. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation:
498 time for reassessment. *F1000Prime Rep* **2014**;6:13.

499 41. Agoro R, Mura C. Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-
500 regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization.
501 Blood Cells, Molecules and Diseases **2016**;61:16 - 25.

502

503

Figure 1

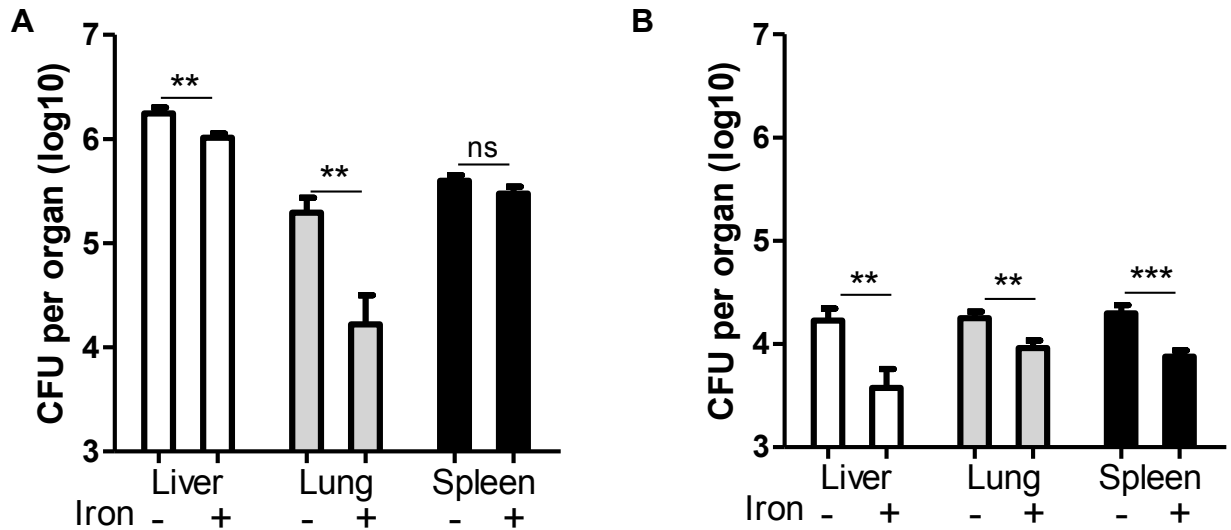
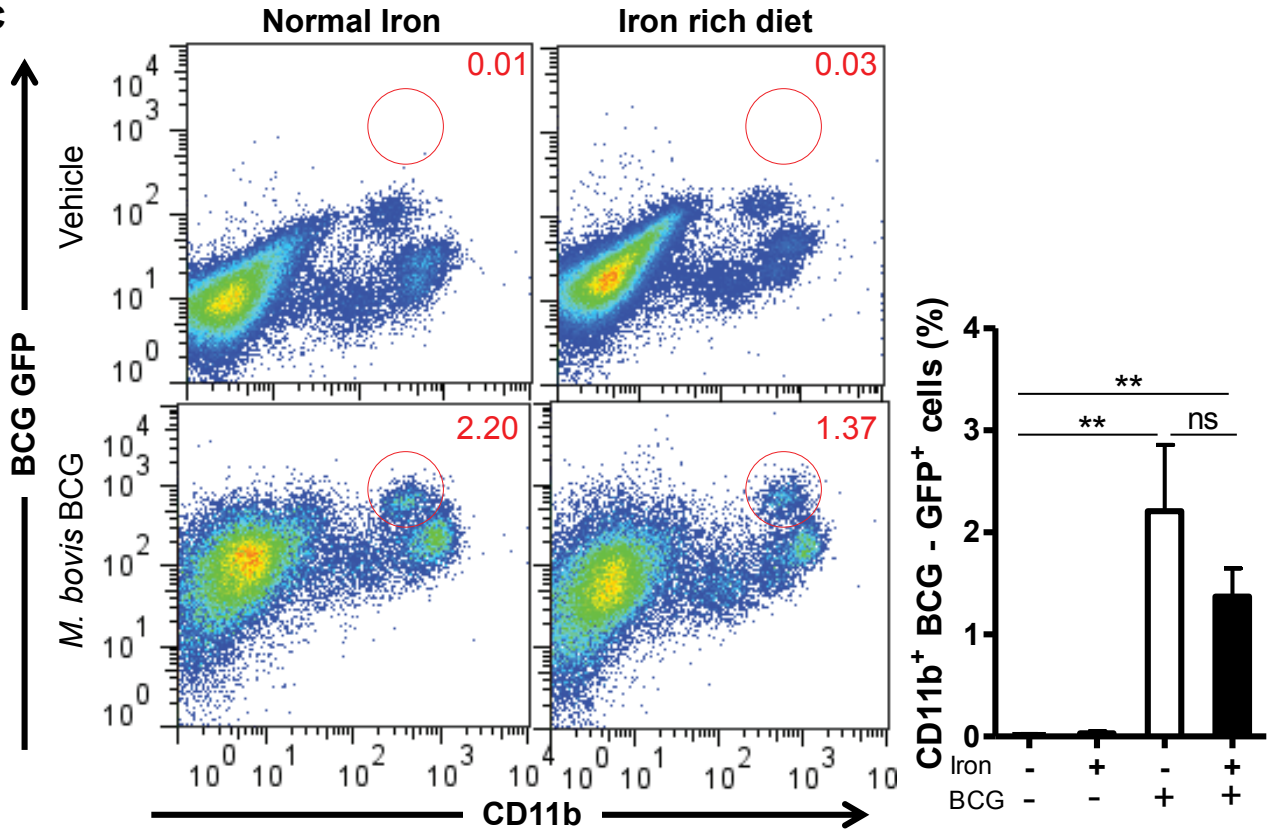


Figure 1. Reduction of bacterial burden and *M. bovis* BCG-GFP internalization under iron-rich diet.

C57BL/6 mice were fed with normal or iron-rich diet for 4 weeks and then infected intravenously with *M. bovis* BCG-GFP (2×10^6 CFU per mouse). Liver, lung and spleen bacterial loads were determined on day 28 (A) and 63 (B) post-infection. *M. bovis* BCG uptake in liver (C) and spleen (D) in CD11b⁺ cells during early stage of infection was analysed by flow cytometry on day 7 post infection using *M. bovis* BCG expressing green fluorescent protein (*M. bovis* BCG GFP). Data are representative of two independent experiments and presented as mean \pm SEM (n= 5 mice per group). n s, not significant; *, p \leq 0.05; **, p \leq 0.01; ***, p \leq 0.001.

Figure 1

C



D

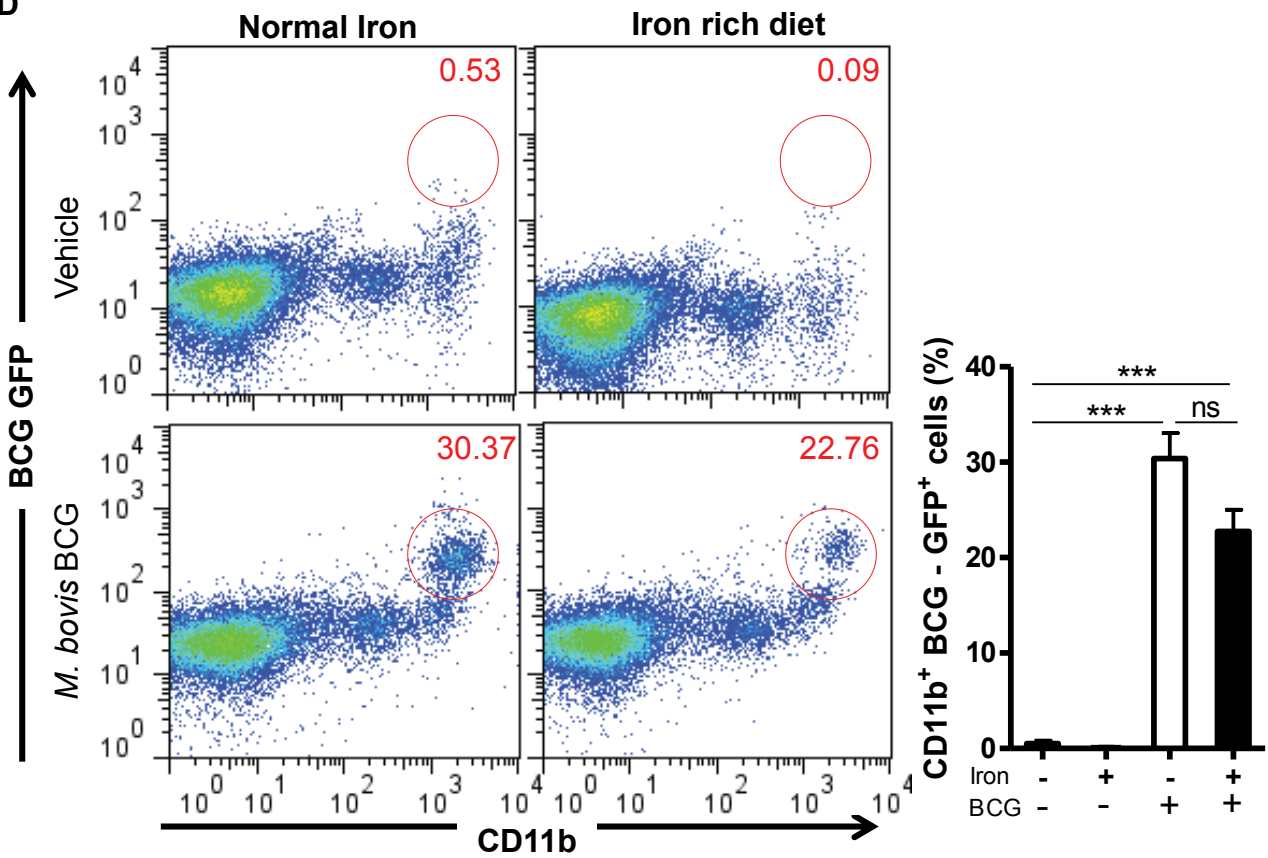


Figure 2

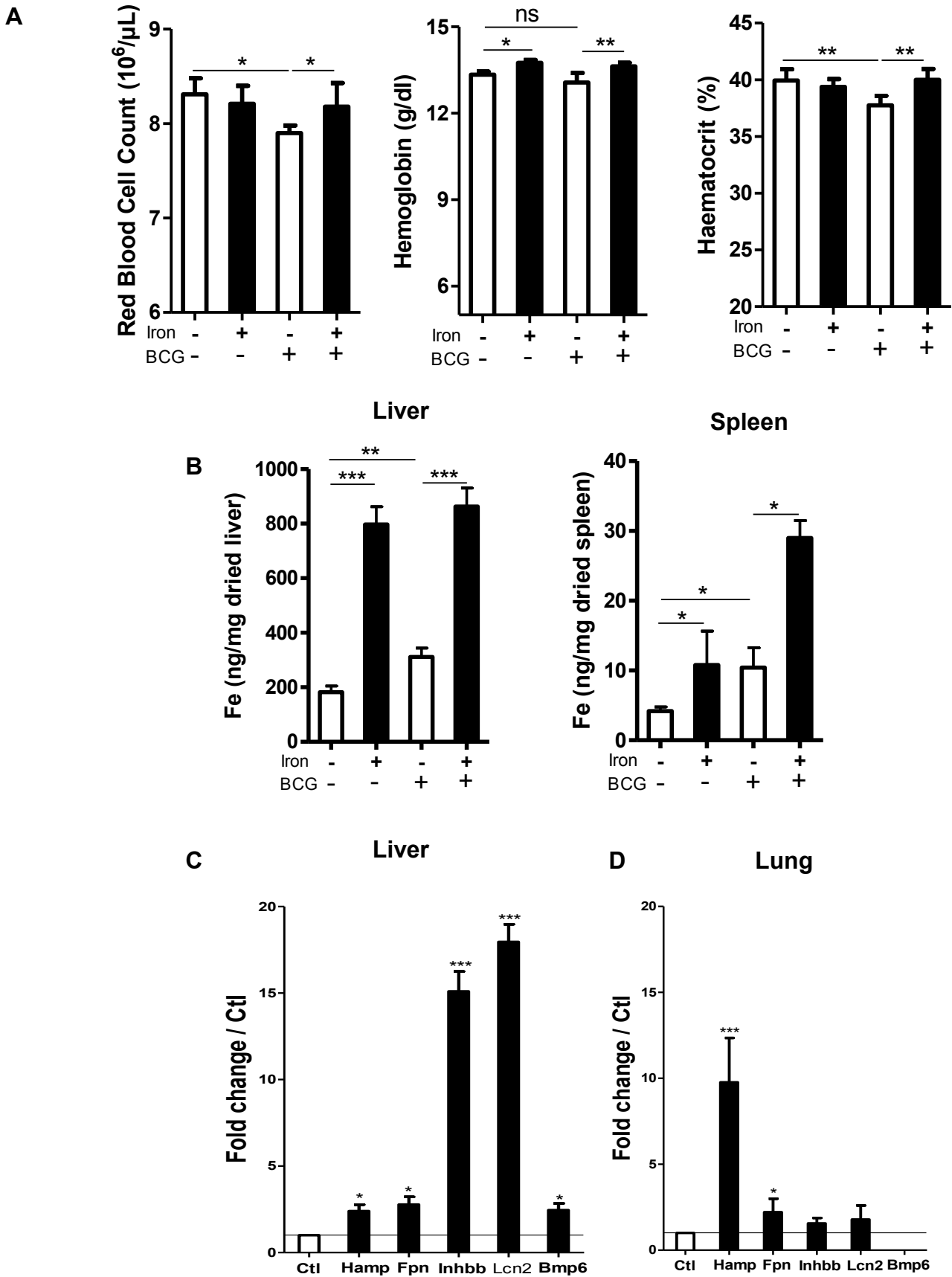


Figure 2. *M. bovis* BCG infection induces an imbalance of iron homeostasis associated genes leading to anemia.

C57BL/6 mice were fed with normal iron or iron-rich diet for 4 weeks and infected intravenously with *M. bovis* BCG (2×10^6 CFU per mouse). Red blood cell count, haemoglobin level and haematocrit were then determined on day 7 post infection (**A**). Iron content in liver and spleen was measured at that stage using ferrozine assay (**B**). *Hepcidin* (*Hamp*), *Ferroportin* (*Fpn*), *Inhibin b* (*Inhbb*), *Lipocalin 2* (*Lcn2*) and *Bmp6* mRNA expression was determined in liver (**C**) and lung (**D**) on day 7 post infection by quantitative RT-PCR analysis. Gene expression was normalized to *Gadph* as housekeeping gene and expressed relatively to uninfected mice. Data are representative of two independent experiments (n = 5 mice per group) and presented as mean \pm SEM (A, B) and mean \pm SD (C, D). n s, not significant; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

Figure 3

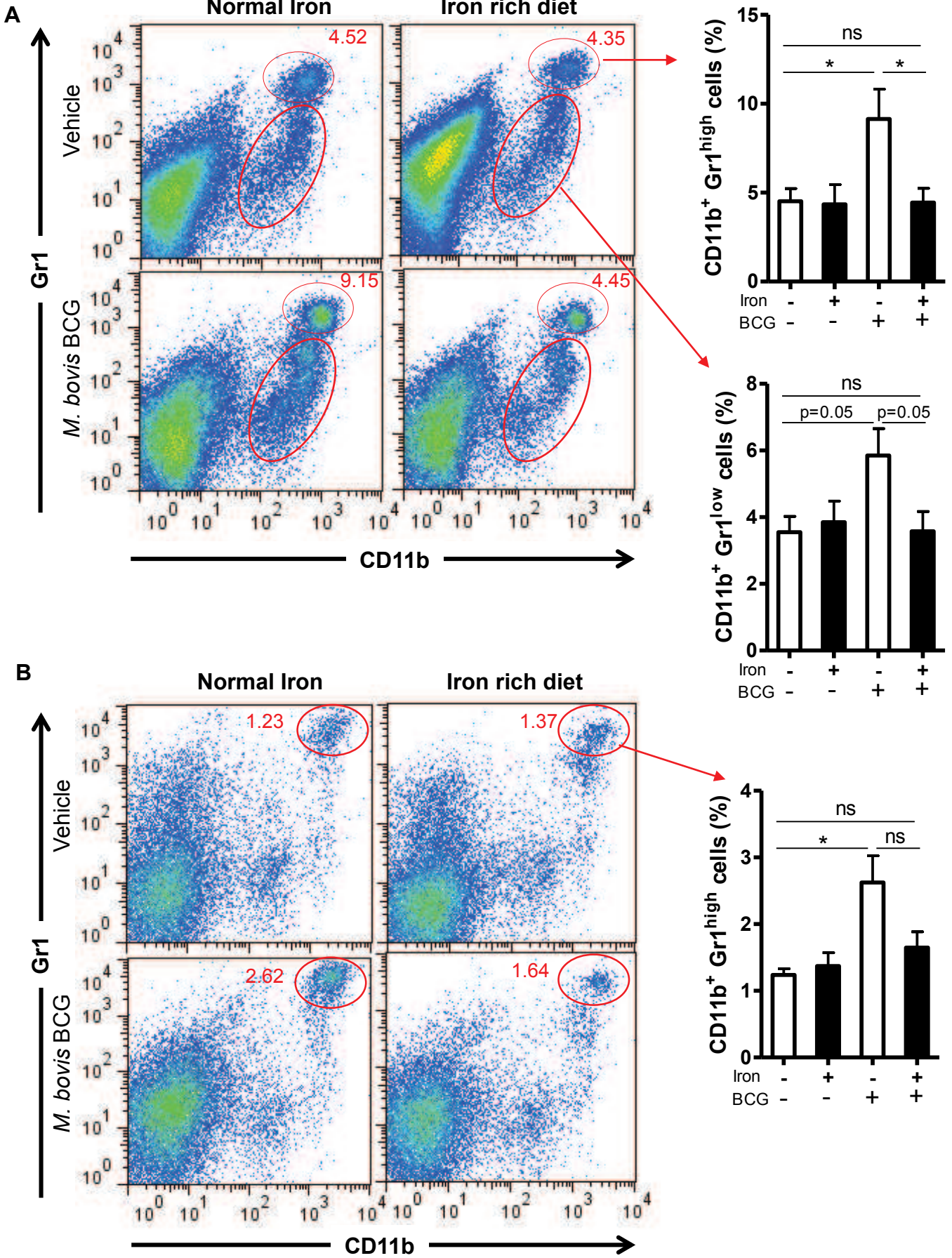


Figure 3

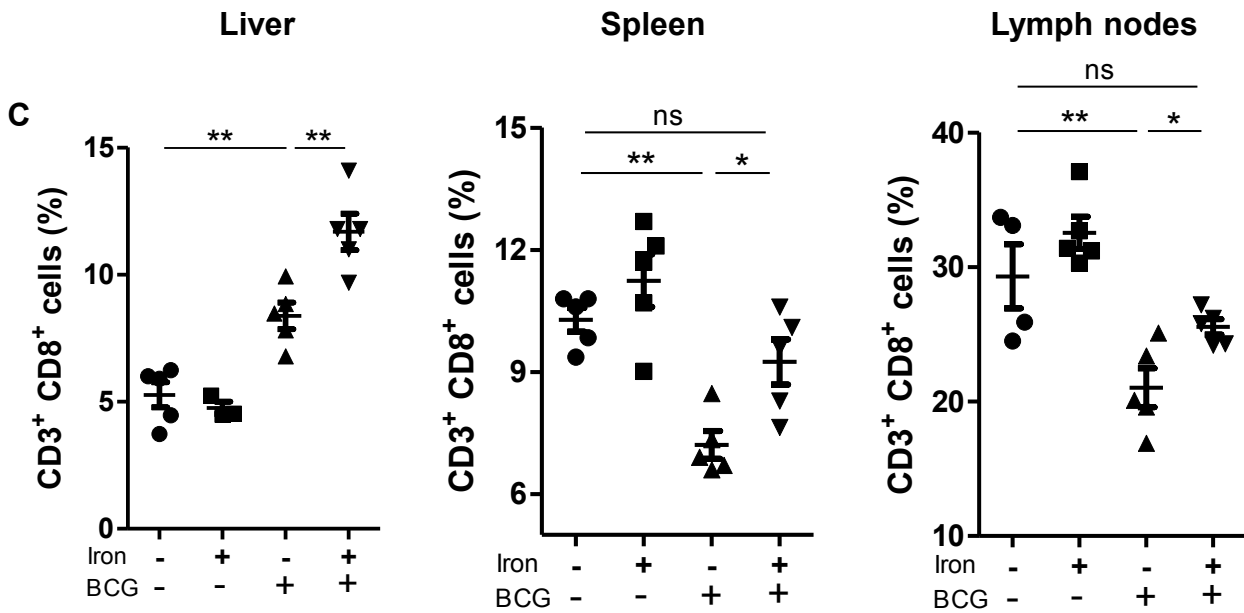


Figure 3. Modification of *M. bovis* BCG-induced mononuclear cell recruitment under iron-rich diet.

C57BL/6 mice were fed with normal or iron-rich diet for 4 weeks and then infected intravenously with *M. bovis* BCG as in Figure 1. On day 7 of infection, mononuclear cells were isolated from liver (A) and spleen (B) and Gr1^{high} CD11b⁺ and Gr1^{low} CD11b⁺ cell population frequency analysed by flow cytometry. CD3⁺ CD8⁺ T cell population was analysed in liver, spleen, and lymph nodes 63 days post *M. bovis* BCG infection by flow cytometry (C). Data are presented as mean \pm SEM (n = 5 mice per group). ns, not significant, *, p \leq 0.05; **, p \leq 0.01. D: Liver sections from all groups of mice were stained by haematoxylin and eosin for histopathological examination when granuloma are well formed 28 days post- *M. bovis* BCG infection.

Figure 3

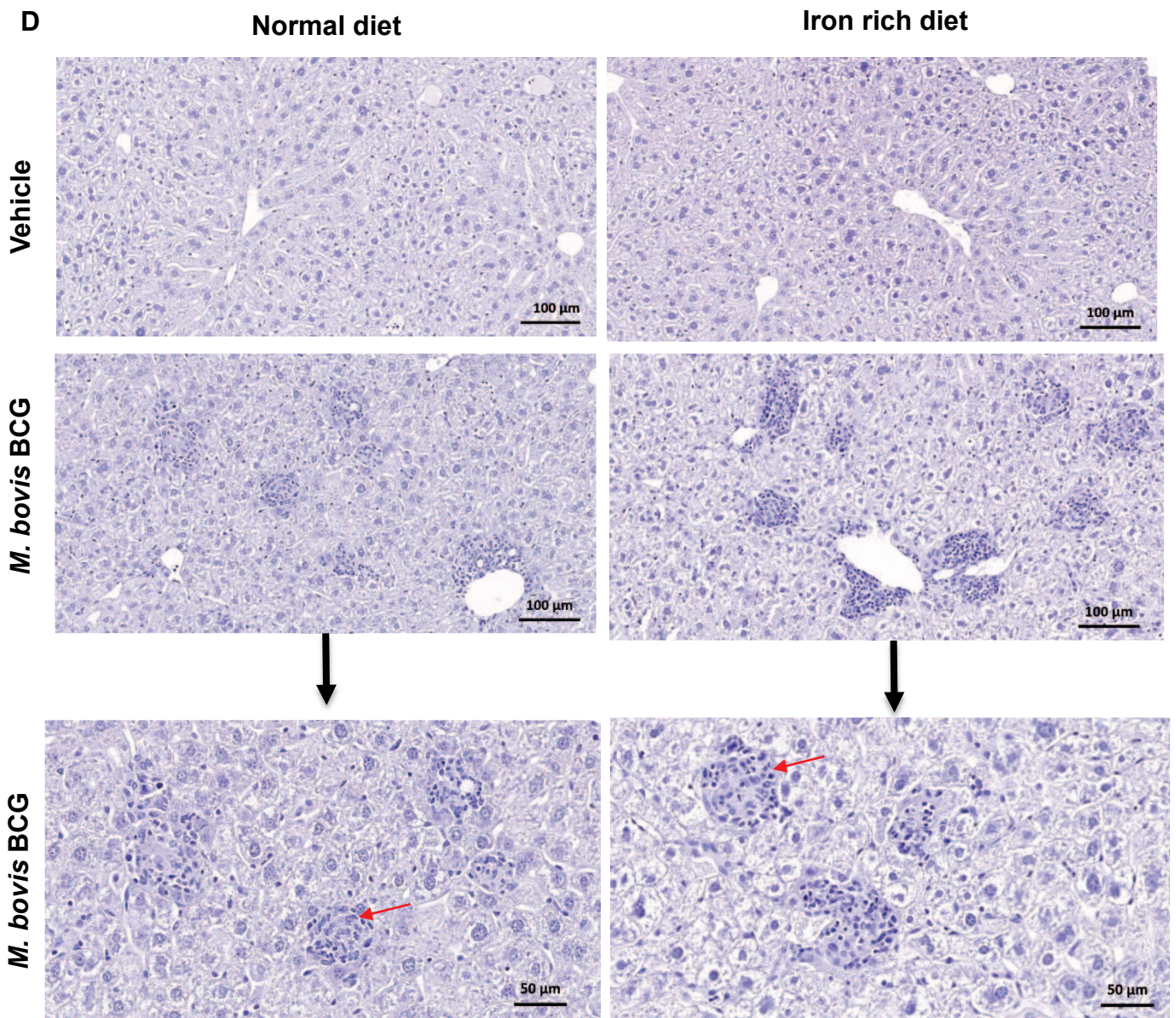


Figure 4

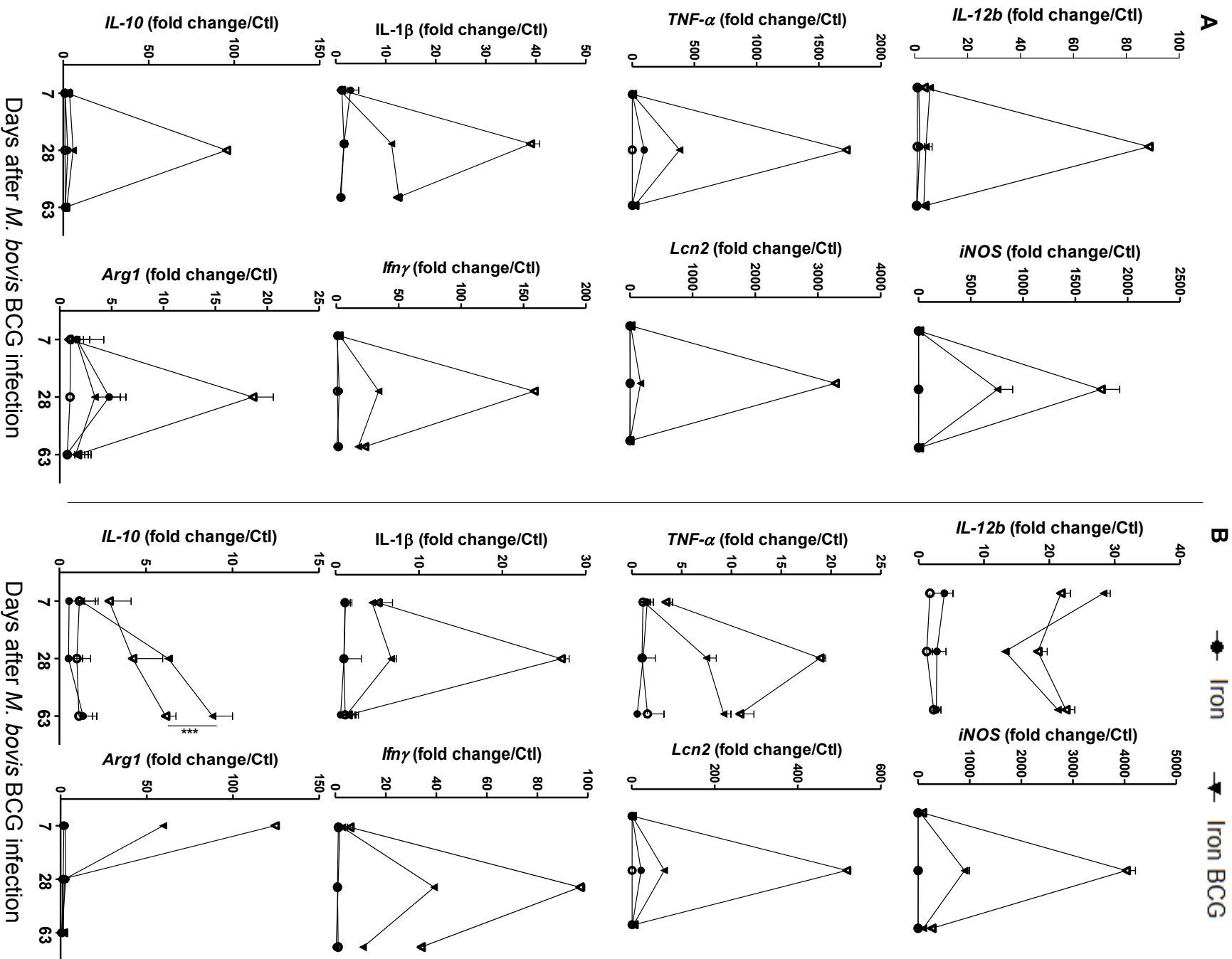


Figure 4

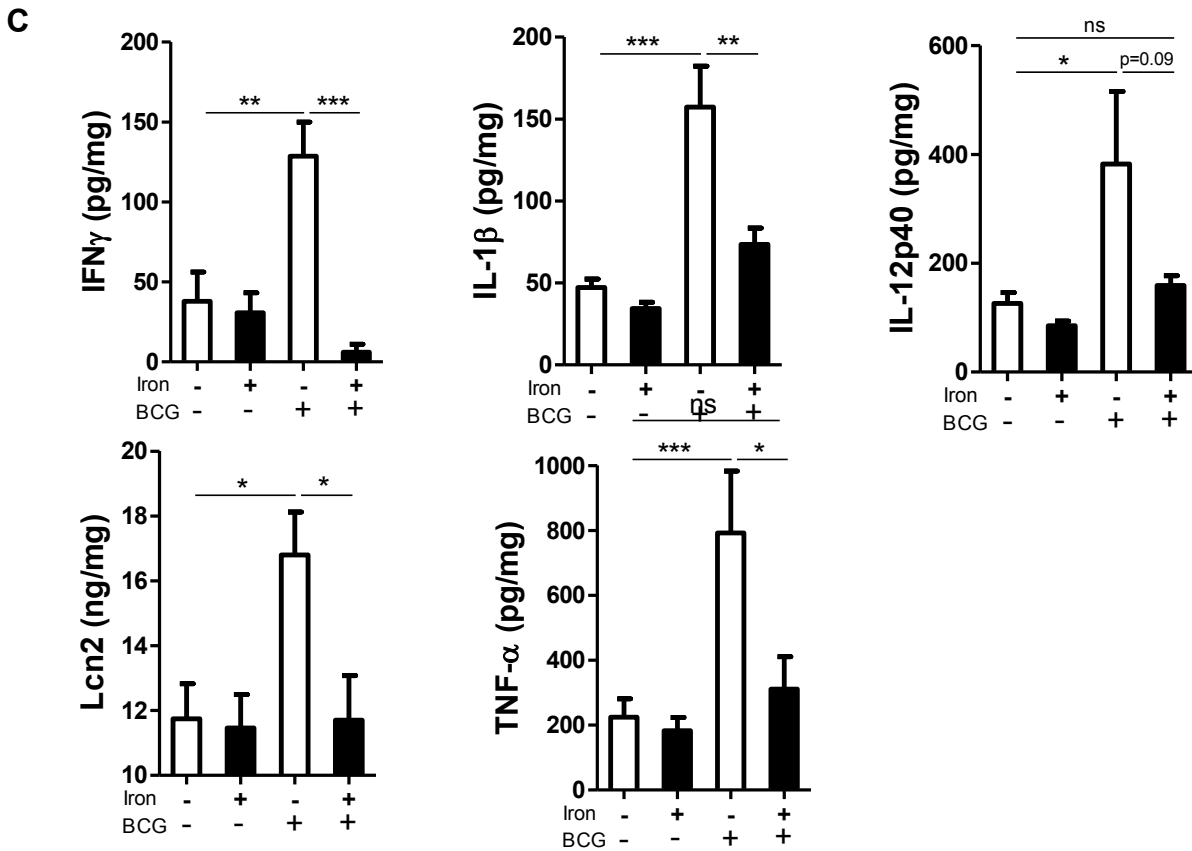


Figure 4. Iron-rich diet attenuates *M. bovis* BCG infection-induced expression of inflammatory mediators.

Mice were fed with normal or iron-rich diet for 4 weeks and then infected intravenously with *M. bovis* BCG (2×10^6 CFU per mouse). Liver (A) and lung (B) samples were collected at day 7, 28 and 63 post-infection for RNA extraction and analysis of gene expression by quantitative RT PCR. Fold change of *IL-12b*, *iNOS*, *TNF- α* , *Lcn2*, *IL-1 β* , *Ifn γ* , *IL-10* and *Arg1* was compared with the mean of uninfected mice on normal diet (open circle), uninfected mice fed iron-rich diet (full circle), infected mice on normal iron diet (open triangle) and infected mice on iron-rich diet (full triangle). Data are presented as mean \pm SD (n = 5 mice per group). C: Cytokine protein measurements in lung homogenates at day 28 were performed by ELISA. Data were normalised with lung homogenate protein concentrations obtained by Bradford assay and presented as mean \pm SEM. (n=5 mice per group). n s, not significant; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

Figure 5

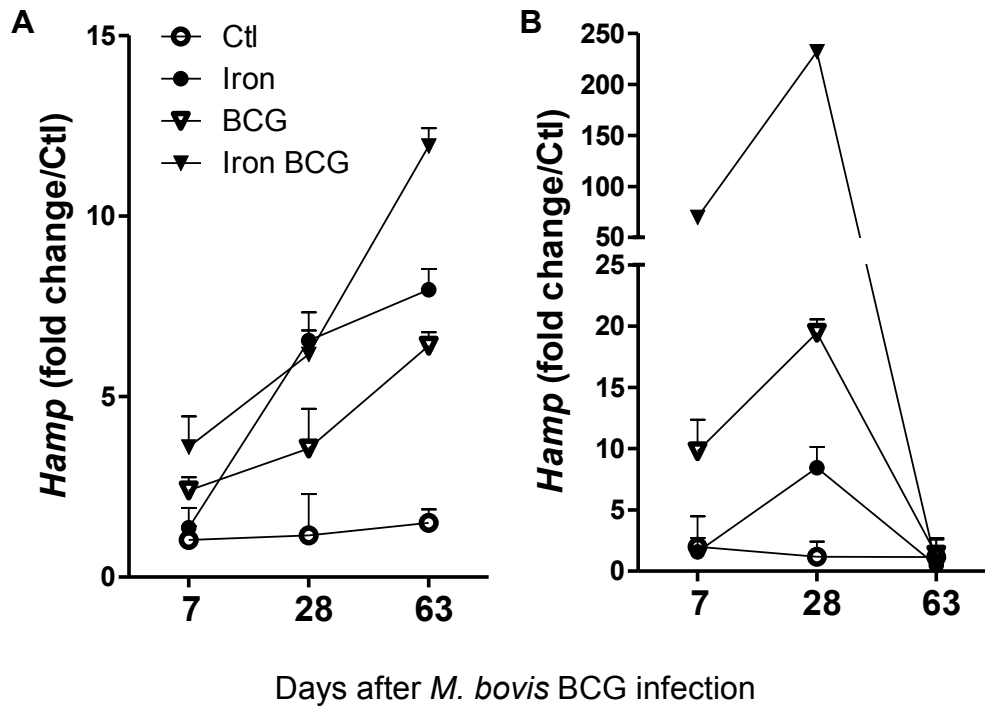


Figure 5. Iron-rich diet upregulates hepcidin expression upon *M. bovis* BCG infection.

Mice were fed with normal or iron-rich diet for 4 weeks and then inoculated intravenously with *M. bovis* BCG (2×10^6 CFU per mouse). Hepcidin (*Hamp*) mRNA expression was analysed on day 7, 28 and 63 post-infection in liver (A) and lung (B) by quantitative PCR analysis. Data are expressed as *Hamp* mRNA fold change relative to the mean of uninfected mice on normal diet (open circle), uninfected mice fed iron-rich diet (full circle), infected mice on normal iron diet (open triangle) and infected mice on iron-rich diet (full triangle). Data are presented as mean \pm SD. (n = 5 mice per group). n s, not significant; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

Figure 6

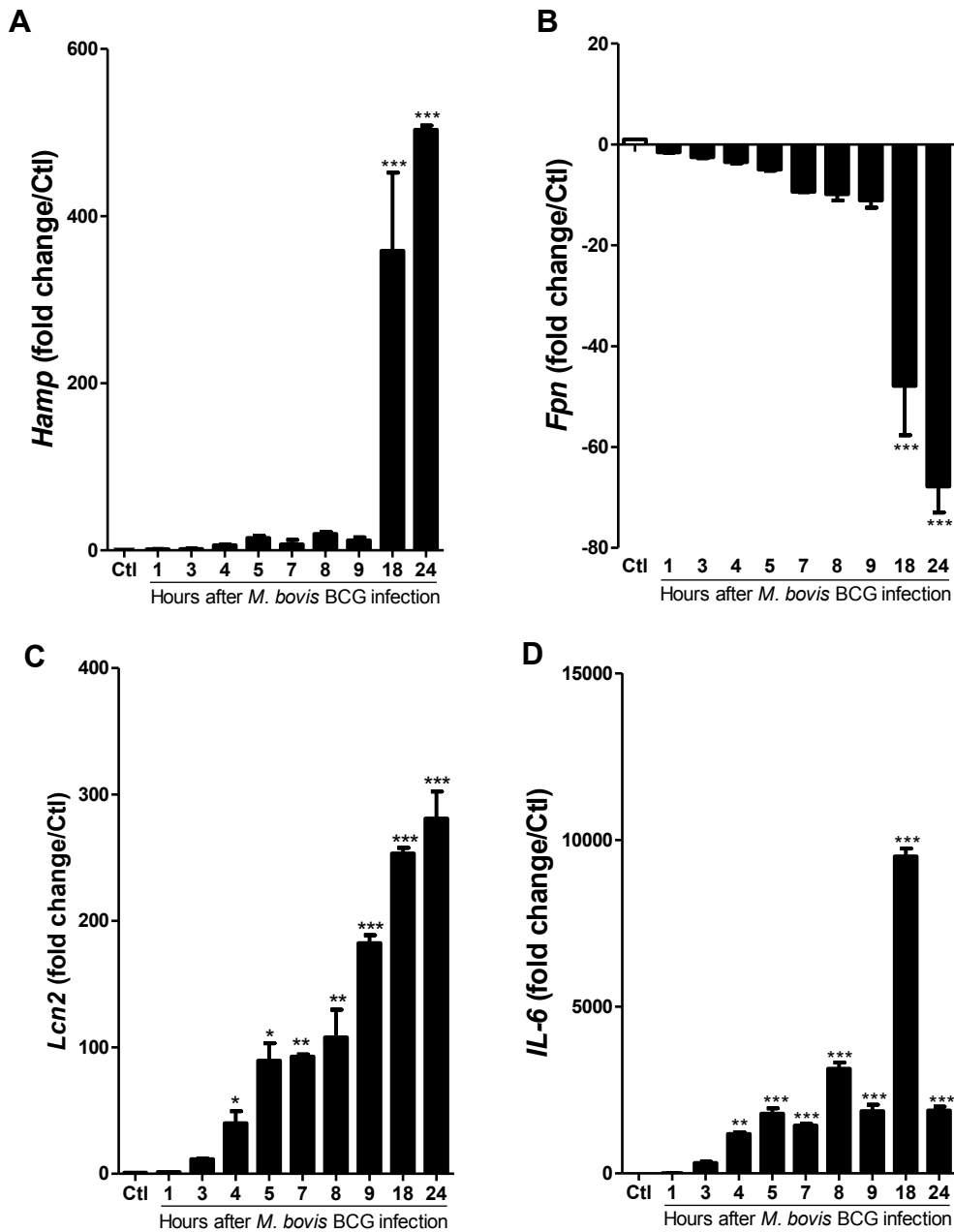


Figure 6. Regulation of iron metabolism associated genes after *M. bovis* BCG infection in macrophages *in vitro*.

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were infected with *M. bovis* BCG (MOI = 2) and hepcidin *Hamp* (A), ferroportin *Fpn* (B), Lipocalin 2 *Lcn2* (C) and *IL-6* (D) gene expression was assessed by qPCR at 1 – 24 hours post-infection. Data are normalized to *Gadph* gene expression as housekeeping gene and expressed as fold change relatively to untreated cells (Ctl). Data are pooled from two independent experiments and expressed as mean \pm SD (n=4). *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

Figure 7

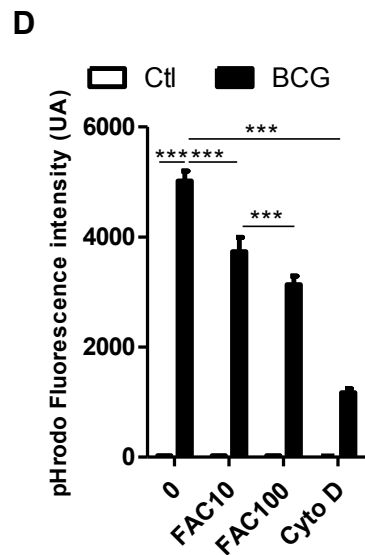
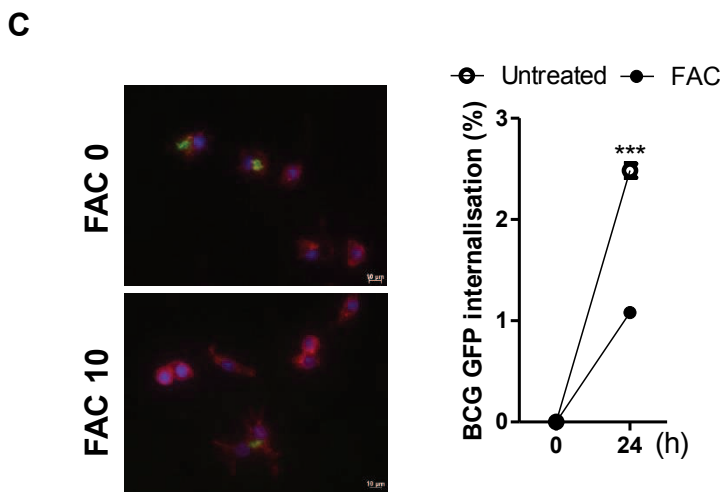
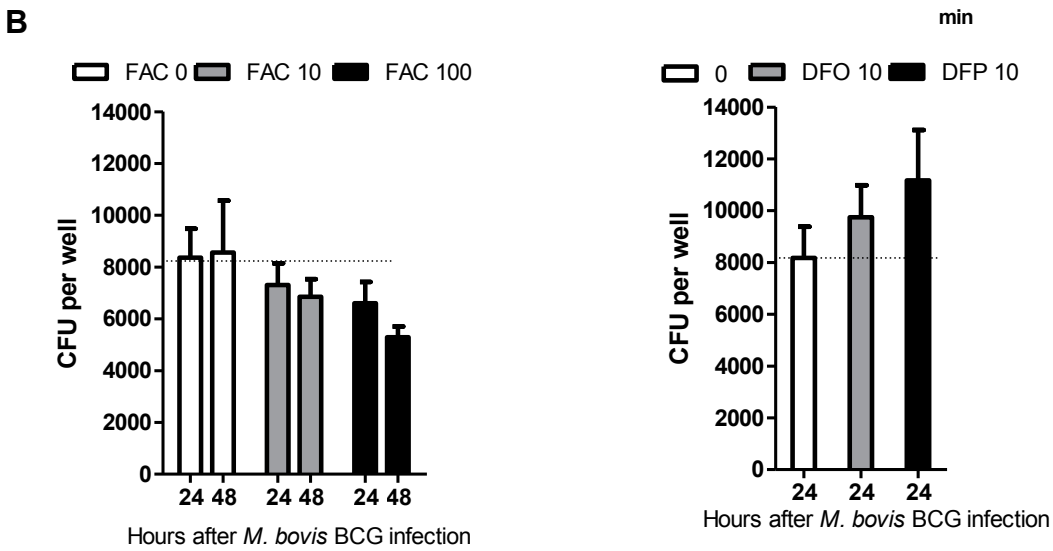
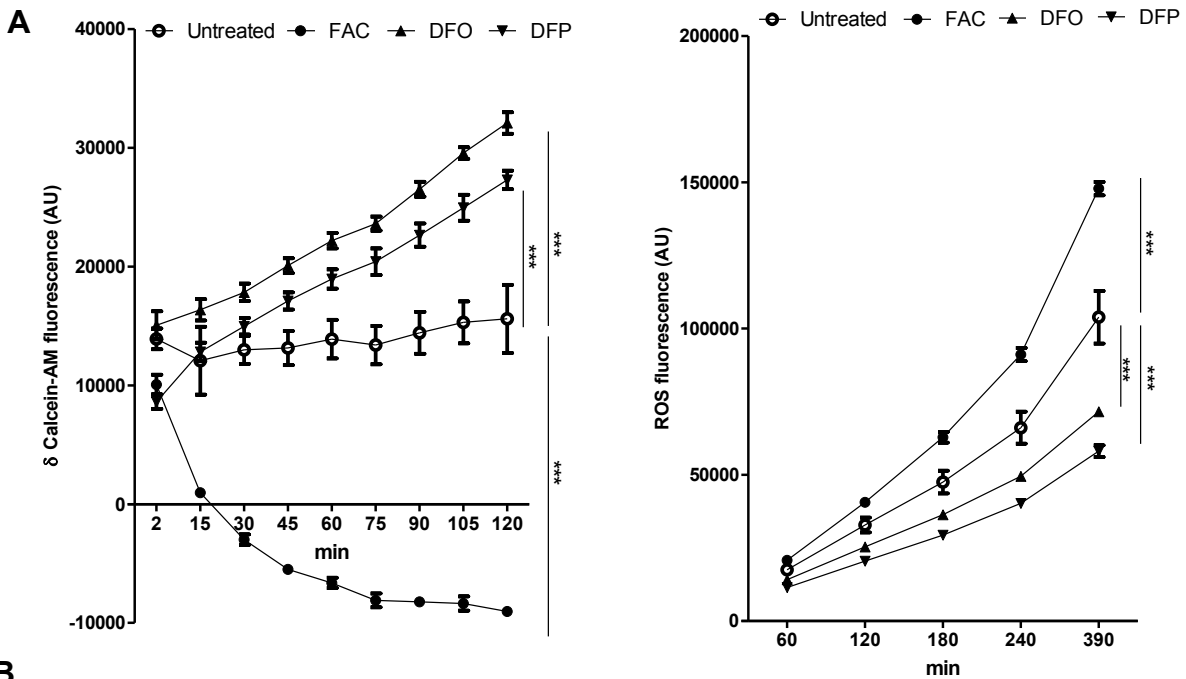
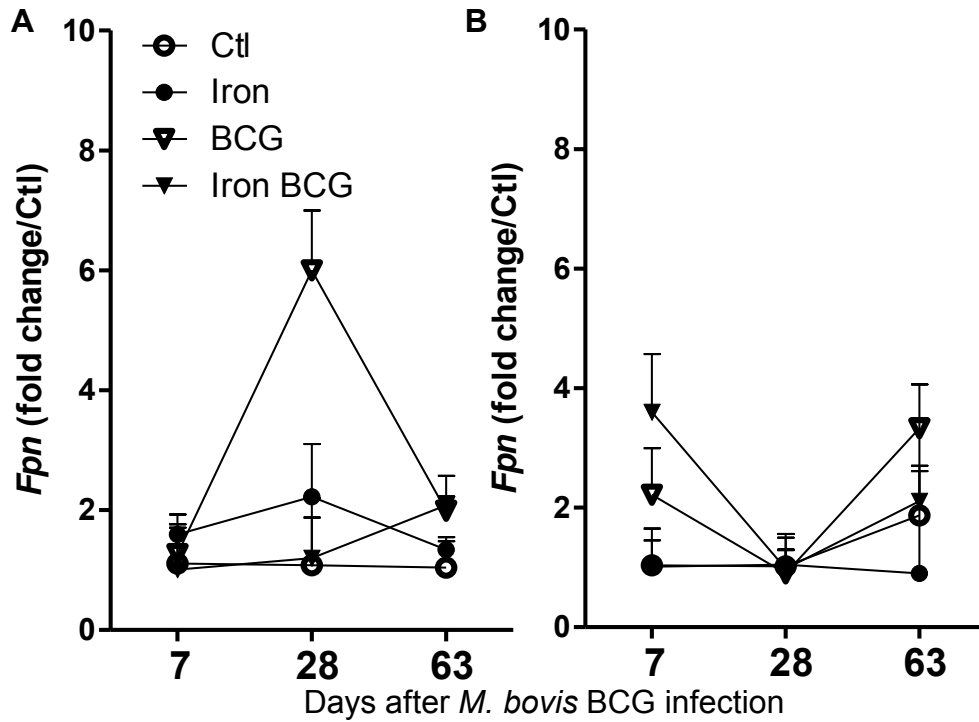


Figure 7. Intracellular unbound iron increases reactive oxygen species production impairing *M. bovis* BCG uptake and growth in primary macrophages.

Bone marrow-derived macrophages plated in 96 well microplate overnight were washed with PBS and treated with either calcein-AM (5 μ M) for iron free cell iron measurement or with H2DCFDA (5 μ M) for intracellular reactive oxygen species (ROS) assessment (**A**). Further, cells were treated with ferric ammonium citrate (FAC, 10 μ M), deferoxamine (DFO, 10 μ M) and deferiprone (DFP, 10 μ M). Thereafter fluorescence measurements were performed at different time points to determine the level of labile cell iron and intracellular ROS. For the bacterial viability assay (**B**), macrophages plated in 12 well microplate (0,5 \times 10⁶ cells/well) were treated with FAC (10 μ M or 100 μ M), DFO (10 μ M) or DFP (10 μ M) overnight. Cells were then infected with *M. bovis* BCG (MOI = 2) for 24 or 48 hours as indicated. Intracellular bacterial burden was determined by plating cell lysates on 7H11 agar plates. Data are representative of three independent experiments (n = 4) and presented as mean \pm SEM ^{***}, p \leq 0.001. *M. bovis* BCG internalisation (**C**) was assessed in BMDM plated in 48 well microplate overnight and infected with *M. bovis* BCG-GFP at MOI = 2 for 24 h. The cells were then washed carefully with PBS and stained with Wheat Germ Agglutinin (WGA) and 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI). BCG-GFP internalization was assessed by the percentage of GFP⁺ versus WGA⁺ total cell area using image J software. For internalisation assessment (**D**), BMDM were plated in 96 well microplate and treated with FAC (10 μ M or 100 μ M) overnight or 2 hours with cytochalasin D (Cyto D, 0,5 μ g/ml). Further, cells were treated with *M. bovis* BCG for 15 minutes. Intracellular pH was then assessed using pHrodo staining as a measure of phagocytosis. Data are representative of three independent experiments (n = 4) and presented as mean \pm SEM ^{***}, p \leq 0.001.

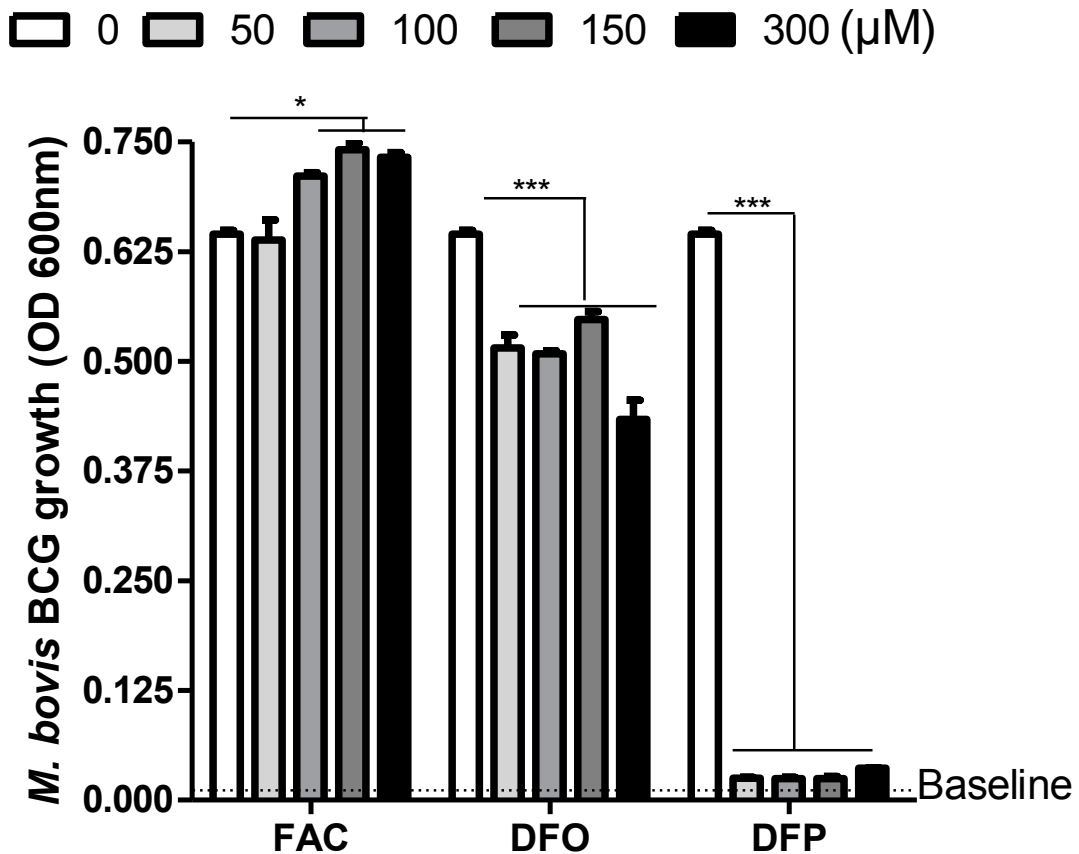
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: Mice ferroportin gene expression in response to *M. bovis* BCG with or without iron-rich diet

Mice were fed with normal or iron-rich diet for 4 weeks and inoculated intravenously with *M. bovis* BCG (2×10^6 CFU per mouse). Liver (A) and lung (B) ferroportin *Fpn* mRNA expression was determined by quantitative PCR analysis at 7, 28, 63 days post-infection. Data are expressed as *Fpn* mRNA fold change relative to the mean of uninfected mice on normal diet (open circle), uninfected mice fed iron-rich diet (full circle), infected mice on normal iron diet (open triangle) and infected mice on iron-rich diet (full triangle). Data are presented as mean \pm SD (n = 5 per group).

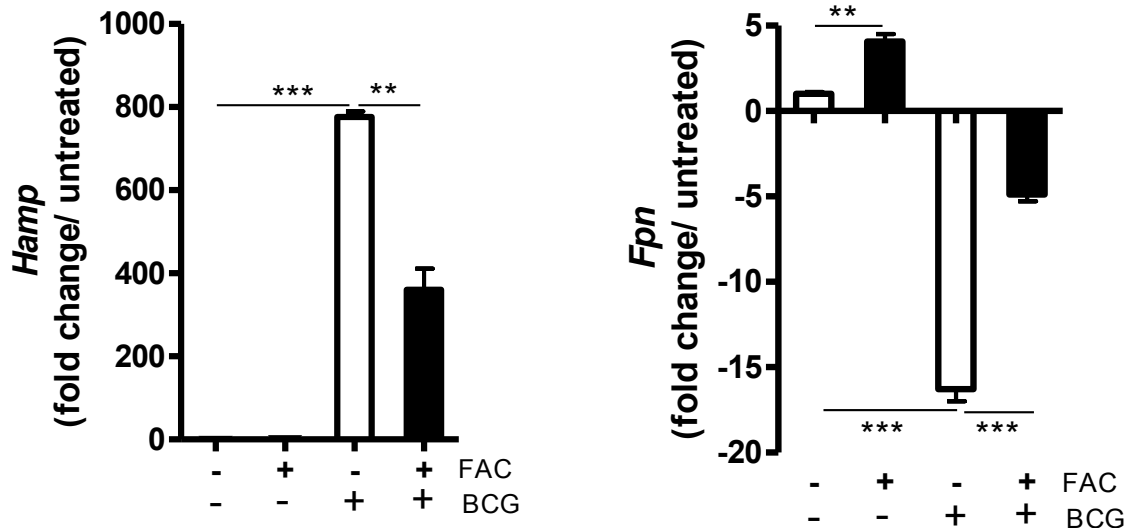
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2: *M. bovis* BCG growth in bacterial culture medium with iron or iron chelators

M. bovis BCG were grown in 7H9 medium supplemented with OADC during one week (baseline OD₀, dotted line). Thereafter ferric ammonium citrate (FAC), deferoxamine (DFO) and deferiprone (DFP) were added at the indicated concentrations (0 – 300 μM) to the complete medium, followed by a two week additional incubation. Bacterial growth was assessed by optical density measurement at 600 nm. Data are presented as mean ± SEM (n= 4). *, p≤ 0.05; ***, p≤ 0.001.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3: Iron loaded macrophages decreases hepcidin gene expression in response to *M. bovis* BCG

Bone marrow-derived macrophages were pre-incubated with ferric ammonium citrate (FAC, 10 μ M) overnight followed by *M. bovis* BCG (MOI = 2) infection for 24h. *Hepcidin* (*Hamp*) (A) and *ferroportin* (*Fpn*) (B) mRNA expression were determined using quantitative PCR analysis. Data are normalized to *Gadph* gene and presented as *Hamp* and *Fpn* fold change relative to their expression in untreated cells. Both figures are representative of two independent experiments and presented as mean \pm SD (n=4). **, p \leq 0.01; ***, p \leq 0.001.

Supplementary Table 1

Genes	Sequence	Reference
Hepcidin	5'- CCTATCTCCATCAACAGATG -3' 5'- TGCAACAGATACCACACTG -3'	Sigma
Ferroportin	5'-CTCTGTCAGCCTGCTGTTTG-3' 5'-TCAGGATTTGGGGCCAAGATG -3'	Sigma
Inhibin	QT00245259	Qiagen
Lipocalin 2	QT00113407	Qiagen
GADPH	QT01658692	Qiagen
IL-1β	QT01048355	Qiagen
TNF-α	QT00104006	Qiagen
IL-12b	QT00153643	Qiagen
iNOS	QT00100275	Qiagen
IL-10	QT00106169	Qiagen
IFN-γ	QT01038821	Qiagen
Arg1	QT00134288	Qiagen

V.4. La régulation de l'hepcidine est dépendante de MyD88 en réponse au fer

Article 4: MyD88 dependent regulation of hepcidin

Rafiou Agoro, Bernhard Ryffel, Valerie F. J. Quesniaux and Catherine Mura

Manuscrit en préparation

Le système immunitaire est stimulé par des diverses molécules, issues des microorganismes (PAMPs) pour induire une réaction inflammatoire dirigée contre ses agents infectieux, mais aussi par de signaux intrinsèques de danger (DAMPs), comme l'ATP, l'acide urique,.... Au niveau systémique ou local, de nombreuses molécules en excès dans l'organisme, sont ainsi susceptibles d'activer des voies de signalisation, afin que l'organisme se protège. Ces DAMPs activent en particulier les cytokines de la famille IL-1 (IL-1 β , IL-1 α , IL-33), et les voies de signalisation IL1 β /IL-1R1, IL33/ST2. Ces voies de signalisation chevauchent les voies de l'inflammation infectieuse et utilisent la molécule adaptatrice MyD88 comme de nombreux TLRs impliqués dans la réponse infectieuse.

L'excès de fer dans l'organisme pourrait représenter un signal de danger. L'objectif de cette partie des travaux était d'évaluer le rôle du fer dans ces mécanismes de signalisation en réponse aux signaux de danger. Pour évaluer cette hypothèse nous avons analysé l'implication des voies de signalisation impliquées dans la réponse à un signal de danger induit par le fer.

Nous avons ainsi soumis les souris sauvages ou déficientes pour différents gènes d'intérêts à un régime de surcharge en fer (25000 mg de fer carbonyle par kg d'aliments) pendant 3 jours et analyser la réponse de l'expression de l'hepcidine et de médiateurs inflammatoires. Un régime alimentaire très riche en fer, comme attendu, augmente l'expression d'hepcidine au niveau hépatique après trois jours chez les souris C57BL/6 sauvages. Nos expériences (manuscrit 4 en préparation) ont révélé une absence d'augmentation significative de l'expression de l'hepcidine chez les souris MyD88 KO soumises au même régime alimentaire enrichi en fer, alors que les souris TRIF KO répondent normalement. De plus le niveau d'expression de *Bmp6* en réponse au fer reste à un niveau basal comparativement aux souris de type sauvage. Cette absence d'expression de l'inducteur d'expression de l'hepcidine *Bmp6* en réponse à un régime alimentaire riche en fer pendant 3 jours serait donc à l'origine de l'absence de l'expression d'hepcidine chez les souris MyD88 KO. Nous avons aussi pu mettre

en évidence qu'en phase chronique (28 jours) de surcharge en fer, une accumulation plus élevée de fer au niveau hépatique chez les souris MyD88 KO que chez les souris de type sauvage.

MyD88 est une protéine adaptatrice des voies TLRs mais également des récepteurs de la famille de l'IL-1 comme l'IL-1R1 et le ST2. Nous avons aussi mis en évidence que les souris sauvages surexpriment significativement les cytokines de danger pro-inflammatoires comme l'IL-33 et l'IL-1 α en réponse au fer contrairement aux souris MyD88 KO. Les souris, IL-1R1 KO et ST2 KO surexpriment l'hepcidine en réponse au régime enrichi en fer, cependant le niveau d'expression de l'hepcidine est beaucoup plus élevé chez les souris ST2 KO comparé aux souris sauvages. Cette augmentation est corrélée avec une expression plus importante d'*Inhibin b* plus élevé chez les souris ST2 KO, inducteur de l'hepcidine surexprimé également avec l'inflammation (Besson-Fournier *et al.*, 2012).

MyD88 dependent regulation of hepcidin in response to iron overload

Manuscript in preparation

Rafiou Agoro^{a, b}, Bernhard Ryffel^{a, b}, Valerie F. J. Quesniaux^{a, b} and Catherine Mura^{a, b}

^a Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans, France; ^bUniversity of Orléans, Orléans, France

Corresponding author: Catherine Mura Address: UMR7355, 3B rue de la Ferrollerie 45071 Orléans, France ; Fax : +33 238 25 79 79 ; e mail : catherine.mura@cnr-orleans.fr

Abstract

A strong interaction has been evidenced between iron metabolism and inflammation. Iron has been shown to modify inflammation response. Here we investigated the role of MyD88 pathway during acute and chronic iron overload using genetically deficient mice. We show that the acute iron overload-induced *Hepcidin* together with *IL-1 α* and *IL-33* expression was absent in MyD88 KO mice. In addition acute iron overload-induced *Bmp6* expression was reduced in MyD88 KO mice compared to wild type mice. Furthermore, hepcidin expression was upregulated during chronic iron overload along with *Bmp6* and high expression of *Inhbb* in MyD88 KO mice. These results suggest an implication of MyD88 pathway on hepcidin gene expression in response to iron overload.

Keyword: Mice, Iron overload, MyD88, Hepcidin

Abbreviations: TLR, toll-like receptor; LPS, lipopolysaccharide; Hamp, hepcidin; Inhbb, inhibin b; Bmp6, bone morphogenetic protein; MyD88, Myeloid differentiation primary response gene 88, TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; IL-1R1 Interleukin 1 receptor 1; IL-1RL1 (ST2), Interleukin 1 receptor-like 1.

Acknowledgements: RA was supported by a fellowship from Ministère de la Recherche, France.

Material and methods

Mice and iron overload induction

C57BL/6 mice and mice deficient for MyD88 [1], TRIF [2], IL-1R1 [3] and ST2 (IL-1r1) [4] were bred in our animal facility at the Transgenose Institute (UPS44 TAAM CNRS, Orleans). All transgenic mice were on C57BL/6 genetic background. All animal experiments complied with the French Government's animal experiment regulations and were approved by the "Ethics Committee for Animal Experimentation of National Center for Scientific Research Campus Orleans" (CCO; N° CLE CCO 2012-047). For acute iron overload experiment, 8 weeks old mice were fed with high iron diet (25000 mg of iron carbonyl/kg of food) or standard iron diet (280 mg of iron carbonyl/kg of food) during three days. For chronic iron overload, 4 weeks old mice of C57/BL6 and MyD88 KO mice received the same treatment as before during 4 weeks.

Iron measurements

Hepatic and splenic iron concentration were measured by the ferrozine colorimetric method [5]. Briefly, samples were dried at 120°C over-night and equivalent weight (40-50 mg) of samples were dissolved in a mixture of sulfuric acid and nitric acid at a ratio of 1:1 and diluted in 1 mL of distilled water. Samples were treated with ferrozine solution (10 mM ferrozine /32.6 mM L-ascorbic acid /50 mM Tris HCl pH4) for one hour. The reaction was stopped by addition of 600 mM citric acid /25.6 mM thiourea and optical density (OD) measured at 560 nm.

Quantitative RT-PCR

Total RNA from tissue samples was isolated using TRI Reagent (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription of 1 µg of total RNA was performed with Promega synthesis system (Promega, Wisconsin, USA) in a total volume of 20 µL. The mRNA levels of selected genes were measured using QuantiTect SYBR Green PCR system (Qiagen, Hilden, Germany) and Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). All primers used in qRT-PCR for analysis were listed in table 1 (supplementary data table 1). The mRNA levels were normalized to the housekeeping gene *Gapdh* in the same RT sample and

relative transcript expression of genes was given as $\Delta C_t = C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ reference}}$. Fold change of genes expression compared with untreated mice was determined as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ treated}} - \Delta C_{t \text{ control}}$).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM), as indicated in the figure legends. Statistical evaluation of differences between the experimental groups were performed with GraphPrism software (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, California, USA). The parametric one-way ANOVA test with multiple comparison post hoc Bonferroni's test for pairwise comparisons was used to compare more than 2 groups and the Student's t-test was used to compare two groups. Significant levels were indicated as *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

Results

Acute response to iron rich diet induced IL-1 family alarmin IL-1 α and IL-33 and hepcidin through a MyD88 dependant mechanism

To investigate the molecular pathway of iron signaling, we fed C57BL/6 wild type and MyD88 or Trif deficient mice with iron replete and iron-rich diet during three days. Thereafter, we analyzed the pro-inflammatory gene expression in liver. We found that IL-1 α and IL-33 gene expression, but not IL-1 β or IL-6, were significantly induced in mice fed with iron rich diet at early stage. Interestingly the expression of alarmin IL-1 α and IL-33 was completely prevented in MyD88 deficient mice (**Fig 1 A - D**). Thus iron-induced IL-1 α and IL-33 in response to acute iron overload depend on MyD88 signaling pathway *in vivo*.

Further we found that *hepcidin (Hamp)* gene expression in acute response to iron rich diet was totally prevented in MyD88 KO mice whereas TRIF KO mice expressed partially *Hamp* expression in liver (**Fig 1 F**). *Hepcidin* gene upregulation occurs in result of iron induced-intracellular signaling pathway through BMP6/Smad1/5/8/4 and through the induction of activin B, a cytokine from TGF- β family encoded by *inhibin b*, or IL-6 in response to inflammation [6, 7]. As shown in figure 2 C, we observed *Bmp6* gene expression was induced with dietary iron [8] and that MyD88 KO mice failed completely to upregulate *Bmp6* expression in response to acute iron rich diet while TRIF KO mice expresses partially *Bmp6* gene expression. (**Fig. 1 G**). In addition (figure 1 E), the expression of *Inhibin* in acute response to iron rich diet was not significantly increased (**Fig 1 E**). Thus MyD88 signaling pathway was critical for *hepcidin* gene expression in response to acute iron.

Chronic response to iron rich diet Increased iron deposit in liver of MyD88 KO mice

Since *hepcidin* expression was abolished during acute iron response in MyD88 KO mice, we ask whether it resulted from a lack of iron overload in liver or a lack of response to iron loading. Thus we fed C57BL/6 wild type and MyD88 KO mice with iron replete as control and iron-rich diet during four weeks and then analyzed the iron stores, *hepcidin* expression and its inducers in liver. Interestingly, we found higher levels of iron deposition in the liver of MyD88 KO mice compared to C57BL/6

wild type. In addition, *hepcidin* expression was significantly higher in MyD88 KO mice compared to C57BL/6 wild type. Interestingly *Bmp6* expression was upregulated at the same level in MyD88 KO and C57BL/6 wild type mice while the expression of inflammatory parameter *Inhibin b* was expressed at higher level in MyD88 KO mice compared to C57BL/6 wild type mice in response to chronic iron. Thus the increase level of hepcidin expression in liver observed during chronic phase of iron overload might result from an increase of hepatic iron accumulation in MyD88 KO mice (**Fig 2**). Thus a delay on hepcidin expression should enhance iron accumulation in liver and thus modify hepcidin expression.

Acute iron overload-induced hepcidin expression was dramatically increased in ST2 deficient mice

We could evidence two steps in *hepcidin* response to iron rich diet, an early MyD88-dependent and a late MyD88-independent upregulation. We hypothesized that the increase expression of alarmin cytokines, IL-1 α and IL-33, during acute response to iron rich diet could be involved. Thereafter we analyzed the implication of IL-1R1 and ST2 receptors of IL-1 and IL-33 sharing the MyD88 protein for their intracellular signaling pathway on acute iron-induced *hepcidin* expression. The *hepcidin* expression in IL-1R1 KO remained at the same level in IL-1R1 KO and C57BL/6 wild type mice in acute response to iron rich diet (**Figure 3 A**). Interestingly, ST2 KO mice significantly upregulate *hepcidin* expression in response to acute iron iron rich diet in positive correlation with *Inhibin b* expression compared to wild type mice, whereas the *Bmp6* expression remained unchanged in both mice (**Figure 3 B, C**). Thus functional ST2 in mice was critical for the control of *hepcidin* expression and might depend on *Inhibin b*.

Authorship contributions

RA drafted and wrote the original manuscript, RA and CM. contributed to the investigations, data analysis and interpretation, RA and CM design the study, RA, BR, VQ and CM reviewed and provided comments on this manuscript, and approved the final version.

Conflicts of interest declaration

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
2. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
3. Labow, M., et al., *Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2452-61.
4. Townsend, M.J., et al., *T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses*. J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 1069-76.
5. Barry, M. and S. Sherlock, *Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy specimens*. Lancet, 1971. **1**(7690): p. 100-3.
6. 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.
7. Besson-Fournier, C., et al., *Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling*. Blood, 2012. **120**(2): p. 431-9.
8. Kautz, L., et al., *Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1503-9.

Figure 1

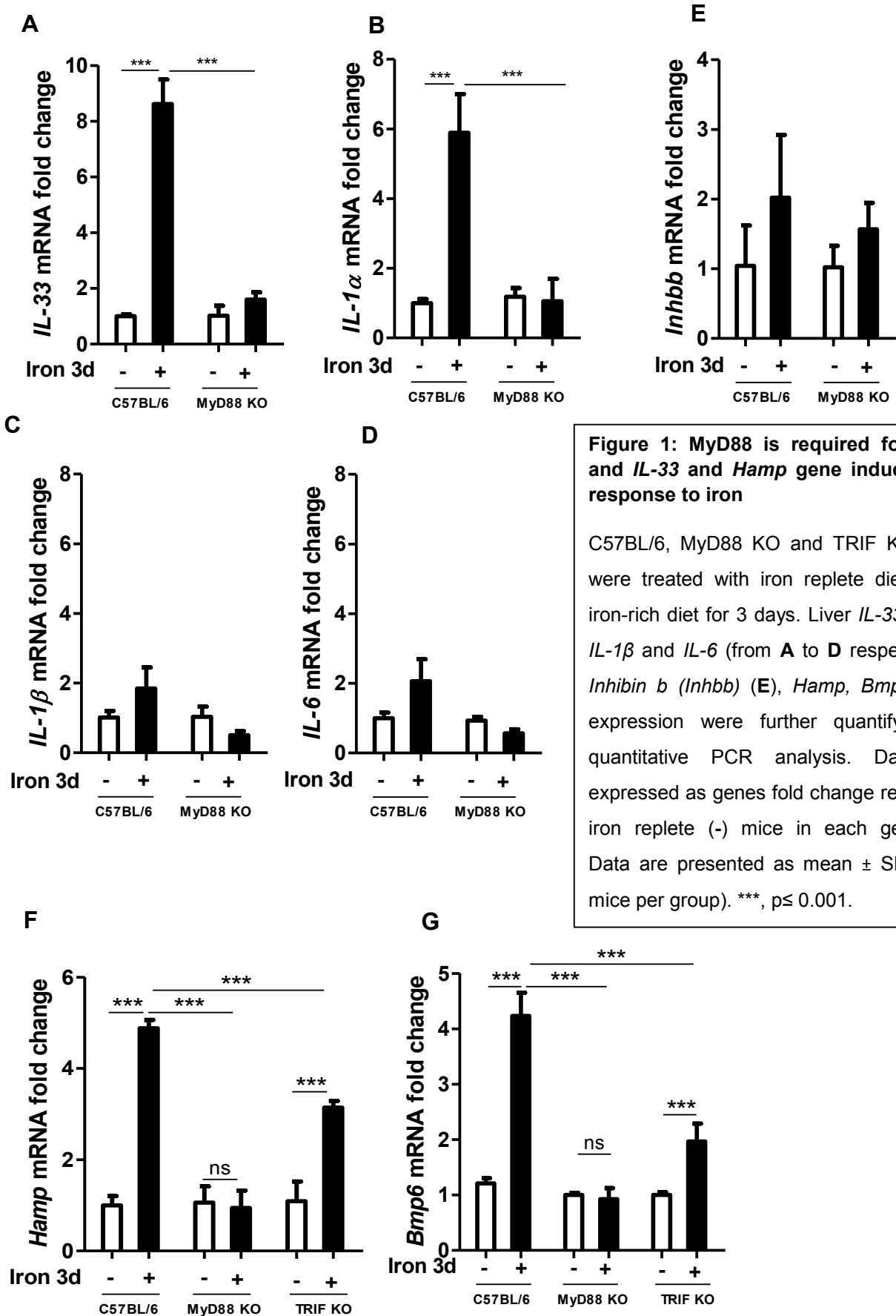


Figure 1: MyD88 is required for *IL-1 α* and *IL-33* and *Hamp* gene induction in response to iron

C57BL/6, MyD88 KO and TRIF KO mice were treated with iron replete diet (-) or iron-rich diet for 3 days. Liver *IL-33*, *IL-1 α* , *IL-1 β* and *IL-6* (from A to D respectively), *Inhibin b (Inhbb)* (E), *Hamp*, *Bmp6* gene expression were further quantify using quantitative PCR analysis. Data are expressed as genes fold change relative to iron replete (-) mice in each genotype. Data are presented as mean \pm SD (n= 6 mice per group). ***, $p \leq 0.001$.

Figure 2

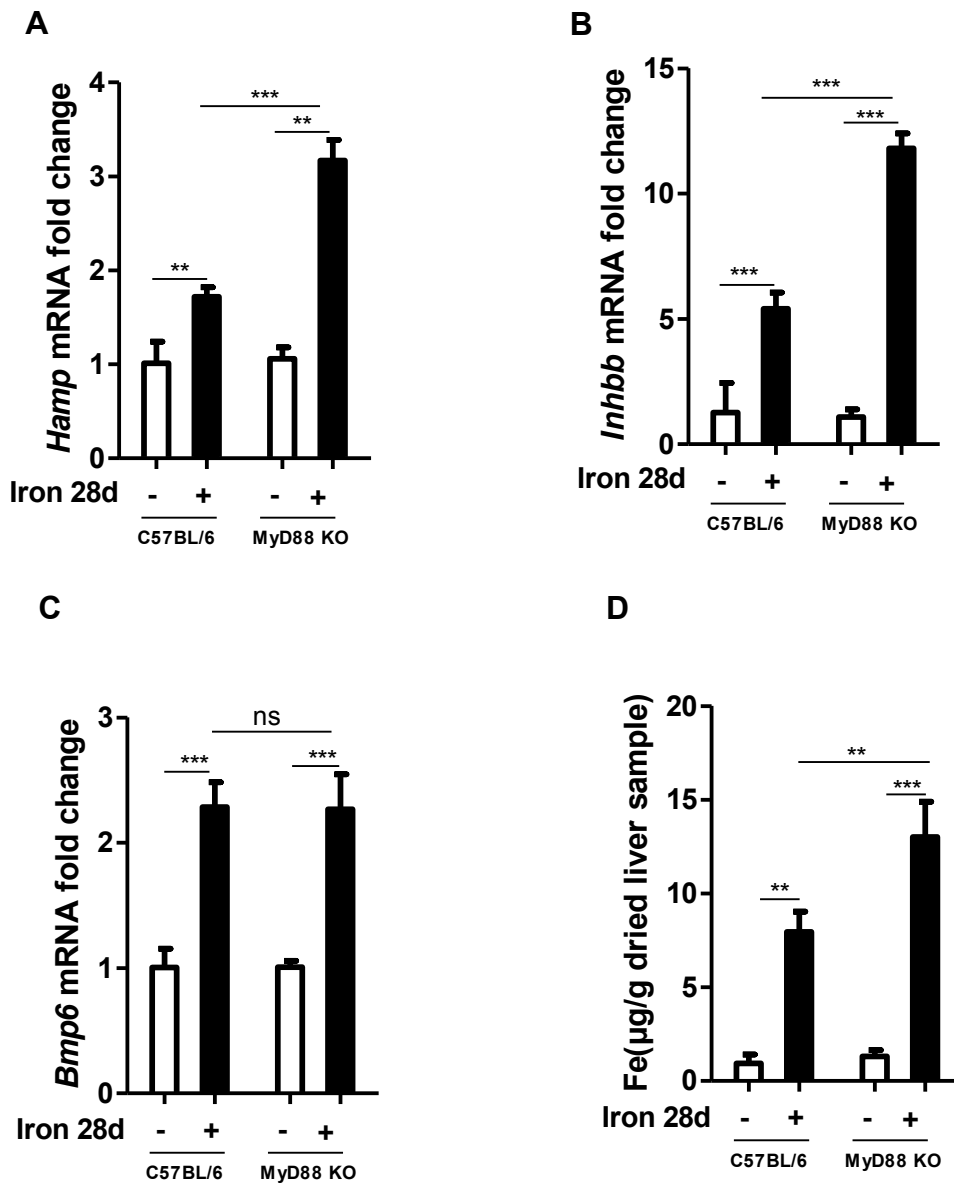


Figure 2: MyD88 KO mice upregulates hepcidin expression in response to chronic iron overload

C57BL/6 and MyD88 KO mice were treated with iron replete diet (-) or iron-rich diet for 28 days. Thereafter liver *Hamp*, *Bmp6* and *Inhbb* gene expression were then assessed using quantitative PCR analysis. Data are expressed as genes fold change relative to iron replete (-) mice in each genotype (A-C). Data are presented as mean \pm SD (n= 5 mice per group). n s, non significant; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. D: Iron content in liver was measured at that stage using ferrozine assay and presented as mean \pm SEM (n= 5 mice per group). **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

Figure 3

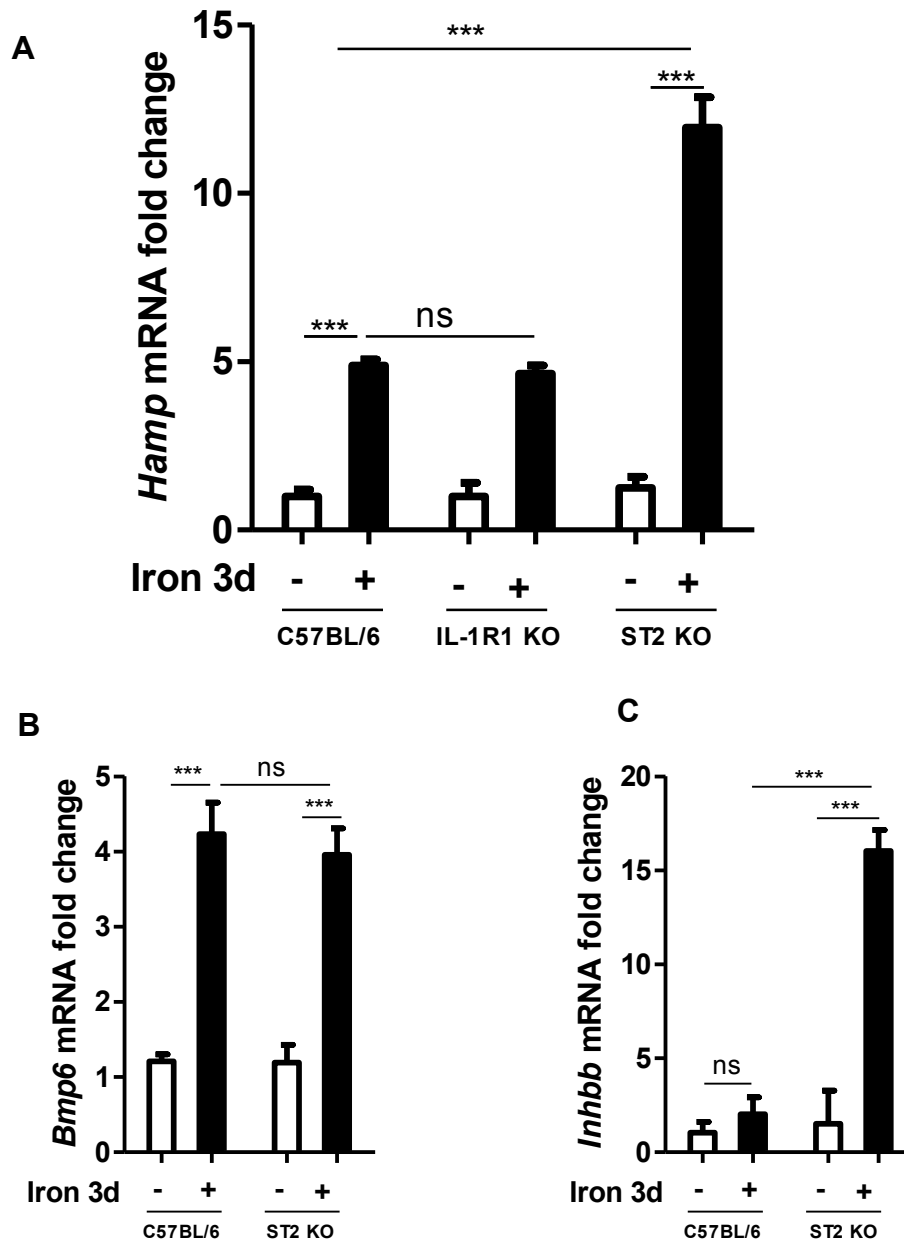


Figure 3: Genetic neutralization of ST2 mice increases iron-induced hepcidin expression

C57BL/6, IL-1R1 KO and ST2 KO mice were treated with iron replete (-) diet or iron-rich diet for 3 days. Thereafter liver *Hamp* (A) *Bmp6* (B) and *Inhbb* (C) gene expression were then assessed using quantitative PCR analysis. Data are expressed as genes fold change relative to iron replete (-) mice in each genotype. Data are presented as mean \pm SD (n= 5 mice per group). ***, p \leq 0.001.

Supplementary table

Genes	Sequence	Reference
Hepcidin	5'- CCTATCTCCATCAACAGATG -3'	Sigma
	5'- TGCAACAGATACCACACTG -3'	
Bmp6	5'-ATGGCAGGACTGGATCATT-3'	Sigma
	5'-CCATCACAGTAGTTGGCAG-3'	
Inhibin	QT00245259	Qiagen
IL-6	QT00098875	Qiagen
GADPH	QT01658692	Qiagen
IL-1 α	QT00113505	Qiagen
IL-1 β	QT01048355	Qiagen
IL-33	QT00135170	Qiagen

Chapitre 6 : Discussion générale

Mes travaux de thèse ont d'abord consisté à étudier les interactions entre l'homéostasie du fer et la réaction inflammatoire d'un point de vue fondamental. Les voies de signalisation de l'inflammation, et l'influence de l'inflammation sur la réponse hepcidine et ferroportine ont été analysées dans les macrophages, en particulier. Inversement l'influence du fer sur la réponse inflammatoire a aussi été étudiée. Finalement, l'effet du fer sur la réponse immunitaire induite par *Mycobacterium bovis* BCG a été analysé.

Les voies d'activation de l'inflammation sont diverses, et peu d'études se sont intéressées aux voies de signalisation intracellulaires en rapport avec le profil phénotypique des macrophages qui modifient l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine. L'étude menée sur les voies de signalisation du contrôle de l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine dans les macrophages indique que la régulation positive de l'hepcidine et la régulation négative de la ferroportine au cours de l'inflammation répondent à des mécanismes de signalisations cellulaires opposés. Il apparaît clairement que le contrôle de l'expression différentielle de ces deux acteurs importants de l'homéostasie du fer est lié aux voies d'activation de l'inflammation et de la polarisation des macrophages. Ainsi les TLRs connus pour leur effet de polarisation M1 (TLR3, TLR7, TLR7/8 et TLR9) régulent positivement l'expression d'hepcidine dans les macrophages, mais n'induisent pas de réponse au niveau de l'expression de la ferroportine. A l'inverse, le ligand de TLR2 qui polarise les macrophages en sous-type M2 induit une forte diminution de l'expression de la ferroportine et ne modifie que peu l'expression de l'hepcidine, comme précédemment décrit (Guida *et al.*, 2015). L'activation du TLR4 induit une polarisation M1 précoce, puis une polarisation M2 tardive pour la résolution de la réaction pro-inflammatoire. L'utilisation de cytokines a montré qu'un environnement cytokinique pro-M1 (IFN- γ) augmente le niveau d'expression d'hepcidine en réponse aux différents ligands de TLRs, excepté pour celui de TLR2. Au contraire, un environnement pro-M2 obtenu grâce à un prétraitement des macrophages avec l'IL-4, le TGF- β , le TNF- α et l'IL-1 β atténue la transcription de l'hepcidine en réponse au LPS, et certaines cytokines comme le TNF- α et l'IL-1 β jouant un rôle en particulier sur la résolution de l'inflammation induisent une forte diminution de l'expression de la ferroportine. La régulation positive de l'hepcidine est influencée par les facteurs pro-inflammatoires M1 tandis que la régulation négative de la

ferroportine est associée à des sous-types de macrophages M2. L'analyse des voies de signalisation intracellulaires à l'aide d'inhibiteurs spécifiques a démontré que la PI3K, impliquée dans l'orientation du phénotype des macrophages en un profil M2, et qui intervient aussi bien sur les voies intracellulaires médiées par les ligands de TLR2 et TLR4, joue un rôle fondamental pour la régulation différentielle de l'hepcidine et de la ferroportine (**Figure 26**). La neutralisation de la voie PI3K, qui oriente donc la réponse inflammatoire vers un profil macrophagique M1, induit une expression de l'hepcidine en réponse au ligand TLR2 et augmente le taux de réponse au ligand TLR4, corrélée à une neutralisation de l'effet répressur de la ferroportine. Les voies de signalisations p38 MAPK, JNK et NF- κ B p65/p50, impliquées aussi dans la polarisation M1, jouent un rôle positif sur la transcription de l'hepcidine, et négatif sur celle de la ferroportine. Ainsi nous démontrons qu'un statut inflammatoire différentiel des macrophages est associé à l'expression des marqueurs impliqués dans l'homéostasie du fer comme l'hepcidine et la ferroportine.

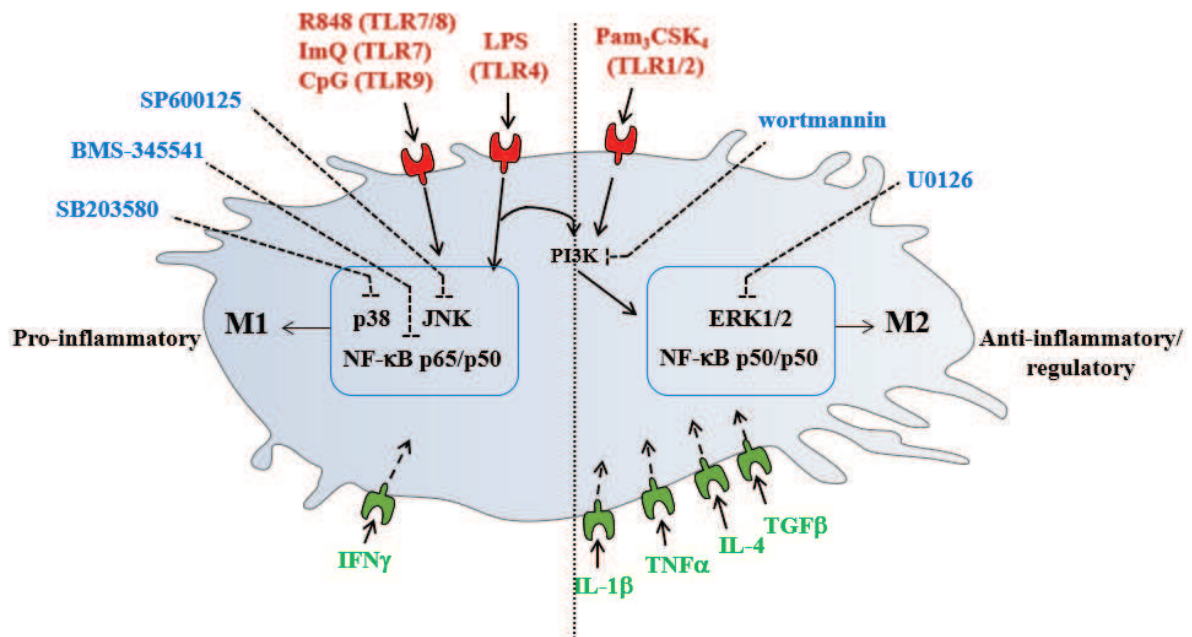


Figure 26: Schéma résumant les stimuli et les inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaires décrits dans l'article 1.

Les TLRs et les cytokines modulent les macrophages en M1 et M2. Les stimuli des M1 comme LPS, R848, ImQ, CpG induisent une signalisation par l'intermédiaire de TLR4, 7, 8, and 9 suivie d'une activation de p38, JNK et NF- κ B p65/p50 induisant ainsi la transcription des gènes M1. Les stimuli M2 comme Pam₃CSK₄ induisent une signalisation par TLR1/2 et le TLR4 tardif régulant les gènes M2 via PI3K, ERK1/2 et NF- κ B p50/p50. Un priming des macrophages par des cytokines (IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL4, TGF β) module la polarisation des macrophages et la réponse induite par l'activation des TLRs. Les molécules wortmannin, SP600125, BMS-345541, SB203580, U0126 inhibent spécifiquement PI3K, JNK, NF- κ B p65/p50, p38 et ERK1/2, respectivement (Agoro and Mura, 2016).

La polarisation des macrophages est associée au métabolisme intracellulaire et l'orientation métabolique (comme la glycolyse, la glutaminolyse, ...) est largement déterminée par la voie PI3K-Akt-mTOR (Covarrubias *et al.*, 2015). L'association du métabolisme des acides aminés avec la polarisation des macrophages a été démontrée. En effet le métabolisme de L-Arginine est effectué dans les macrophages par deux enzymes spécifiques : l'oxyde nitrique synthase 2 (NOS2) et l'arginase 1. La NOS2 catabolise l'arginine pour libérer le monoxyde d'azote et la L-citrulline. Quant à l'arginase, elle métabolise l'arginine en ornithine et urée. Les macrophages M1 sont caractérisés par une expression de NOS2 et une production de NO, qui est un effecteur primordial pour des activités microbicides des macrophages. Parallèlement les macrophages murins M2 expriment des niveaux élevés d'arginase 1 induisant la production des polyamines comme l'ornithine nécessaire à la synthèse du collagène, à la prolifération cellulaire et au remodelage des tissus **Figure 27**.

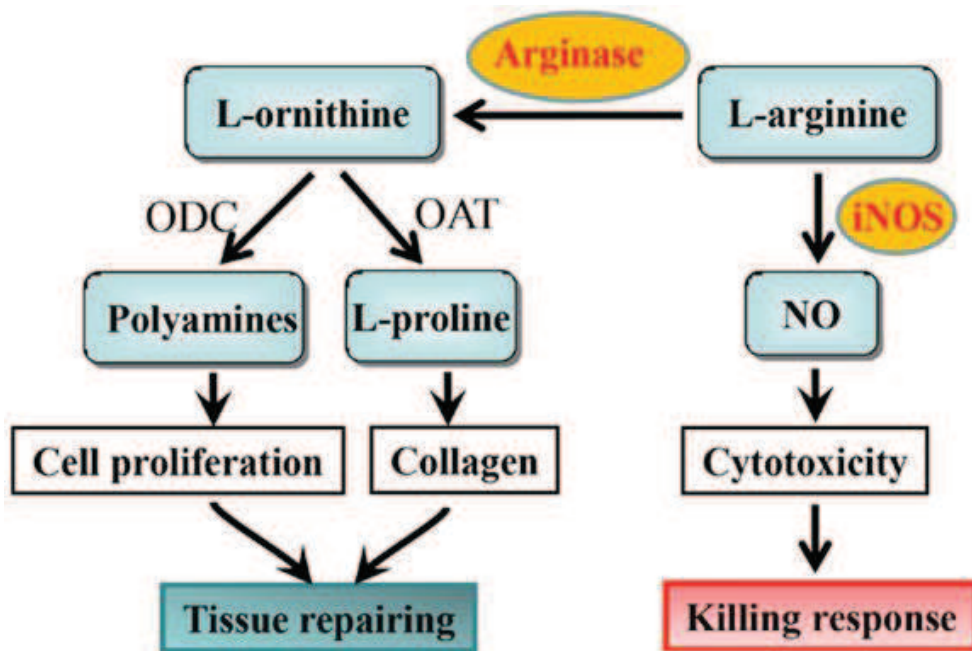


Figure 27 : Conséquences fonctionnelles du métabolisme de la L-arginine.

L'arginine est métabolisée par l'enzyme iNOS pour synthétiser le monoxyde d'azote (NO) ayant des activités bactéricides. Le métabolisme de l'arginine par l'arginase conduit à la L-ornithine qui peut également produire la L-proline et les polyamines par l'intermédiaire de OAT (ornithine aminotransférase) et ODC (ornithine décarboxylase) respectivement. Les polyamines et la L-proline ont des activités orientées vers une réparation tissulaire.

Les macrophages M1 induisent un programme glycolytique qui résulte en la production du lactate et des niveaux accrus d'intermédiaires du cycle de Krebs. Ainsi, les macrophages stimulés avec de l'IFN- γ ont un métabolisme glucidique qui devient réduit contrairement à une stimulation avec de l'IL-4 qui n'induit aucun effet significatif en termes de métabolisme glucidique. Une augmentation de la glycolyse dans les macrophages M1 est un mécanisme de

défense visant à élever l'activité microbicide des macrophages permettant leur survie dans un milieu hypoxique comme le granulome durant une infection mycobactérienne (Biswas and Mantovani, 2012). Les conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie glycolytique sont la production des espèces réactives oxygénées et du monoxyde d'azote NO, et l'inflammation qui est déclenchée par l'intermédiaire de la production des cytokines. Le facteur de transcription HIF1 α est aussi activé et peut générer également la production des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 28**). Dans ce contexte de macrophages polarisés M1, la surexpression de l'hepcidine, telle que nous la mettons en évidence dans nos expériences, est bien corrélée à son rôle de défensine et d'hormone conduisant à une séquestration du fer, du moins localement, et qui concourent à une défense contre les microorganismes pathogènes.

Les macrophages M2 conduisent à un programme métabolique incluant la chaîne de transport d'électron parmi lesquels la β -oxydation des acides gras, qui est orchestrée par l'intermédiaire de STAT6 et des PPAR (**Figure 28**). Ces macrophages polarisés M2 répondent à un environnement différent des macrophages M1, mais peuvent être induits par des ligands dérivés de microorganismes, comme ceux activant TLR2. Ainsi, ce profil de macrophages M2 particulier qui induit une forte diminution de l'expression de la ferroportine, permettrait tout de même indépendamment de l'hepcidine d'enclencher une réaction de défense basée sur une séquestration locale du fer.

Les mécanismes de la régulation négative de la transcription de la ferroportine par l'inflammation restent encore méconnus. Des pistes sur une implication du facteur de transcription IRF1 ont été évoquées dans notre laboratoire. Ainsi nous avons remarqué que le facteur IRF1/2, pour lequel un site de liaison est présent dans la région 5' du gène de la ferroportine, était impliqué dans la régulation de la transcription de la ferroportine en réponse au LPS (données non publiés). La réponse au LPS est largement modifiée *in vitro* avec l'utilisation de siRNA et dans les macrophages de souris IRF1 KO.

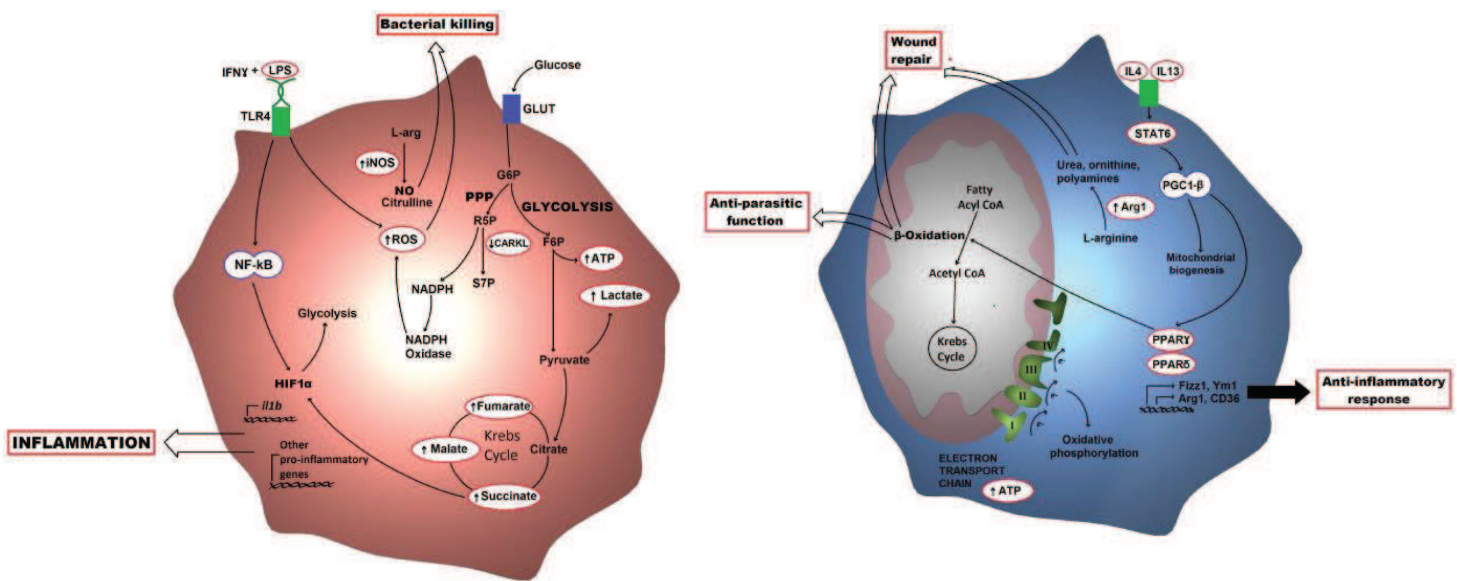


Figure 28: Profile métabolique des macrophages M1 (gauche) et M2 (droite)

G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; R5P, ribulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulosephosphate; NO, nitricoxide; ROS, reactive-oxygen species (Galvan-Pena and O'Neill, 2014).

Nos études ont permis d'évaluer et de mieux comprendre l'influence de chaque ligand TLR dans l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine. Nous mettons en avant des niveaux de régulation variables en fonction des TLR et confirmons qu'une stimulation des TLR2 des macrophages n'induit pas l'expression d'hepcidine mais réduit fortement celle de la ferroportine. Ceci confirme la présence des voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'hypoferremie indépendamment de l'hepcidine comme l'ont précisé récemment les travaux de Guida *et al* (Guida *et al.*, 2015). L'ensemble de nos résultats indiquent que les voies de polarisation des macrophages jouent un rôle primordial dans la régulation différentielle de l'hepcidine et de la ferroportine. Nos données peuvent aider à comprendre les interactions entre les microorganismes et la modulation de l'homéostasie du fer. Les analyses ont été réalisées avec des ligands spécifiques de TLR, les microorganismes présentant différents PAMPs simultanément, ainsi *in vivo* les macrophages peuvent présenter différents profils d'activation, et c'est donc une population hétérogène de cellules qui gère la réponse immune innée. La surexpression de l'hepcidine et la réduction de l'expression de la ferroportine dans les macrophages a aussi été décrite en réponse à l'infection (Layoun and Santos, 2012; Peyssonnaud *et al.*, 2006; Sow *et al.*, 2009).

Les résultats acquis au cours de ces travaux ont aussi montré l'influence du fer sur la polarisation des macrophages. Comme nous l'avons présenté dans l'article 2, une investigation plus approfondie des paramètres impliqués dans l'homéostasie du fer et la réponse immune a été effectuée sur les macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse. En condition d'augmentation de taux de fer intracellulaire, nous avons observé une augmentation de l'expression de la ferroportine. Néanmoins, l'expression de l'hepcidine reste inchangée en réponse au fer seul dans les macrophages. De plus, aucune surexpression de Bmp6 dans les macrophages suite à un traitement avec le fer n'a été détectée, ce qui pourrait expliquer l'absence de surexpression de l'hepcidine. En effet, une étude comparative des différentes cellules hépatiques en termes d'expression de l'hepcidine et de Bmp6 (Rausa *et al.*, 2015) a montré que les hépatocytes à l'état basal sont les principales cellules qui surexpriment l'hepcidine au niveau du foie par rapport aux macrophages (cellules de Kupffer) et les cellules endothéliales sinusoidales. L'étude démontre que l'expression de Bmp6, l'inducteur principal de l'hepcidine en réponse au fer chez les souris est fortement exprimé par les cellules endothéliales. Comme nous l'avons démontré dans l'article 1, un traitement des macrophages par le LPS induit rapidement l'expression des molécules inflammatoires comme l'IL-6, et de l'inhibine b nécessaire à une expression élevée tardive d'hepcidine, alors qu'un traitement des macrophages

avec le fer seul n'induit pas d'expression de Bmp6, ni de marqueurs inflammatoires comme l'inhibine b ou l'IL-6 résultant d'une absence d'expression d'hepcidine.

Au cours de nos expériences nous avons noté qu'une augmentation du taux de fer cellulaire entraîne une modification du phénotype des macrophages caractérisée par une réduction de l'expression de CD86 et CMHII, marqueurs de surface des macrophages de type M1. L'activation des macrophages par l'IFN- γ est réduite en condition de surcharge en fer. De plus l'augmentation du taux de fer intracellulaire que nous avons décrit dans l'article 2 est corrélée avec une augmentation des espèces réactives oxygénées, qui sont nécessaires à l'induction de la transcription de la ferroportine par le biais du facteur Nrf2 (Kandola *et al.*, 2015). Cependant, *in vitro*, une stimulation des macrophages primaires par le fer à une concentration de 50 μ M et 100 μ M pendant 24 h n'induit pas une augmentation de l'activité arginase, marqueur du sous type de macrophage M2 anti-inflammatoire. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le fer a un effet sur la polarisation d'un sous type M2 de macrophages.

Les métabolismes intrinsèques comme celui du glucose, des acides aminés sont impliqués dans la polarisation des macrophages (Biswas and Mantovani, 2012), nos résultats suggèrent que celui du fer joue aussi un rôle primordial dans le phénotype des macrophages. En effet les macrophages sont impliqués dans l'homéostasie du fer en assurant le recyclage des macrophages issus des globules rouges sénescents et le stockage du fer par l'intermédiaire de la ferritine. La polarisation des macrophages murins et humains est associée avec des régulations différentes du métabolisme du fer (Cairo *et al.*, 2011). Les macrophages activés par l'IL-4 expriment fortement le CD163 nécessaire pour l'internalisation de l'hème, ce qui est corrélé avec une augmentation du niveau de l'hème oxygénase 1 qui participe à la dégradation de l'hème. Les macrophages M2 expriment également la ferroportine d'une manière très importante assurant l'export du fer. Contrairement aux macrophages activés par de l'IL-4, les macrophages activés par de l'IFN- γ montrent un phénotype CD163^{low} Ferroportin^{low} et Ferritin^{high} (**Figure 17**) (Cairo *et al.*, 2011; Corna *et al.*, 2010).

En 2010, Kadl *et al* ont identifié un nouveau phénotype de macrophage appelés Mox (Kadl *et al.*, 2010). Ces macrophages peuvent être induits à partir des macrophages M1 et M2 *via* des produits oxydés comme oxPAPC (oxidised 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-phosphorylcholine). Ces macrophages sont caractérisés par une expression accrue de Hmox1, la ferritine H et un niveau d'expression protéique de la ferroportine assez faible même si la transcription de la ferroportine est significativement plus importante (**Figure 29**) (Marques *et*

al., 2016). Ceci serait dû à une activité rédox plus importante qui active le Nrf2 nécessaire à la transcription de la ferroportine.

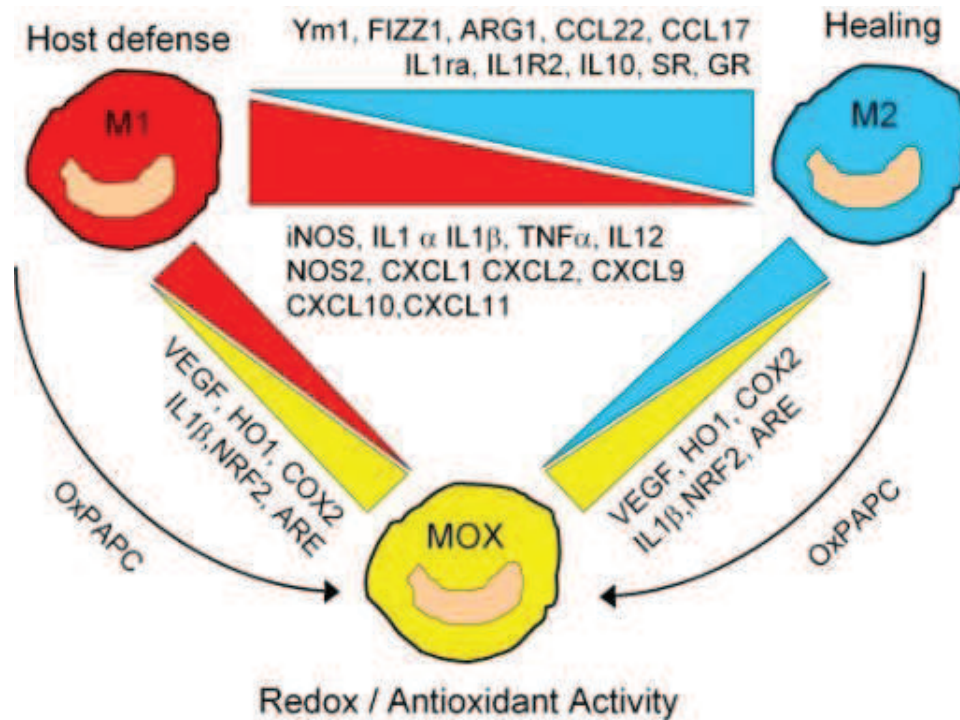


Figure 29: Comparaison phénotypique des macrophages M1, M2 et Mox.

Les macrophages Mox sont induits par un environnement riche en produits oxydés comme « oxidised 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-phosphorylcholine » (oxPAPC) et peuvent être induits à partir des macrophages M1 et M2. ARE, antioxidant responsive elements; ARG1, arginase 1; CCL, chemokine ligand; COX2, cyclo-oxygenase 2; CXCL, chemokine CXC motif ligand; FIZZ1, found in inflammatory zone 1; GR, galactose receptor; HO1, heme-oxygenase 1; IL, interleukin; IL1ra; interleukin 1 receptor antagonist; ILR2, interleukin 1 receptor type II, decoy receptor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NRF2, nuclear factor erythroid 2-like 2; SR, scavenger receptor; Ym1, chitinase 3-like 3 lectin.. (Shalhoub *et al.*, 2011).

Dans nos expérimentations, nous avons observé qu'un traitement des macrophages primaires avec le fer augmente au niveau transcriptionnel l'expression de la ferritine et de l'hème oxygénase-1 (**Annexe 2**). Par ailleurs, les études de Corna *et al* ont montré une réduction de la ferritine dans les macrophages M2. Dans nos conditions, l'expression transcriptionnelle de la ferritine dans les macrophages est augmentée en réponse au fer. Néanmoins il semble nécessaire de faire des tests d'expression de la ferritine au niveau protéique car la régulation de cette protéine se fait majoritairement au niveau post-transcriptionnel. Il a cependant été déjà montré qu'une augmentation du taux de fer au niveau des macrophages augmente l'expression protéique de la ferritine (Knutson *et al.*, 2003). Au regard de nos résultats, il semblerait que le phénotype des macrophages en réponse au fer impliquerait différents sous types de macrophage Mox et M2 comme résumé sur la figure ci-dessous (**Figure 30**).

Nous avons aussi mis en évidence en utilisant les macrophages qu'un changement de niveau de fer intracellulaire *via* l'utilisation des suppléments de fer comme le citrate d'ammonium ferrique ou les chélateurs de fer comme le deferiprone et la deferoxamine modifie la croissance de ces mycobactéries mais également la capacité d'internalisation des mycobactéries dans les macrophages. En effet un traitement des macrophages par le citrate d'ammonium ferrique augmente le niveau de fer intracellulaire, diminue l'internalisation de *M. bovis* BCG effectué normalement par les macrophages M1 mais augmente la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) dont l'activité bactéricide (Fang, 2011) pourrait être à l'origine de la réduction de la charge bactérienne intramacrophagique. Nos résultats indiquent ainsi que l'influence du fer sur la polarisation des macrophages préférentiellement en sous type M2, altère l'activité de phagocytose, activité normalement assurée par les macrophages de type M1.

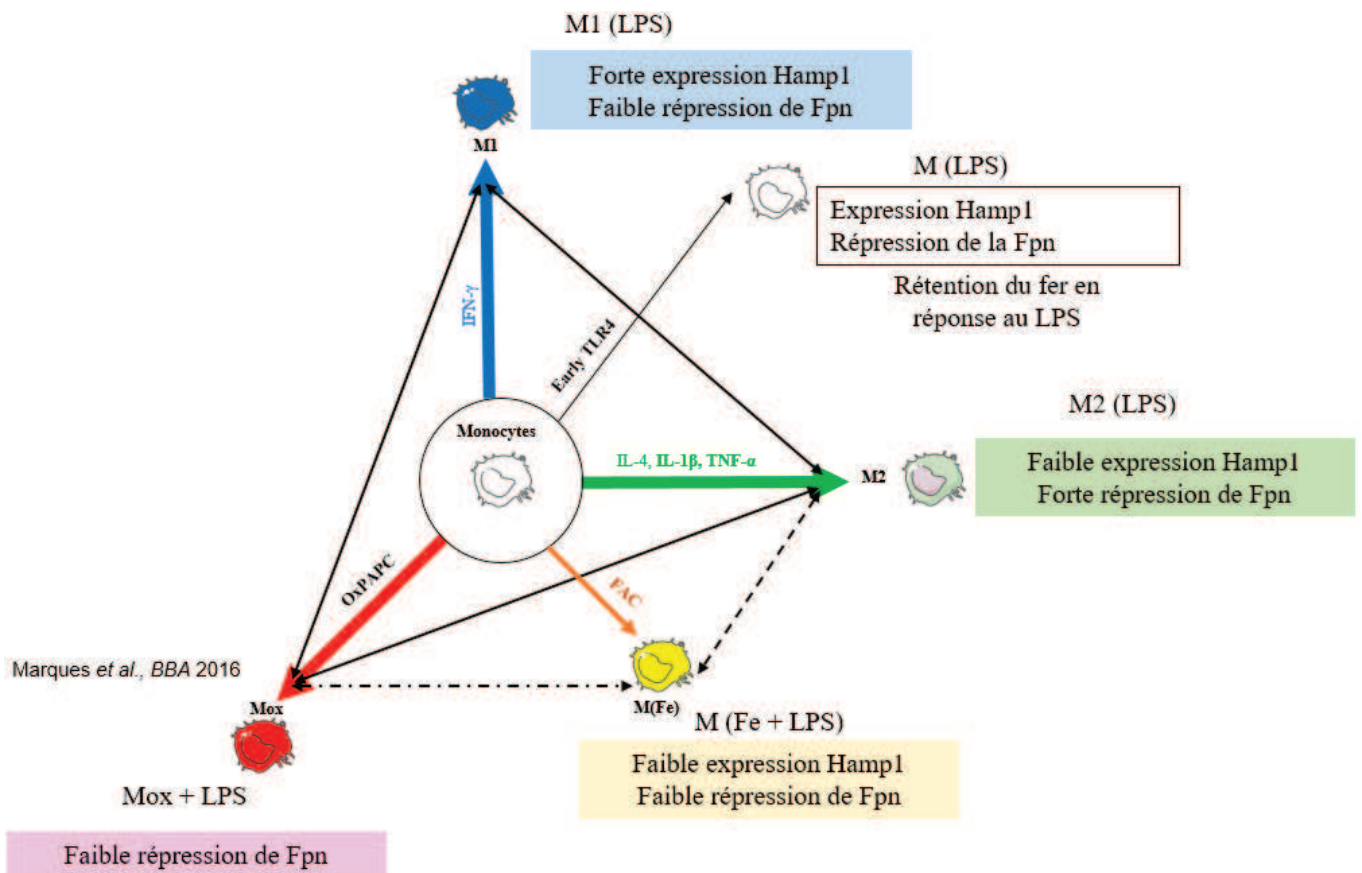


Figure 30 : Estimation de la localisation du phénotype des macrophages $M(Fe)$ en fonction des macrophages $M1$, $M2$ et Mox .

Les macrophages $M1$, $M2$ et Mox sont obtenus après une activation par $IFN-\gamma$, $IL-4$ et $OxPAPC$ respectivement. Une activation précoce du $TLR4$ (Early $TLR4$) des macrophages conduit à un phénotype proche des macrophages $M1$ dont la commutation à la suite d'une activation prolongée (Late $TLR4$) conduit à un phénotype plutôt $M2$. Une activation de $TLR2$ des macrophages ou leurs stimulations avec l' $IL-4$, l' $IL-1\beta$ et le $TNF-\alpha$ conduisent à un profil $M2$ des macrophages. Une augmentation du taux de fer intracellulaire des macrophages induit un phénotype probablement intermédiaire entre les macrophages $M2$ et Mox .

Nous nous sommes évidemment intéressés à l'effet d'une modification du taux de fer intracellulaire sur l'expression des paramètres impliqués dans l'inflammation induite par le LPS. Nous avons observé une réduction de l'expression d'hepcidine en réponse au LPS dans les macrophages en milieu de culture supplémenté avec du fer. Ce qui pourrait s'expliquer par l'empêchement de la polarisation des macrophages $M1$ par le traitement au fer lors du traitement au LPS. La répression de l'expression de la ferroportine induite par le LPS est aussi réduite les cellules préalablement surchargées avec le citrate d'ammonium ferrique. Ainsi une

surcharge en fer cellulaire pourrait modifier le phénotype des macrophages et altérer la réponse inflammatoire. De manière très intéressante, la pré-incubation des macrophages avec le fer à des concentrations non toxiques atténue la réponse pro-inflammatoire induite par le LPS, comme précisé dans l'article 2. Cette diminution de la réponse pro-inflammatoire au niveau transcriptionnel et protéique avec une réduction des transcrits des gènes pro-inflammatoires et de production et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires est associée à un défaut de translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau.

D'autre part nous confirmons *in vivo* qu'un régime déficient en fer est associé à une activité pro-inflammatoire. Dans l'article 2, nous avons montré qu'en condition de surcharge en fer *in vivo*, une augmentation du niveau d'expression de *Bmp6* est observée, alors que son expression est significativement réduite chez les souris soumises à un régime déficient en fer. De plus, des travaux ont montré que *Bmp6* induit l'expression de la molécule anti-inflammatoire IL-10 par l'intermédiaire de BMP RII et ALK2/3 dans la lignée de macrophages RAW264.7 murine (Lee *et al.*, 2013). L'implication d'une autre molécule de la famille des BMPs, BMP-7 a été décrite comme ayant des activités anti-inflammatoires (Rocher and Singla, 2013; Rocher *et al.*, 2012). En effet, un traitement des macrophages polarisés en M1 par le BMP7 diminue le niveau d'expression des marqueurs pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α , et l'iNOS. De plus, le niveau d'expression des marqueurs des macrophages M2 comme le récepteur de mannose (CD206), l'expression d'arginase et de l'IL-10 sont significativement augmentés en réponse au BMP7 au niveau des macrophages polarisés en M2 (Rocher and Singla, 2013). L'importance de BMP7 dans la régulation de l'homéostasie du fer a été apportée par Pauk *et al.*, en 2015 qui montrent qu'une administration de BMP7 à une concentration de 500 μ g/kg pendant 6 h chez les souris *Bmp6*^{-/-} corrige le niveau de fer sérique *via* une augmentation de l'expression d'hepcidine (Pauk *et al.*, 2015).

Il a été montré que BMP-7 active la voie de signalisation PI3K au niveau des macrophages et l'inhibition de la voie PI3K par le LY-294002 abolit l'effet d'induction de BMP7 sur l'expression des marqueurs M2 comme l'arginase et l'IL-10 (Rocher and Singla, 2013). Nos résultats précédents concordent avec ceux décrits dans la littérature sur l'effet du fer dans la polarisation M2 des macrophages, un traitement des macrophages primaires avec le fer pourrait conduire à l'activation de la voie PI3K au détriment des autres voies pro-inflammatoires comme le NF- κ B, ce qui conduit à une polarisation des macrophages vers le profile M2 suivie d'une réduction de l'expression d'hepcidine.

Les voies de signalisation intracellulaires de l'inflammation sont activées par de nombreuses molécules de type PAMPs et DAMPs. Les DAMPs incluent des molécules du soi souvent en excès dans l'organisme ou qui montrent une compartimentation anormale. L'excès de fer pourrait représenter un de ces signaux de danger. Nous montrons dans l'article 4 en préparation que la voie de signalisation MyD88 liée au TLRs et aux récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-1 (**Figure 31**) est primordiale pour l'expression d'hepcidine en réponse au fer. Ceci interviendrait principalement par un défaut d'expression de *Bmp6* et un retard d'activation des voies inflammatoires qui seraient impliquées dans l'expression d'hepcidine en réponse au fer. La voie de signalisation ST2 semble nécessaire pour contrôler l'expression de l'hepcidine chez les souris contrairement à la voie de signalisation IL-1R1 qui ne semble pas être impliquée dans l'expression d'hepcidine en réponse au fer. Etant donné que les souris MyD88 KO ont un défaut d'expression rapide d'hepcidine en réponse au fer, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le défaut de cette expression pourrait accentuer une absorption de fer intestinale suivie d'un dépôt de fer au niveau hépatique plus important. Pour rappel, notre modèle aiguë de surcharge en fer s'étale sur une période de 3 jours. Dans un modèle chronique de surcharge en fer durant 28 jours à une forte concentration (25g de fer carbonyle/kg d'aliments), nous observons un taux de fer hépatique beaucoup plus élevé chez les souris MyD88 KO comparé aux souris de type sauvage. De plus les souris MyD88 KO surexpriment le gène *Bmp6* en réponse à une surcharge en fer chronique contrairement à nos observations effectuées en réponse à une surcharge en fer aiguë. D'une manière beaucoup plus intéressante, l'expression d'*Inhibin b* est fortement induite après un traitement chronique des souris avec le fer. Plus important encore, les souris MyD88 KO surexpriment l'*Inhibin b* d'une manière beaucoup plus importante que les souris de type sauvage ce qui pourrait expliquer en association avec le niveau de fer hépatique l'observation plus accentuée du niveau d'expression d'hepcidine en réponse au fer. Nos observations suggèrent donc que l'augmentation du taux de fer dans l'organisme représente un signal de danger, et qu'une ou des voies MyD88 dépendantes sont stimulées et/ou régulées par le fer.

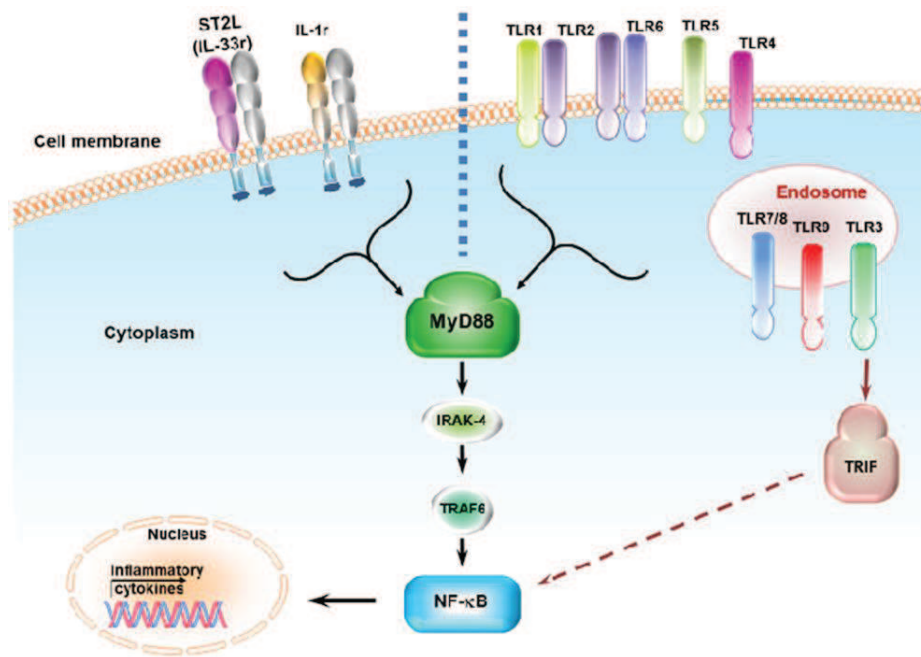


Figure 31 : Représentation schématique d'une cellule montrant les TLRs et des récepteurs IL-1R1 et ST2 (IL-33R).

La signalisation des TLRs (excepté le TLR3) et des récepteurs IL-1R1 et IL-33R conduit à la voie de signalisation médiée par la protéine adaptatrice MyD88.

Les travaux présentés dans l'article 2 nous ont permis d'appréhender le rôle d'un régime riche en fer sur la modification des paramètres inflammatoires comme une réduction des macrophages pro-inflammatoires et une augmentation du nombre de lymphocytes au niveau hépatique (**Annexe 3**). Les articles 1 et 4 nous ont permis de comprendre au niveau moléculaire les mécanismes impliqués dans l'expression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation et au fer. Dans l'article 3, il a été question d'appliquer les connaissances fondamentales acquises à partir des travaux précédents dans un modèle d'infection mycobactérienne : *Mycobacterium bovis* BCG. Les interactions entre le statut en fer et la réaction inflammatoire infectieuse analysées dans ce modèle d'infection montrent une influence d'un régime riche en fer sur la réponse immune.

La physiologie des mammifères est programmée pour réguler la concentration du fer absorbée au niveau des entérocytes et relarguer le fer par les macrophages par l'intermédiaire de l'hepcidine. Néanmoins, des modèles de surcharge ou de déficiences en fer permettent de moduler la réponse hepcidine-ferroportine et de se placer dans différentes situations physiologiques. Sur le plan clinique, ce mode de surcharge en fer est retrouvé généralement dans les populations de l'Afrique sub-saharienne connu en anglais sous le nom de « African Iron Overload ». Expérimentalement, dans un modèle murin, une surcharge en fer peut être

obtenue par une administration parentérale de fer complexé à des polymères comme le dextran. Ce modèle de surcharge en fer reste intéressant dans le cas d'étude des effets de correction d'une déficience en fer. Le modèle de surcharge en fer obtenue par voie alimentaire reproduit un système physiologique naturel. En effet nos habitudes alimentaires varient en fonction de notre niveau de vie, de nos cultures et de nos activités physiques. Une alimentation supplémentée en fer peut conduire à une surcharge en fer de l'organisme, ce qui indique clairement que la modulation de l'expression de l'hépcidine ne peut pas contrecarrer l'absorption intestinale du fer au risque de bloquer tout passage du fer dans la circulation sanguine et de bloquer l'érythropoïèse.

Nos investigations ont aussi montré une modification du taux de lymphocytes chez les souris soumises à un régime riche en fer. Nous avons ainsi montré une présence plus importante des lymphocytes dans le foie en condition de surcharge en fer (**Annexe 3**). Cette prolifération de cellules de l'immunité en cas de surcharge en fer est à mettre en relation avec les résultats publiés récemment par Bonaccorsi *et al* en 2015 qui associe la déficience en fer avec une réduction de l'activation des cellules T et NKT en réponse à la prolifération des lymphocytes dans un modèle d'hépatite aigüe induite par la concanavaline A. Dans nos expériences, nous n'avons pas identifié le type de lymphocytes qui serait augmenté. Néanmoins il a été décrit que la prolifération des lymphocytes T et B est dépendante du fer et que l'expression du récepteur de la transferrine CD71 est impliquée dans l'activation des lymphocytes (pour revue (Drakesmith and Prentice, 2012)).

La compétition entre l'hôte et le pathogène pour l'accès au fer a fait que les organismes ont développé des stratégies de séquestration ou d'acquisition fer de plus en plus sophistiquées au cours de l'évolution. Une infection par *Mtb* des macrophages induit une expression d'hépcidine et cette réponse est accentuée avec une incubation préalable des macrophages avec de l'IFN- γ (Sow *et al.*, 2011). Une infection mycobactérienne conduit à une anémie qui est le résultat d'un mécanisme de défense de l'hôte pour limiter la biodisponibilité du fer. Dans notre modèle d'infection à *M. bovis* BCG, nous avons remarqué une indication de l'anémie avec une réduction du nombre de globules rouges dans le sang, corrélée avec une diminution du volume occupé par les globules rouges circulants dans le sang par rapport au volume total du sang (hématocrite). D'une manière intéressante, la réduction du taux de fer circulant observée indirectement est corrélée avec une séquestration du fer dans les tissus comme le foie et la rate. A l'échelle tissulaire, une séquestration du fer favoriserait le développement de la croissance des pathogènes intracellulaires comme *M. bovis* BCG mais également induire une expression

de la défensine cationique, l'hepcidine étant connue pour détruire les pathogènes. L'anémie induite par *M. bovis* BCG est corrélée avec une augmentation d'expression au niveau hépatique des paramètres impliqués dans l'homéostasie du fer comme l'hepcidine, la ferroportine, l'inhibine b, la lipocaline 2 et le Bmp6. L'anémie induite par une infection mycobactérienne dans le modèle de *M. avium* a été décrite comme un mécanisme impliquant la lipocaline 2 et le Nramp1 mais pas l'hepcidine chez les souris BALB/c (Rodrigues *et al.*, 2011). En effet Rodrigues *et al* ont montré chez les souris BALB/c qu'en réponse à une infection à *M. avium*, une augmentation de l'expression de la lipocaline 2 était observée mais pas de l'hepcidine dans le foie. De plus ces auteurs ont montré que les souris Nramp1 résistantes (C.D2) sont plus protégées des risques anémiques induit par *M. avium* contrairement aux souris C57BL/6 démontrant l'importance d'un Nramp1 fonctionnel dans le contrôle d'une infection mycobactérienne (Rodrigues *et al.*, 2011). En effet la présence d'un Nramp1 fonctionnel permettrait de pomper le fer des phagosomes vers le cytosol ce qui accentue alors sa sortie vers le plasma ou un stockage plus important du fer par la ferritine. Les travaux présentés dans l'article 3 ont été réalisés sur des souris C57BL/6 qui n'ont pas de Nramp1 fonctionnel et sont donc plus anémique en réponse à une infection mycobactérienne. Nous avons donc voulu prévenir l'anémie induite par *M. bovis* BCG par l'utilisation d'un régime enrichi en fer. Le fer est un élément qui à forte concentration peut induire des dommages cellulaires et tissulaires. Ainsi un régime riche en fer modéré à raison de 2500 mg de fer carbonyle par kilogramme d'aliments a été utilisé. Les souris sont soumises à un régime riche en fer ou à un régime standard pendant 4 semaines puis une infection à *M. bovis* BCG est réalisée pendant 7 jours. Remarquablement, nous avons observé qu'un régime enrichi en fer prévient l'anémie induite par *M. bovis* BCG. Ainsi l'anémie provoquée par une infection à *M. bovis* BCG serait la conséquence d'une faible concentration du fer systémique, ce qui pourrait être corrigé par un régime enrichi en fer. Pour aller plus loin, nous avons cherché à déterminer l'effet d'un régime riche en fer sur la physiopathologie d'une infection à *M. bovis* BCG.

Mycobacterium tuberculosis, responsable de la tuberculose exprime à la surface des différents ligands TLR qui activent principalement les récepteurs TLR2, TLR4 et TLR9. L'activation du récepteur TLR2 des cellules de l'hôte en réponse aux produits mycobactériens induit une réponse anti-inflammatoire par une production des cytokines IL-10 et IL-6, une inhibition de la présentation des antigènes et une absence de la réponse IFN- γ . En effet les travaux de Jang *et al* ont montré que l'induction de l'IL-6 et de l'IL-10 par les cellules dendritiques en réponse à une infection mycobactérienne est dépendante de la signalisation

TLR2 (Jang *et al.*, 2004). De plus les travaux effectués au laboratoire en 2004 ont montré que les souris TLR2 KO succombent à une infection chronique de *Mtb* suite à une exacerbation de l'inflammation, démontrant ainsi le rôle primordial de la signalisation par l'intermédiaire de TLR2 dans l'induction de la réponse anti-inflammatoire (Drennan *et al.*, 2004). La signalisation *via* les autres TLRs durant une infection mycobactérienne conduit à une réponse plutôt pro-inflammatoire. La réponse de l'hôte à une infection mycobactérienne est la résultante de la médiation de toutes les voies induites par les TLRs. L'activation des multiples TLR induit des phénomènes nécessaires à la résolution de l'infection. Ainsi, l'entrée des macrophages en apoptose durant une infection mycobactérienne a été décrite comme un mécanisme de survie et de protection de l'hôte contre l'infection, contrairement au processus nécrotique qui peut entraîner la dissémination de l'infection (Molloy *et al.*, 1994). Le rôle des différents TLRs dans l'apoptose et la nécrose cellulaire durant une infection par *Mtb* au niveau des macrophages a été démontré par Sánchez *et al* en 2010 (Sanchez *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'apoptose des macrophages induit par *Mtb* requiert l'implication de TLR2, MyD88 et TLR4. Une absence de la signalisation TLR4 induit les macrophages en nécrose durant une infection par *Mtb*. Les produits mycobactériens comme les HSPs (heat shock proteins) 65 et 70 et les glycopeptidolipides activent les voies de signalisation intracellulaires comme NF- κ B, PI3K et les MAPKs (p38 et ERK1/2) en coordination avec les TLR2 et TLR4 pour induire des processus cellulaires complexes comme l'apoptose et la nécrose (Jo *et al.*, 2007). Par l'utilisation des marqueurs de membrane cellulaire et mitochondrial pour mesurer l'apoptose et la nécrose respectivement, Sánchez *et al* ont montré qu'une inhibition des voies de signalisations intracellulaires NF- κ B, PI3K et les MAPKs (p38 et ERK1/2) réduit drastiquement l'entrée des cellules en apoptose ce qui contribue à l'exacerbation d'une infection mycobactérienne (Sanchez *et al.*, 2010). Nos résultats sur les interactions entre homéostasie du fer et la polarisation des macrophages par le fer indiqueraient que l'augmentation du taux de fer modifie la polarisation des macrophages tissulaires et pourrait donc modifier la réponse de défense globale de l'hôte face à une infection.

Il est largement admis qu'une supplémentation en fer est un facteur qui accroît la susceptibilité à une infection mycobactérienne. Dans un modèle murin d'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, Lounis *et al* ont montré qu'une injection préalable de fer par voie intra-péritonéale pendant deux semaines à une concentration de 50 mg/kg suivi d'une infection par voie intraveineuse de *Mtb* à 7200 CFU exacerbe l'infection chez les souris BALB/c. Dans cette étude, aucun mécanisme d'action du fer n'a été évoqué et de plus le niveau de dépôt du

fer au niveau hépatique n'a pas été décrit (Lounis *et al.*, 2001). Dans notre modèle d'enrichissement en fer par voie alimentaire, aucun dépôt de fer significatif n'est observé dans le foie. D'une manière intéressante et remarquable, nous avons remarqué qu'un régime enrichi en fer est corrélé avec une diminution de la charge bactérienne dans le foie, le poumon et la rate après une infection à *M. bovis* BCG. Cette diminution peut être liée à une augmentation du niveau d'expression de l'hepcidine dans ces organes et à un défaut d'internalisation des mycobactéries dans les macrophages. En effet le niveau d'expression de l'hepcidine en réponse à une infection par *M. bovis* BCG est augmenté dans le foie et le poumon durant les phases d'infection et de développement de la pathologie. Pendant la phase de résolution le niveau d'expression de l'hepcidine dans le poumon reste à un état basal. Cette augmentation de l'hepcidine dans le foie et le poumon pourrait détruire *M. bovis* BCG puisque cette défensine possède une activité mycobactéricide (Sow *et al.*, 2007). La baisse d'inflammation en condition de surcharge en fer serait due à un changement du phénotype des macrophages qui acquièrent un phénotype plus proche des macrophages anti-inflammatoires protégeant ainsi les souris de l'inflammation et d'internalisation de *M. bovis* BCG.

La défense de l'hôte contre une infection mycobactérienne passe également par une réponse immune adaptative cellulaire très importante. Des travaux publiés en 2015 par Bonaccorsi-Riani *et al* montrent dans un modèle d'inflammation induite par la concanavaline que la réponse inflammatoire en termes de recrutement des lymphocytes T et de l'activation des cellules NKT est réduite au niveau hépatique en condition de déficience en fer induite sur 3 semaines avec moins de 6 mg de fer par kilogrammes d'aliments (Bonaccorsi-Riani *et al.*, 2015). Dans notre modèle d'enrichissement en fer combiné à une infection par *M. bovis* BCG, nous avons remarqué une prolifération plus importante des lymphocytes T-CD8⁺ dans le foie. Plus important encore, suite à une infection par *M. bovis* BCG, une présence de lymphocytes plus importante dans les granulomes hépatiques en condition d'un régime enrichi en fer a été observée. Ainsi une supplémentation en fer accroît une réponse lymphocytaire chez les souris soumises à un régime riche en fer associée avec une clairance bactérienne plus importante.

Ces travaux démontrent qu'un régime riche en fer modéré est associé à une modification de la réponse immune induite par *M. bovis* BCG avec des propriétés protectrices de l'hôte. Cette modification de la réponse immune peut résulter de l'effet sur la polarisation des macrophages, et donc des cytokines sécrétées par ces cellules et de leurs effets en tant que médiateurs impliqués dans la stimulation ou l'inhibition d'autres cellules environnantes, et de la prolifération des lymphocytes qui eux aussi modulent la réponse de défense de l'hôte.

Conclusion générale & perspectives

Conclusion générale & perspectives

Les investigations sur les interactions hôte-pathogènes pour l'acquisition des oligoéléments représentent des nouvelles pistes intéressantes dans notre long voyage dont la destination est la lutte contre les maladies infectieuses. Les études orientées sur l'immunité nutritionnelle du fer paraissent prometteuses. Le décryptage continu et accru des mécanismes de régulation du fer chez les mammifères notamment avec la découverte de l'hepcidine comme hormone de régulation du fer et son implication prouvée dans la réponse immune par l'intermédiaire de ses activités antibactériennes à large spectre, pose le premier jalon de ce voyage. Il apparaît clairement que la réponse immune influence l'homéostasie du fer et parallèlement le fer influence la réponse immune. L'objectif de ces travaux de thèse a été d'étudier les interactions entre l'homéostasie du fer et la réponse immune suivi d'une étude appliquée dans un modèle d'infection mycobactérienne.

La réponse immune innée est médiée principalement par une variété de TLR qui reconnaissent des motifs exprimés par les microorganismes et qui induisent des réponses immunes variées selon les pathogènes. Une analyse individuelle de l'activation des TLR et des voies de signalisation intracellulaires a permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'hepcidine et de la ferroportine au niveau des macrophages murins, et l'influence des voies inflammatoires sur l'homéostasie du fer. Inversement, nos analyses montrent aussi l'influence du fer sur la réponse immune, ainsi le fer intracellulaire module la polarisation des macrophages, stimule la prolifération des lymphocytes et active probablement des voies de signalisation de danger. Nos travaux réalisés dans un modèle d'infection mycobactérien ont permis de montrer une association de l'infection avec la rupture des paramètres impliqués dans l'homéostasie du fer principalement l'hepcidine et la ferroportine. Cette rupture de l'homéostasie du fer induit une anémie qui peut être corrigée par une supplémentation du fer dans l'alimentation. Un régime enrichi en fer montre un effet protecteur sur l'infection à *M. bovis* BCG avec une diminution de la charge mycobactérienne associée à une augmentation accrue de l'expression d'hepcidine au niveau du foie et du poumon. Toutes ces observations démontrent le lien entre la réponse immune et l'homéostasie du fer.

Ces travaux ouvrent des perspectives d'investigations du rôle du fer dans d'autres modèles d'infection. L'infection mycobactérienne par *M. bovis* BCG est un modèle non virulent de mycobactéries mimant parfaitement le cycle de *M. tuberculosis* infectieux. Il serait cependant judicieux de transposer cette étude à l'infection mycobactérienne virulente. Les travaux réalisés au laboratoire ont montré que les souris sauvages sont plus résistantes à une infection mycobactérienne (*M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG) que les souris MyD88, IL-1R1 et TNF- α déficientes qui sont plus ou moins susceptibles à l'infection (Bourigault *et al.*, 2013). Ainsi il serait intéressant d'évaluer l'effet d'un régime riche en fer sur la susceptibilité à l'infection mycobactérienne chez les souris susceptibles et notamment chez les MyD88 déficientes qui présentent en parallèle un défaut d'expression d'hepcidine en réponse au fer et à l'inflammation. De plus l'évaluation du phénotype observé en réponse à une infection mycobactérienne doit être effectuée chez les souris à fond génétique possédant la protéine Nramp1 fonctionnelle comme les souris CBA contrairement aux souris C57BL/6 qui n'ont pas de Nramp1 fonctionnel qui joue un rôle important dans l'homéostasie du fer dans les macrophages lors d'infection. En effet, la présence de Nramp1 est impliquée dans la sortie du fer des phagosomes affectant directement la susceptibilité aux infections.

Dans nos expérimentations, nous avons observé une expression plus importante de l'hepcidine au niveau hépatique et des poumons en réponse à une infection mycobactérienne; de plus un effet additionnel de l'expression d'hepcidine en condition d'un régime enrichi en fer a été noté. Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'hepcidine au niveau sérique et de déterminer en parallèle son influence dans l'expression protéique de la ferroportine. L'utilisation des souris *Hepcidin* KO permettrait également de mieux jauger l'impact de ce peptide en réponse à une infection mycobactérienne.

Des études récentes montrent qu'une modification du taux de fer alimentaire est associée avec la modification du microbiote intestinal (Kortman *et al.*, 2014). Kortmann *et al* en 2016 ont utilisé un modèle *in vitro* mimant le gros intestin et mis en évidence qu'un régime enrichi en fer diminue les taux de *Bifidobacteriaceae* et *Lactobacillaceae* au niveau du microbiote intestinal tout en augmentant ceux de *Roseburia* et *Prevotella*. De plus, en condition de régime riche en fer, le métabolome passe d'un profil saccharolytique à celui de protéolytique (Kortman *et al.*, 2015). Cette modification du microbiote intestinal engendre des conséquences sur le métabolisme du fer ainsi que sur la réponse immune. Inversement le microbiote intestinal peut également modifier le métabolisme du fer systémique chez les mammifères. En effet Deschemin *et al* en 2016 ont montré que les souris « Germ free » ou axéniques présentent des

quantités faibles de fer dans l'organisme par rapport aux souris qui contiennent une flore intestinale normale. Le mécanisme impliqué repose sur la diminution de l'expression de la ferroportine au niveau du duodénum, voie de sortie du fer des entérocytes pour être exporté dans le sang chez les souris « Germ free ». Par la suite ces mêmes auteurs ont démontré qu'une réintroduction de deux bactéries commensales spécifiques *Faecalibacterium prausnitzii* ou *Bacteroides thetaiotaomicron* permet d'augmenter significativement l'expression de la ferritine et de la ferroportine favorisant ainsi le stockage du fer et son transport. (Deschemin *et al.*, 2016). Ainsi les études du rôle du fer dans la réponse immune doivent également prendre en considération les paramètres du microbiote intestinal.

Références bibliographiques

Abbaspour, N., Hurrell, R., and Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 19, 164-174.

Agoro, R., and Mura, C. (2016). Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 61, 16 - 25.

Aguirre, J.D., Clark, H.M., McIlvin, M., Vazquez, C., Palmere, S.L., Grab, D.J., Seshu, J., Hart, P.J., Saito, M., and Culotta, V.C. (2013). A manganese-rich environment supports superoxide dismutase activity in a Lyme disease pathogen, *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of biological chemistry* 288, 8468-8478.

Aït Belghiti, F., and Antoine, D. (2015). L'épidémiologie de la tuberculose en France en 2013. *Bull Epidémiol Hebd* 9 -10, 164 - 171.

Andrews, N.C. (2000). Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature reviews Genetics* 1, 208-217.

Andriopoulos, B., Jr., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S.A., Chen, S., Grgurevic, L., Knutson, M.D., Pietrangelo, A., Vukicevic, S., Lin, H.Y., *et al.* (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature genetics* 41, 482-487.

Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., Campagna, J.A., Chung, R.T., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., *et al.* (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics* 38, 531-539.

Beghe, B., Barton, S., Rorke, S., Peng, Q., Sayers, I., Gaunt, T., Keith, T.P., Clough, J.B., Holgate, S.T., and Holloway, J.W. (2003). Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33, 1111-1117.

Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P., Whittle, H.C., and Hill, A.V. (1998). Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *The New England journal of medicine* 338, 640-644.

Bennett, M.J., Lebron, J.A., and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403, 46-53.

Besson-Fournier, C., Latour, C., Kautz, L., Bertrand, J., Ganz, T., Roth, M.P., and Coppin, H. (2012). Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* 120, 431-439.

- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2012). Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism* 15, 432-437.
- Bonaccorsi-Riani, E., Danger, R., Lozano, J.J., Martinez-Picola, M., Kodela, E., Mas-Malavila, R., Bruguera, M., Collins, H.L., Hider, R.C., Martinez-Llordella, M., *et al.* (2015). Iron Deficiency Impairs Intra-Hepatic Lymphocyte Mediated Immune Response. *PLoS One* 10, e0136106.
- Bosque, F., Belkaid, Y., Briend, E., Hevin, B., Lebastard, M., Soussi, N., and Milon, G. (1997). The biology of macrophages. *Pathologie-biologie* 45, 103-109.
- Bourigault, M.L., Segueni, N., Rose, S., Court, N., Vacher, R., Vasseur, V., Erard, F., Le Bert, M., Garcia, I., Iwakura, Y., *et al.* (2013). Relative contribution of IL-1alpha, IL-1beta and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immunity, inflammation and disease* 1, 47-62.
- Brock, J. (2000). Role of iron in infections and immunity. . In Hemochromatosis Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment, J.C. Barton, and C.Q. Edwards, eds. (Cambridge: Cambridge University Press).
- Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A., and Locati, M. (2011). Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends in immunology* 32, 241-247.
- Calmette, A., and Guérin, C. (1911). Recherches experimentales sur la defense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. *Ann Inst Pasteur* 25, 625.
- Calmette, A., and Guérin, C. (1920). Nouvelles recherches experimentales sur la vaccination des bovines contre la tuberculose *Ann Inst Pasteur* 34 553 – 560.
- Camaschella, C., and Poggiali, E. (2011). Inherited disorders of iron metabolism. *Current opinion in pediatrics* 23, 14-20.
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., and Gasparini, P. (2000). The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature genetics* 25, 14-15.
- Cambier, C.J., Falkow, S., and Ramakrishnan, L. (2014a). Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell* 159, 1497-1509.
- Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B., Cosma, C.L., and Ramakrishnan, L. (2014b). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505, 218-222.
- Casanova, J.L., Jouanguy, E., Lamhamedi, S., Blanche, S., and Fischer, A. (1995). Immunological conditions of children with BCG disseminated infection. *Lancet* 346, 581.

Chatterjee, D. (1997). The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol* 1, 579-588.

Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S., and Tolosano, E. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in pharmacology* 5, 61.

Chiancone, E., Ceci, P., Ilari, A., Ribacchi, F., and Stefanini, S. (2004). Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 17, 197-202.

Clemens, D.L., and Horwitz, M.A. (1996). The Mycobacterium tuberculosis phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* 184, 1349-1355.

Colditz, G.A., Berkey, C.S., Mosteller, F., Brewer, T.F., Wilson, M.E., Burdick, E., and Fineberg, H.V. (1995). The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 96, 29-35.

Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., and Mosteller, F. (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Jama* 271, 698-702.

Cooper, A.M. (2009). T cells in mycobacterial infection and disease. *Current opinion in immunology* 21, 378-384.

Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., Tagliafico, E., Bosurgi, L., Campanella, A., Brunelli, S., Manfredi, A.A., Apostoli, P., *et al.* (2010). Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* 95, 1814-1822.

Corradini, E., Garuti, C., Montosi, G., Ventura, P., Andriopoulos, B., Jr., Lin, H.Y., Pietrangelo, A., and Babitt, J.L. (2009). Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology* 137, 1489-1497.

Cortell, S., and Conrad, M.E. (1967). Effect of endotoxin on iron absorption. *The American journal of physiology* 213, 43-47.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., and Meslin, F.X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. *Emerging infectious diseases* 4, 59-70.

Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., and Horng, T. (2015). Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Seminars in immunology* 27, 286-296.

Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., and Stewart, T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259, 1739-1742.

De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Su, H., Zhu, Y., and Barry, C.E., 3rd (2000). The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1252-1257.

Deschemin, J.C., Noordine, M.L., Remot, A., Willemetz, A., Afif, C., Canonne-Hergaux, F., Langella, P., Karim, Z., Vaulont, S., Thomas, M., *et al.* (2016). The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30, 252-261.

Doherty, T.M., and Arditi, M. (2004). TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer? *The Journal of clinical investigation* 114, 1699-1703.

Dong, X.P., Cheng, X., Mills, E., Delling, M., Wang, F., Kurz, T., and Xu, H. (2008). The type IV mucopolidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* 455, 992-996.

Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., and Andrews, N.C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell metabolism* 1, 191-200.

Dorman, S.E., and Holland, S.M. (2000). Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine & growth factor reviews* 11, 321-333.

Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11, 585-593.

Drakesmith, H., and Prentice, A.M. (2012). Hepcidin and the iron-infection axis. *Science* 338, 768-772.

Drennan, M.B., Nicolle, D., Quesniaux, V.J., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J., Fremont, C., Wagner, H., Kirschning, C., and Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The American journal of pathology* 164, 49-57.

Du, X., She, E., Gelbart, T., Truksa, J., Lee, P., Xia, Y., Khovananth, K., Mudd, S., Mann, N., Moresco, E.M., *et al.* (2008). The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 320, 1088-1092.

Ebersole, J.L., and Cappelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology* 2000 23, 19-49.

Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 5624-5628.

El-Sayed, A., El-Shannat, S., Kamel, M., Castaneda-Vazquez, M.A., and Castaneda-Vazquez, H. (2016). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. *Zoonoses and public health* *63*, 251-264.

El-Shobaki, F., and Rummel, W. (1985). Mucosal iron binding proteins and the inhibition of iron absorption by endotoxin. *Blut* *50*, 95-101.

Enwonwu, C.O. (1990). Functional significance of iron deficiency, Vol Vol. III, ed. Annual Nutrition Workshop Series edn (Meharry Medical College).

Etna, M.P., Giacomini, E., Severa, M., and Coccia, E.M. (2014). Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in immunology* *26*, 543-551.

Fang, F.C. (2011). Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio* *2*.

Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M.C., Fullan, A., *et al.* (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature genetics* *13*, 399-408.

Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebron, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., and Schatzman, R.C. (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 1472-1477.

Fillet, G., Beguin, Y., and Baldelli, L. (1989). Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. *Blood* *74*, 844-851.

Finberg, K.E., Heeney, M.M., Campagna, D.R., Aydinok, Y., Pearson, H.A., Hartman, K.R., Mayo, M.M., Samuel, S.M., Strouse, J.J., Markianos, K., *et al.* (2008). Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature genetics* *40*, 569-571.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* *170*, 2081-2095.

Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* *7*, 355-366.

Folgueras, A.R., de Lara, F.M., Pendas, A.M., Garabaya, C., Rodriguez, F., Astudillo, A., Bernal, T., Cabanillas, R., Lopez-Otin, C., and Velasco, G. (2008). Membrane-bound serine

protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* 112, 2539-2545.

Ford, A.Q., Heller, N.M., Stephenson, L., Boothby, M.R., and Keegan, A.D. (2009). An atopy-associated polymorphism in the ectodomain of the IL-4R(alpha) chain (V50) regulates the persistence of STAT6 phosphorylation. *J Immunol* 183, 1607-1616.

Fremont, C.M., Nicolle, D.M., Torres, D.S., and Quesniaux, V.F. (2003). Control of *Mycobacterium bovis* BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 1070-1081.

Fremont, C.M., Togbe, D., Doz, E., Rose, S., Vasseur, V., Maillet, I., Jacobs, M., Ryffel, B., and Quesniaux, V.F. (2007). IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 179, 1178-1189.

Fremont, C.M., Yermeev, V., Nicolle, D.M., Jacobs, M., Quesniaux, V.F., and Ryffel, B. (2004). Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *The Journal of clinical investigation* 114, 1790-1799.

Galvan-Pena, S., and O'Neill, L.A. (2014). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in immunology* 5, 420.

Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., and Recalcati, S. (2014). Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics : integrated biometal science* 6, 1336-1345.

Ganz, T., and Nemeth, E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol* 15, 500-510.

Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A.S., and Enns, C.A. (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell metabolism* 9, 217-227.

Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., *et al.* (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7877-7882.

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157, 798-805.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Glocker, E.O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schaffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., *et al.* (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England journal of medicine* *361*, 2033-2045.

Gobin, J., and Horwitz, M.A. (1996). Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J Exp Med* *183*, 1527-1532.

Gordeuk, V.R., Caleffi, A., Corradini, E., Ferrara, F., Jones, R.A., Castro, O., Onyekwere, O., Kittles, R., Pignatti, E., Montosi, G., *et al.* (2003). Iron overload in Africans and African-Americans and a common mutation in the SCL40A1 (ferroportin 1) gene. *Blood cells, molecules & diseases* *31*, 299-304.

Gordeuk, V.R., McLaren, C.E., MacPhail, A.P., Deichsel, G., and Bothwell, T.H. (1996). Associations of iron overload in Africa with hepatocellular carcinoma and tuberculosis: Strachan's 1929 thesis revisited. *Blood* *87*, 3470-3476.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* *5*, 953-964.

Goswami, T., and Andrews, N.C. (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *The Journal of biological chemistry* *281*, 28494-28498.

Goode, R., and Parish, T. (2008). Electroporation of *Mycobacteria*. In *Mycobacteria Protocols*, A.C.B. T. Parish, ed. (Totowa, NJ), p. 203.

Gozzelino, R., and Arosio, P. (2016). Iron Homeostasis in Health and Disease. *International journal of molecular sciences* *17*.

Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A., and Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science B* *6*, 1045-1056.

Guida, C., Altamura, S., Klein, F.A., Galy, B., Boutros, M., Ulmer, A.J., Hentze, M.W., and Muckenthaler, M.U. (2015). A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferrremia. *Blood* *125*, 2265-2275.

Gupta, V., Gupta, R.K., Khare, G., Salunke, D.M., and Tyagi, A.K. (2009). Crystal structure of Bfr A from *Mycobacterium tuberculosis*: incorporation of selenomethionine results in cleavage and demetallation of haem. *PLoS One* *4*, e8028.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Muller, W., Sparwasser, T., Forster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* *34*, 237-246.

Han, O. (2011). Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics : integrated biometal science* 3, 103-109.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* 334 (Pt 2), 297-314.

Hentze, M.W., and Kuhn, L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8175-8182.

Hershko, C., Cook, J.D., and Finch, C.A. (1974). Storage iron kinetics. VI. The effect of inflammation on iron exchange in the rat. *British journal of haematology* 28, 67-75.

Holscher, C., Reiling, N., Schaible, U.E., Holscher, A., Bathmann, C., Korbel, D., Lenz, I., Sonntag, T., Kroger, S., Akira, S., *et al.* (2008). Containment of aerogenic Mycobacterium tuberculosis infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *Eur J Immunol* 38, 680-694.

Hossain, M.M., and Norazmi, M.N. (2013). Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword? *BioMed research international* 2013, 179174.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259, 1742-1745.

Hunter, H.N., Fulton, D.B., Ganz, T., and Vogel, H.J. (2002). The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 37597-37603.

Hurrell, R., and Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American journal of clinical nutrition* 91, 1461S-1467S.

Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Hojrup, P., Moller, H.J., and Moestrup, S.K. (2005). Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* 106, 2572-2579.

Ilyin, G., Courselaud, B., Troadec, M.B., Pigeon, C., Alizadeh, M., Leroyer, P., Brissot, P., and Loreal, O. (2003). Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS letters* 542, 22-26.

Jang, S., Uematsu, S., Akira, S., and Salgame, P. (2004). IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* 173, 3392-3397.

Jo, E.K., Yang, C.S., Choi, C.H., and Harding, C.V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cellular microbiology* 9, 1087-1098.

Johansson, H.E., and Theil, E.C. (2002). Iron-response element (IRE) structure and combinatorial RNA regulation. In *Molecular and Cellular Iron Transport*.

Johnson, E.E., Sandgren, A., Cherayil, B.J., Murray, M., and Wessling-Resnick, M. (2010). Role of ferroportin in macrophage-mediated immunity. *Infection and immunity* 78, 5099-5106.

Johnson, H.M., Noon-Song, E.N., Dabelic, R., and Ahmed, C.M. (2013). IFN signaling: how a non-canonical model led to the development of IFN mimetics. *Frontiers in immunology* 4, 202.

Jones, C.M., Wells, R.M., Madduri, A.V., Renfrow, M.B., Ratledge, C., Moody, D.B., and Niederweis, M. (2014). Self-poisoning of Mycobacterium tuberculosis by interrupting siderophore recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 1945-1950.

Kadl, A., Meher, A.K., Sharma, P.R., Lee, M.Y., Doran, A.C., Johnstone, S.R., Elliott, M.R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., *et al.* (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation research* 107, 737-746.

Kampschmidt, R.F., Upchurch, H.F., and Johnson, H.L. (1965). Iron Transport after Injection of Endotoxin in Rats. *The American journal of physiology* 208, 68-72.

Kandola, K., Bowman, A., and Birch-Machin, M.A. (2015). Oxidative stress--a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *International journal of cosmetic science* 37 Suppl 2, 1-8.

Kassebaum, N.J., Jasrasaria, R., Naghavi, M., Wulf, S.K., Johns, N., Lozano, R., Regan, M., Weatherall, D., Chou, D.P., Eisele, T.P., *et al.* (2014). A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 123, 615-624.

Kasvosve, I., Gangaidzo, I.T., Gomo, Z.A., and Gordeuk, V.R. (2000). African iron overload. *Acta clinica Belgica* 55, 88-93.

Kaufmann, S.H., Cole, S.T., Mizrahi, V., Rubin, E., and Nathan, C. (2005). Mycobacterium tuberculosis and the host response. *J Exp Med* 201, 1693-1697.

Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E., and Ganz, T. (2014). Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature genetics* 46, 678-684.

Kautz, L., Meynard, D., Monnier, A., Darnaud, V., Bouvet, R., Wang, R.H., Deng, C., Vaulont, S., Mosser, J., Coppin, H., *et al.* (2008). Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood* 112, 1503-1509.

Khare, G., Gupta, V., Nangpal, P., Gupta, R.K., Sauter, N.K., and Tyagi, A.K. (2011). Ferritin structure from *Mycobacterium tuberculosis*: comparative study with homologues identifies extended C-terminus involved in ferroxidase activity. *PLoS One* 6, e18570.

Killick, K.E., Ni Cheallaigh, C., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D.E., and Harris, J. (2013). Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cellular microbiology* 15, 1484-1495.

Knutson, M.D., Vafa, M.R., Haile, D.J., and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* 102, 4191-4197.

Kortman, G.A., Dutilh, B.E., Maathuis, A.J., Engelke, U.F., Boekhorst, J., Keegan, K.P., Nielsen, F.G., Betley, J., Weir, J.C., Kingsbury, Z., *et al.* (2015). Microbial Metabolism Shifts Towards an Adverse Profile with Supplementary Iron in the TIM-2 In vitro Model of the Human Colon. *Frontiers in microbiology* 6, 1481.

Kortman, G.A., Raffatellu, M., Swinkels, D.W., and Tjalsma, H. (2014). Nutritional iron turned inside out: intestinal stress from a gut microbial perspective. *FEMS microbiology reviews* 38, 1202-1234.

Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters* 480, 147-150.

Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12, 231-238.

Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.

Layoun, A., and Santos, M.M. (2012). Bacterial cell wall constituents induce hepcidin expression in macrophages through MyD88 signaling. *Inflammation* 35, 1500-1506.

Lebron, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N., and Bjorkman, P.J. (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93, 111-123.

Lee, J.H., Lee, G.T., Woo, S.H., Ha, Y.S., Kwon, S.J., Kim, W.J., and Kim, I.Y. (2013). BMP-6 in renal cell carcinoma promotes tumor proliferation through IL-10-dependent M2 polarization of tumor-associated macrophages. *Cancer research* 73, 3604-3614.

Leidgens, S., Bullough, K.Z., Shi, H., Li, F., Shakoury-Elizeh, M., Yabe, T., Subramanian, P., Hsu, E., Natarajan, N., Nandal, A., *et al.* (2013). Each member of the poly-r(C)-binding protein

1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *The Journal of biological chemistry* 288, 17791-17802.

Liaw, Y.S., Tsai-Wu, J.J., Wu, C.H., Hung, C.C., Lee, C.N., Yang, P.C., Luh, K.T., and Kuo, S.H. (2002). Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility of tuberculosis in Taiwanese. *Int J Tuberc Lung Dis* 6, 454-460.

Liu, Y.C., Zou, X.B., Chai, Y.F., and Yao, Y.M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International journal of biological sciences* 10, 520-529.

Liuzzi, J.P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M.D., and Cousins, R.J. (2006). Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13612-13617.

Lo, B. (2016). The requirement of iron transport for lymphocyte function. *Nature genetics* 48, 10-11.

London, A., Itskovich, E., Benhar, I., Kalchenko, V., Mack, M., Jung, S., and Schwartz, M. (2011). Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *J Exp Med* 208, 23-39.

Lopez, A., Cacoub, P., Macdougall, I.C., and Peyrin-Biroulet, L. (2016). Iron deficiency anaemia. *Lancet* 387, 907-916.

Lou, D.Q., Lesbordes, J.C., Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Van Rooijen, N., Kahn, A., Renia, L., and Vaulont, S. (2005). Iron- and inflammation-induced hepcidin gene expression in mice is not mediated by Kupffer cells in vivo. *Hepatology* 41, 1056-1064.

Lounis, N., Truffot-Pernot, C., Grosset, J., Gordeuk, V.R., and Boelaert, J.R. (2001). Iron and Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 20, 123-126.

Madigan, C.A., Cheng, T.Y., Layre, E., Young, D.C., McConnell, M.J., Debono, C.A., Murry, J.P., Wei, J.R., Barry, C.E., 3rd, Rodriguez, G.M., *et al.* (2012). Lipidomic discovery of deoxysiderophores reveals a revised mycobactin biosynthesis pathway in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1257-1262.

Maglione, P.J., Xu, J., Casadevall, A., and Chan, J. (2008). Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 180, 3329-3338.

Maglione, P.J., Xu, J., and Chan, J. (2007). B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 178, 7222-7234.

Maizels, R.M., Pearce, E.J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., and Wynn, T.A. (2009). Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 206, 2059-2066.

Malik, Z.A., Denning, G.M., and Kusner, D.J. (2000). Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med* 191, 287-302.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.

Marques, L., Negre-Salvayre, A., Costa, L., and Canonne-Hergaux, F. (2016). Iron gene expression profile in atherogenic Mox macrophages. *Biochimica et biophysica acta* 1862, 1137-1146.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6, 13.

Massague, J. (1992). Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 69, 1067-1070.

Massague, J., Cheifetz, S., Ignatz, R.A., and Boyd, F.T. (1987). Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors. *Journal of cellular physiology Supplement* Suppl 5, 43-47.

Mastrogiannaki, M., Matak, P., Mathieu, J.R., Delga, S., Mayeux, P., Vaulont, S., and Peyssonnaud, C. (2012). Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* 97, 827-834.

Merryweather-Clarke, A.T., Worwood, M., Parkinson, L., Mattock, C., Pointon, J.J., Shearman, J.D., and Robson, K.J. (1998). The effect of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *British journal of haematology* 101, 369-373.

Metschnikoff, E. (1891). Lecture on Phagocytosis and Immunity. *British medical journal* 1, 213-217.

Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2015). How Is Fe-S Cluster Formation Regulated? *Annu Rev Microbiol* 69, 505-526.

Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., and Roth, M.P. (2009). Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nature genetics* 41, 478-481.

Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T.R., Ravetch, J.V., Kinet, J.P., and Galli, S.J. (1997). Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *The Journal of clinical investigation* 99, 901-914.

- Molinaro, A., Holst, O., Di Lorenzo, F., Callaghan, M., Nurisso, A., D'Errico, G., Zamyatina, A., Peri, F., Berisio, R., Jerala, R., *et al.* (2015). Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chemistry* 21, 500-519.
- Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., and Kaplan, G. (1994). Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med* 180, 1499-1509.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Murray, M.J., Murray, A.B., Murray, M.B., and Murray, C.J. (1978). The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *British medical journal* 2, 1113-1115.
- Najmi, N., Kaur, G., Sharma, S.K., and Mehra, N.K. (2010). Human Toll-like receptor 4 polymorphisms TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile influence susceptibility and severity of pulmonary tuberculosis in the Asian Indian population. *Tissue Antigens* 76, 102-109.
- Nathan, D., Oski, F., Ginsburg, D., Orkin, S., and Look, A. (2003). *Hematology of infancy and childhood* Vol 6 (Philadelphia: Pa:Saunders).
- Nemeth, E., Preza, G.C., Jung, C.L., Kaplan, J., Waring, A.J., and Ganz, T. (2006). The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 107, 328-333.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., and Ganz, T. (2004a). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation* 113, 1271-1276.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004b). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090-2093.
- Nemeth, E., Valore, E.V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., and Ganz, T. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101, 2461-2463.
- Netea, M.G., Wijmenga, C., and O'Neill, L.A. (2012). Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 13, 535-542.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8780-8785.

- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., and Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of clinical investigation* *110*, 1037-1044.
- Nugraha, J., and Anggraini, R. (2011). NRAMP1 polymorphism and susceptibility to lung tuberculosis in Surabaya, Indonesia. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* *42*, 338-341.
- Olakanmi, O., Schlesinger, L.S., Ahmed, A., and Britigan, B.E. (2002). Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. *The Journal of biological chemistry* *277*, 49727-49734.
- Olakanmi, O., Schlesinger, L.S., and Britigan, B.E. (2007). Hereditary hemochromatosis results in decreased iron acquisition and growth by *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages. *Journal of leukocyte biology* *81*, 195-204.
- Ottenhoff, T.H., and Kaufmann, S.H. (2012). Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog* *8*, e1002607.
- Pandey, R., and Rodriguez, G.M. (2012). A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice. *Infection and immunity* *80*, 3650-3659.
- Parish, C.R. (1971). Immune response to chemically modified flagellin. II. Evidence for a fundamental relationship between humoral and cell-mediated immunity. *J Exp Med* *134*, 21-47.
- Parish, C.R. (1973). Immune response to chemically modified flagellin. IV. Further studies on the relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Cellular immunology* *6*, 66-79.
- Parish, C.R., and Liew, F.Y. (1972). Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *J Exp Med* *135*, 298-311.
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., and Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry* *276*, 7806-7810.
- Pauk, M., Grgurevic, L., Brkljacic, J., Kufner, V., Bordukalo-Niksic, T., Grabusic, K., Razdorov, G., Rogic, D., Zuvic, M., Oppermann, H., *et al.* (2015). Exogenous BMP7 corrects plasma iron overload and bone loss in *Bmp6*^{-/-} mice. *International orthopaedics* *39*, 161-172.
- Petry, N., Egli, I., Zeder, C., Walczyk, T., and Hurrell, R. (2010). Polyphenols and phytic acid contribute to the low iron bioavailability from common beans in young women. *The Journal of nutrition* *140*, 1977-1982.

- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A.S., Datta, V., Lauth, X., Johnson, R.S., and Nizet, V. (2006). TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood* *107*, 3727-3732.
- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A.S., Schuepbach, R.A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V.H., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *The Journal of clinical investigation* *117*, 1926-1932.
- Pietrangelo, A., Dierssen, U., Valli, L., Garuti, C., Rump, A., Corradini, E., Ernst, M., Klein, C., and Trautwein, C. (2007). STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* *132*, 294-300.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loreal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of biological chemistry* *276*, 7811-7819.
- Pinilla-Tenas, J.J., Sparkman, B.K., Shawki, A., Illing, A.C., Mitchell, C.J., Zhao, N., Liuzzi, J.P., Cousins, R.J., Knutson, M.D., and Mackenzie, B. (2011). Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. *American journal of physiology Cell physiology* *301*, C862-871.
- Pissia, M., Polonifi, K., Politou, M., Lilakos, K., Sakellaropoulos, N., and Papanikolaou, G. (2004). Prevalence of the G320V mutation of the HJV gene, associated with juvenile hemochromatosis, in Greece. *Haematologica* *89*, 742-743.
- Poli, M., Asperti, M., Ruzzenenti, P., Regoni, M., and Arosio, P. (2014). Hepcidin antagonists for potential treatments of disorders with hepcidin excess. *Frontiers in pharmacology* *5*, 86.
- Quesniaux, V., Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yeremeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., *et al.* (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *6*, 946-959.
- Raghu, B., Sarma, G.R., and Venkatesan, P. (1993). Effect of iron on the growth and siderophore production of mycobacteria. *Biochemistry and molecular biology international* *31*, 341-348.
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* *12*, 352-366.
- Rausa, M., Pagani, A., Nai, A., Campanella, A., Gilberti, M.E., Apostoli, P., Camaschella, C., and Silvestri, L. (2015). Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron overload? *PLoS One* *10*, e0122696.

Rocher, C., and Singla, D.K. (2013). SMAD-PI3K-Akt-mTOR pathway mediates BMP-7 polarization of monocytes into M2 macrophages. *PLoS One* 8, e84009.

Rocher, C., Singla, R., Singal, P.K., Parthasarathy, S., and Singla, D.K. (2012). Bone morphogenetic protein 7 polarizes THP-1 cells into M2 macrophages. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90, 947-951.

Rodrigues, P.N., Gomes, S.S., Neves, J.V., Gomes-Pereira, S., Correia-Neves, M., Nunes-Alves, C., Stolte, J., Sanchez, M., Appelberg, R., Muckenthaler, M.U., *et al.* (2011). Mycobacteria-induced anaemia revisited: a molecular approach reveals the involvement of NRAMP1 and lipocalin-2, but not of hepcidin. *Immunobiology* 216, 1127-1134.

Rodriguez, G.M., and Neyrolles, O. (2014). Metallobiology of Tuberculosis. *Microbiol Spectr* 2.

Rodriguez, G.M., and Smith, I. (2006). Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* 188, 424-430.

Rouault, T., and Harford, J. (2000). Translational control of ferritin synthesis. In *Translational Control of Gene Expression*.

Rouault, T.A. (2015). Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function. *Nature reviews Molecular cell biology* 16, 45-55.

Sakamori, R., Takehara, T., Tatsumi, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., and Hayashi, N. (2010). STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *Journal of gastroenterology* 45, 244-248.

Samodai, L., Kiss, L., Kolozsy, Z., and Mohacsi, L. (1991). The efficacy of intravesical BCG in the treatment of patients with high risk superficial bladder cancer. *International urology and nephrology* 23, 559-567.

Sanchez-Mejorada, G., and Rosales, C. (1998). Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *Journal of leukocyte biology* 63, 521-533.

Sanchez, D., Rojas, M., Hernandez, I., Radzioch, D., Garcia, L.F., and Barrera, L.F. (2010). Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death. *Cellular immunology* 260, 128-136.

Saraav, I., Singh, S., and Sharma, S. (2014). Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? *Immunology and cell biology* 92, 741-746.

Scanga, C.A., Bafica, A., Feng, C.G., Cheever, A.W., Hieny, S., and Sher, A. (2004). MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infection and immunity* 72, 2400-2404.

Schaible, U.E., Collins, H.L., Priem, F., and Kaufmann, S.H. (2002). Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 196, 1507-1513.

Schmidt, P.J., Toran, P.T., Giannetti, A.M., Bjorkman, P.J., and Andrews, N.C. (2008). The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism* 7, 205-214.

Schroeder, H. (2004). The trace elements and man. In *The best of health*, S. Zerden, ed.

Seligman, P.A., Kovar, J., and Gelfand, E.W. (1992). Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 60, 19-26.

Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity* 66, 5224-5231.

Sendamarai, A.K., Ohgami, R.S., Fleming, M.D., and Lawrence, C.M. (2008). Structure of the membrane proximal oxidoreductase domain of human Steap3, the dominant ferrireductase of the erythroid transferrin cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7410-7415.

Shalhoub, J., Falck-Hansen, M.A., Davies, A.H., and Monaco, C. (2011). Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *Journal of inflammation* 8, 9.

Sheldon, J.R., Laakso, H.A., and Heinrichs, D.E. (2016). Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogens. *Microbiol Spectr* 4.

Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., and Camaschella, C. (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell metabolism* 8, 502-511.

Simon, M., Bourel, M., Fauchet, R., and Genetet, B. (1976). Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 17, 332-334.

Smith, A.M., Rahman, F.Z., Hayee, B., Graham, S.J., Marks, D.J., Sewell, G.W., Palmer, C.D., Wilde, J., Foxwell, B.M., Gloger, I.S., *et al.* (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med* 206, 1883-1897.

Snow, G.A. (1970). Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol Rev* 34, 99-125.

Soe-Lin, S., Apte, S.S., Mikhael, M.R., Kayembe, L.K., Nie, G., and Ponka, P. (2010). Both Nramp1 and DMT1 are necessary for efficient macrophage iron recycling. *Experimental hematology* 38, 609-617.

Sow, F.B., Alvarez, G.R., Gross, R.P., Satoskar, A.R., Schlesinger, L.S., Zwilling, B.S., and Lafuse, W.P. (2009). Role of STAT1, NF-kappaB, and C/EBPbeta in the macrophage transcriptional regulation of hepcidin by mycobacterial infection and IFN-gamma. *Journal of leukocyte biology* 86, 1247-1258.

Sow, F.B., Florence, W.C., Satoskar, A.R., Schlesinger, L.S., Zwilling, B.S., and Lafuse, W.P. (2007). Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *Journal of leukocyte biology* 82, 934-945.

Sow, F.B., Nandakumar, S., Velu, V., Kellar, K.L., Schlesinger, L.S., Amara, R.R., Lafuse, W.P., Shinnick, T.M., and Sable, S.B. (2011). Mycobacterium tuberculosis components stimulate production of the antimicrobial peptide hepcidin. *Tuberculosis (Edinb)* 91, 314-321.

Spellberg, B., and Edwards, J.E., Jr. (2001). Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32, 76-102.

Steg, A., Leleu, C., Debre, B., Boccon-Gibod, L., and Sicard, D. (1989). Systemic bacillus Calmette-Guerin infection in patients treated by intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *Progress in clinical and biological research* 310, 325-334.

Steinbicker, A.U., Sachidanandan, C., Vonner, A.J., Yusuf, R.Z., Deng, D.Y., Lai, C.S., Rauwerdink, K.M., Winn, J.C., Saez, B., Cook, C.M., *et al.* (2011). Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood* 117, 4915-4923.

Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175, 342-349.

Takai, T. (2002). Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, 580-592.

Tanno, T., Bhanu, N.V., Oneal, P.A., Goh, S.H., Staker, P., Lee, Y.T., Moroney, J.W., Reed, C.H., Luban, N.L., Wang, R.H., *et al.* (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nature medicine* 13, 1096-1101.

Tanno, T., Porayette, P., Sripichai, O., Noh, S.J., Byrnes, C., Bhupatiraju, A., Lee, Y.T., Goodnough, J.B., Harandi, O., Ganz, T., *et al.* (2009). Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114, 181-186.

ten Dijke, P., and Arthur, H.M. (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 857-869.

Trimble, W.S., and Grinstein, S. (2007). TB or not TB: calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell* 130, 12-14.

Trousseau, A. (1872). True and false chlorosis. In *Lectures on Clinical*, pp. 95 – 117.

Trunz, B.B., Fine, P., and Dye, C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367, 1173-1180.

Tullius, M.V., Harmston, C.A., Owens, C.P., Chim, N., Morse, R.P., McMath, L.M., Iniguez, A., Kimmey, J.M., Sawaya, M.R., Whitelegge, J.P., *et al.* (2011). Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5051-5056.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., and Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14459-14463.

Valore, E.V., and Ganz, T. (2008). Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood cells, molecules & diseases* 40, 132-138.

van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., and van der Meer, J.W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews* 15, 294-309.

Van Dyken, S.J., and Locksley, R.M. (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual review of immunology* 31, 317-343.

Verga Falzacappa, M.V., Vujic Spasic, M., Kessler, R., Stolte, J., Hentze, M.W., and Muckenthaler, M.U. (2007). STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 109, 353-358.

Vergne, I., Chua, J., Lee, H.H., Lucas, M., Belisle, J., and Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4033-4038.

Vokurka, M., Krijt, J., Sulc, K., and Necas, E. (2006). Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 55, 667-674.

Wang, C.Y., Jenkitkasemwong, S., Duarte, S., Sparkman, B.K., Shawki, A., Mackenzie, B., and Knutson, M.D. (2012). ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *The Journal of biological chemistry* 287, 34032-34043.

Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *The Biochemical journal* 434, 365-381.

Wang, R.H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L., *et al.* (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism* 2, 399-409.

Wells, R.M., Jones, C.M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K.S., Sun, P., Wu, F., Tian, C., and Niederweis, M. (2013). Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 9, e1003120.

White, C., Yuan, X., Schmidt, P.J., Bresciani, E., Samuel, T.K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M.L., Lapierre, A., *et al.* (2013). HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell metabolism* 17, 261-270.

WHO (2001). Iron deficiency anaemia Assessment, Prevention, and Control A guide for programme managers (World Health Organisation), pp. 132.

WHO (2004). Vitamin and Mineral requirements in human nutrition.

Wilks, A. (2002). Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxidants & redox signaling* 4, 603-614.

Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 207, 535-552.

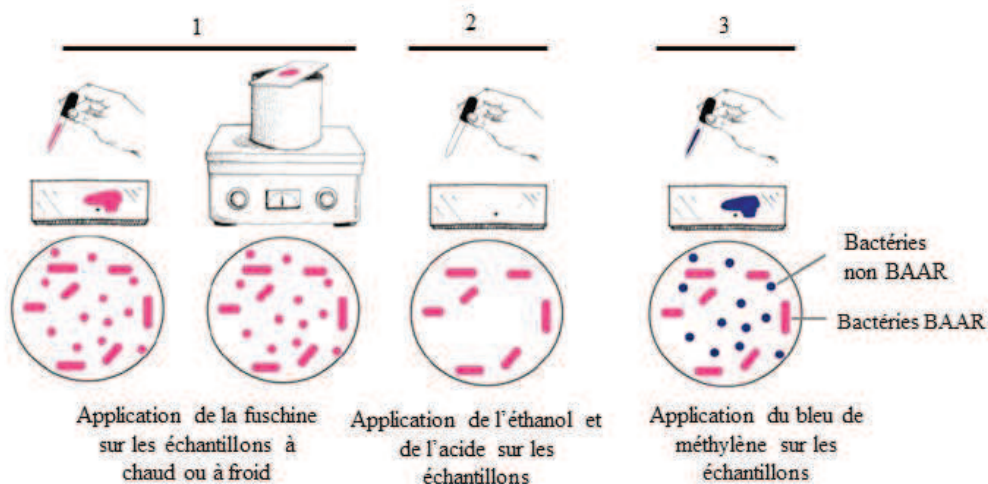
Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews Cardiology* 7, 77-86.

Wrighton, K.H., and Feng, X.H. (2008). To (TGF)beta or not to (TGF)beta: fine-tuning of Smad signaling via post-translational modifications. *Cellular signalling* 20, 1579-1591.

Zhang, C. (2014). Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein & cell* 5, 750-760.

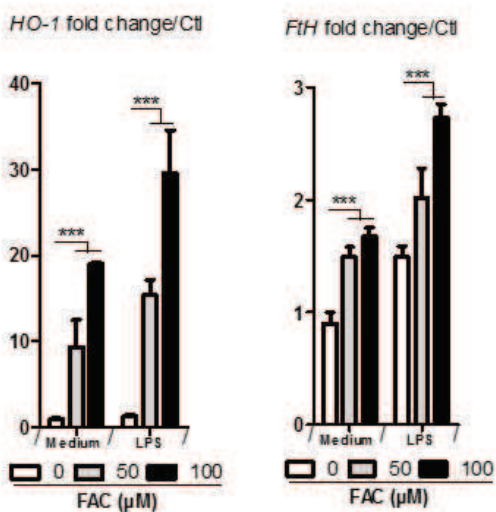
Annexes

Annexe 1: coloration Ziehl-Neelsen

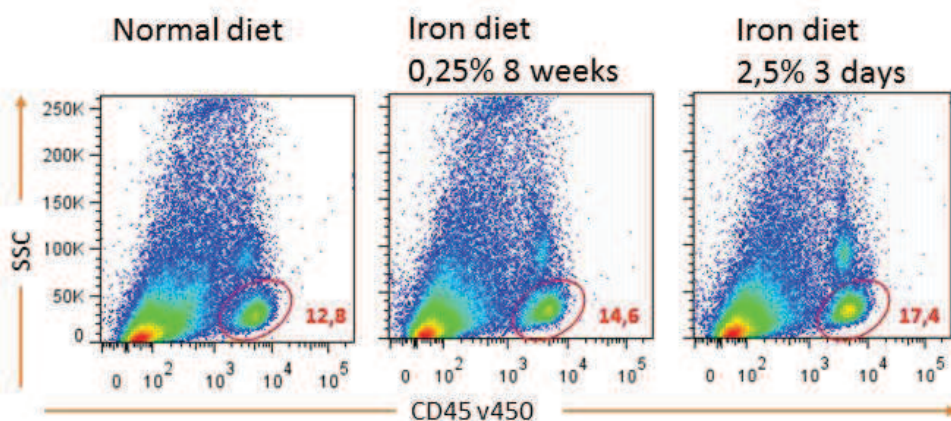


Annexe 2: Expression de *FtH* et *HO* dans les macrophages traités par le fer +/- LPS

Les cellules sont traitées par le fer pendant une nuit suivies d'une stimulation avec le LPS pendant 4 h. Les analyses ont été effectuées par qPCR.



Annexe 3: Pourcentage des lymphocytes au niveau du foie en réponse à un régime riche en fer. Les souris sont soumises à un régime standard ou riche en fer à des concentrations comme indiquées sur la figure. Une analyse par cytométrie en flux a été effectuée et les populations cellulaires entourées en rouge représentent le pourcentage des lymphocytes dans le foie.



Rafiou AGORO

Etude des interactions de l'axe hepcidine – ferroportine – fer et infection mycobactérienne

Résumé :

Le fer est un oligoélément indispensable pour tout organisme vivant. Le taux de fer systémique est régulé par la fixation de l'hepcidine, hormone synthétisée majoritairement par le foie mais également par les macrophages, à la ferroportine seul exporteur du fer. L'expression de ces deux protéines est régulée par le taux de fer et les processus inflammatoires. Des mécanismes d'acquisition et de séquestration du fer sont mis en place respectivement par le pathogène et l'hôte durant l'infection et régulent en parallèle l'expression de l'hepcidine et la ferroportine. Les travaux de recherche effectués dans le cadre de ma thèse ont porté d'une part sur un aspect fondamental à améliorer nos connaissances du mécanisme de régulation de l'axe hepcidine-ferroportine en condition inflammatoire et analyser l'influence du fer sur la réponse immune au niveau des macrophages; d'autre part une deuxième partie de mes recherches s'est orientée vers une étude plus appliquée du rôle du fer dans la réponse immune induite par une infection mycobactérienne. Nous montrons que l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine est différenciellement régulée en corrélation avec la polarisation des macrophages *via* les voies de signalisation intracellulaires PI3K et autres kinases. Le fer influence la polarisation des macrophages et module ainsi la réponse inflammatoire, et représente aussi un signal de danger capable de stimuler une voie MyD88-dépendante. Enfin, la réponse à l'infection *Mycobacterium bovis* BCG est modulée par un régime modérément enrichi en fer, réduisant la charge bactérienne et l'inflammation.

Mots clés: Fer, Hpcidine, Ferroportine, Macrophages, MyD88, *Mycobacterium bovis* BCG, souris

Iron –hepcidin-ferroportin axis and mycobacterial infection interactions

Abstract:

Iron is an essential trace element for all organisms. In mammals, systemic iron homeostasis relies on hepcidin, a peptide hormone synthesized by liver but also macrophages with defensin properties, and its target, the cell iron exporter ferroportin. Iron content and inflammation regulate hepcidin and ferroportin expression in mammals. During infection, pathogens develop sophisticated mechanisms for iron acquisition and sequestration. In response, host regulates the bioavailability of iron through hepcidin and ferroportin expression. First, this work contributes to improve our fundamental knowledge on hepcidin and ferroportin regulation during inflammation and analyzes the influence of iron in macrophages immune response. Second, the role of iron in response to mycobacterial infection was investigated. We show that hepcidin and ferroportin expression was regulated differentially in correlation with macrophages polarization through intracellular signaling pathways involving PI3K and others kinases. In addition, iron influenced macrophages polarization leading to a decrease of inflammatory response with a potent effect on MyD88 pathway stimulation. Finally, we showed that moderate iron-rich diet modulated *Mycobacterium bovis* BCG response reducing the bacterial burden and inflammation.

Keywords: Iron, Hpcidin, Ferroportin, Macrophages, MyD88, *Mycobacterium bovis* BCG, Mice



Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires
INEM - UMR7355 CNRS - Université d'Orléans
3B. rue de la Férollerie - 45071 - ORLEANS

inem

