Apport dans le métabolisme du fer du modèle murin macrophage autophagie déficient & relations fer - inflammation

Meriem Taleb

▶ **To cite this version:**

Meriem Taleb. Apport dans le métabolisme du fer du modèle murin macrophage autophagie déficient & relations fer - inflammation. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Orléans, 2021. Français. NNT : 2021ORLE3131 . tel-03638268

HAL Id: tel-03638268

https://theses.hal.science/tel-03638268

Submitted on 12 Apr 2022

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.

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires
UMR7355

THÈSE présentée par :

Meriem TALEB

soutenue le : **28 juin 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Biochimie et Biologie moléculaire

Apport dans le métabolisme du fer du modèle murin macrophage autophagie déficient

&

relations fer - inflammation

THÈSE dirigée par :

Catherine MURA	Professeur des universités - Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Carole PEYSSONNAUX	Directeur de recherche - Institut Cochin
Olivier LORÉAL	Directeur de recherche - Inserm Rennes

JURY :

Alain LEGRAND	Professeur des universités - Université d'Orléans
Benjamin G. DEWALS	Maître de conférences - Université de Liège
Carole PEYSSONNAUX	Directeur de recherche - Institut Cochin
Catherine MURA	Professeur des universités - Université d'Orléans
Olivier LORÉAL	Directeur de recherche - Inserm Rennes

Table des matières

Table des illustrations i
Liste des abréviations ii
Remerciements iii

Introduction 1
Chapitre 1. Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer 1
1. Biologie du fer 1
1.1. Propriétés chimiques du fer 1
1.2. Fonctions biologiques du fer 2
1.2.1. Utilisation mitochondriale du fer - Fer et mitochondrie 2
a. Biosynthèse des clusters fer-soufre (ISC) 2
b. Biosynthèse de l'hème 3
1.2.2. Utilisation du fer dans le processus d'érythropoïèse 4
1.3. Paramètres hématologiques 6
2. Stress oxydant et fer 6
3. Métabolisme du fer chez les mammifères 8
3.1. Recyclage du fer par le processus d'érythrophagocytose 9
3.2. Absorption intestinale 9
a. Fer non-héminique 10
b. Fer héminique 10
3.3. Export du fer 11
3.4. Circulation du fer 13
3.5. Transport et captation cellulaire du fer 14
a. Fer lié à la transferrine 14
b. Fer sérique 15
3.6. Captation cellulaire du fer 15
a. TfR1 15
b. Cycle de la transferrine 17
c. Le récepteur soluble à la transferrine (TfRs) 17
d. Captation indépendante du TfR 18
3.7. Fer cellulaire 18
3.7.1. Pool cellulaire de fer libre (LIP) 18
3.7.2. Stockage du fer par la ferritine 19
a. Ferritine 19
b. Hémosédérine 20
c. Ferritinophagie 21
d. Stockage mitochondrial 22
3.8. Transport intracellulaire du fer 23
3.9. Régulation du métabolisme du fer 24

3.9.1. Régulation systémique du fer 24
3.9.1.1. Régulation via l'axe hepcidine – ferroprotine 24
a. Mode d'action de l'hépcidine 25
3.9.1.2. Régulation de l'hepcidine par la voie – HFE/ TfR2 – HJV 26
3.9.1.3. Régulation de l'hepcidine par la voie – BMP 27
3.9.1.4. Régulation de l'hepcidine par le signal inflammatoire 28
3.9.1.5. Régulation négative de l'hepcidine par l'érythropoïèse 28
3.9.1.6. Régulation cellulaire par HIF 29
3.9.2. Régulation post-transcriptionnelle intracellulaire via le système IRP/ IRE 31
3.10. Défauts du métabolisme du fer 33
a. Les carences en fer 33
b. Les hémochromatoses héréditaires ou surcharges primaires 34
c. Les surcharges secondaires 35
d. Statut en fer élevé et autres pathologies 35
4. Transport vésiculaire ou trafic membranaire 38
4.1. Autophagie 38
4.2. Mécanismes moléculaires de l'autophagie 40
4.3. Autophagie sélective 41

Chapitre 2. Interactions entre métabolisme du fer et système immunitaire 42
1. Système immunitaire 42
1.1. Caractéristiques générales de la réponse immune 43
1.1.1. Réponse immune innée 43
a. La phagocytose 43
b. Explosion oxydative 46
c. Enzymes de dégradation (les bactéricides) 46
d. Présentation d'Ag 48
1.1.2. Réponse immune adaptative 49
a. Les cellules lymphocytaires 49
1.1.3. Expression de médiateurs de la réponse immune 52
2. Fer et système immunitaire 55
2.1. Immunométabolisme et fer 55
2.1.1. Fer et macrophages M1/M2 55
a. Facteurs inflammations influençant le métabolisme du fer 55
b. Influence du fer sur le phénotype des macrophages 57
c. Fer et lymphocytes T (LTs) 58
2.2. Inflammation et fer 59
a. Interactions entre réponse inflammatoire et métabolisme du fer 62
b. Agents pathogènes et leurs besoins en fer 62
2.3. Contrôle immunitaire inné de la disponibilité du fer vis-à-vis des pathogènes intracellulaires 63

2.4. Contrôle immunitaire inné de la disponibilité du fer vis-à-vis des pathogènes extracellulaires 67

Objectifs 70

Résultats 71

I. Étude du rôle de l'autophagie dans le métabolisme du fer dans les macrophages 71

a. Article 1: Targeted autophagy disruption reveals the central role of macrophage iron metabolism in systemic iron homeostasis 73

II. Étude de l'effet de fer sur l'immunomodulation des macrophages 123

b. Article 2: Cell iron status influences macrophage polarization 125

III. Étude des interactions métabolisme du fer/réponse immune 144

c. Article 3 : Étude des interactions métabolisme du fer/réponse immune lors d'une infection à *Nippostrongylus brasiliensis* chez la souris..... 146

Discussion 169

I. Autophagie et métabolisme du fer..... 169

a. L'altération de l'autophagie dans les macrophages entraîne une modification de la distribution du fer cellulaire 169

b. La perturbation du processus d'autophagie au niveau des macrophages est suffisante pour induire une surcharge généralisée en fer 172

II. Partie 2. Métabolisme du fer et réponse inflammatoire..... 176

a. La teneur en fer est un facteur environnemental impactant la plasticité des macrophages, leurs profils d'expression et leurs fonctions effectrices..... 176

b. Réponse immune aux helminthes et statut nutritionnel..... 177

Références bibliographiques..... 184

Table des illustrations

Figure 1 : Configuration électronique du fer selon le modèle de Bohr 1
Figure 2 : Modèle de biosynthèse de protéine Fe-S chez la levure et les eucaryotes supérieurs 3
Figure 3 : Voie de biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes 4
Figure 4 : Érythropoïèse 5
Figure 5 : Génération de ROS par le fer 7
Figure 6 : Diagramme récapitulant les événements nécessaires à l'initiation du mécanisme de ferroptose 7
Figure 7 : Principales voies de circulation du fer entre les différents tissus et cellules 8
Figure 8 : Mécanisme d'entrée et de sortie intestinale du fer 14
Figure 9 : Acquisition du fer par TfR-1 16
Figure 10 : Principe de détection du pool de fer libre (LIP) via des capteurs métalliques fluorescents 18
Figure 11 : Vue extérieure de la ferritine 20
Figure 12 : Voies de dépôt et de mobilisation du fer dans la ferritine et l'hémosidérine 21
Figure 13 : Mécanismes de régulation du métabolisme intracellulaire du fer 22
Figure 14 : Structure de l'hepcidine 24
Figure 15 : Principale ligne d'action hepcidine/ ferroportine 26
Figure 16 : Voies moléculaires de la régulation de l'hepcidine par le taux de fer circulant, hépatique et par l'inflammation 30
Figure 17 : Voie de régulation post-transcriptionnelle via le système IRP/ IRE 33
Figure 18 : Paramètres du métabolisme du fer dans des conditions de surcharge et de carence en fer 34
Figure 19 : Altérations de l'homéostasie systémique du fer causées par des déséquilibres du système de régulation hepcidine/ ferroportine 35
Figure 20 : Différents rôles de l'autophagie 39
Figure 21 : Schéma représentatif des trois voies autophagiques chez les mammifères 39
Figure 22 : L'autophagie implique la formation d'autophagosomes à double membrane 41
Figure 23 : Principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative 42
Figure 24 : Activation des différentes voies cellulaires de l'immunité innée 43
Figure 25 : Étapes clefs de la phagocytose 44
Figure 26 : Distribution corporelle et propriétés fonctionnelles respectives des sous- populations de macrophages tissulaires 45
Figure 27 : Génération des espèces réactives de l'oxygène à partir de diverses sources, qui comprennent les enzymes NADPH oxydase 46
Figure 28 : Arsenal microbicide des phagocytes 47
Figure 29 : Différentes populations granulocytaires, et mastocytes avec leurs médiateurs et rôles respectifs 47
Figure 30 : Voies d'apprêtement intracellulaire des antigènes protéiques 48
Figure 31 : Différenciation des LT $CD4^+$ effecteurs 51
Figure 32 : Synapse immunologique entre cellule dendritique DC et lymphocytes TCD4 et TCD8 52
Figure 33 : Principaux stimuli impliqués dans les voies de signalisation intracellulaires de la polarisation des macrophages 53
Figure 34 : Cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) dans les macrophages 54
Figure 35 : Différents sous-types d'ILC matures 55

Figure 36 : Caractérisation phénotypique des macrophages M1 et M2 56

Figure 37 : Méthodes par lesquelles les bactéries acquièrent du fer 63

Figure 38 : Corrélation entre les indices du métabolisme du fer chez les patients COVID-19 67

Figure 39 : Stratégies basées sur la modulation du métabolisme du fer comme mécanismes de résistance aux infections 69

Figure 40 : Représentation schématique récapitulant le phénotype des macrophages WT vs. Atg5$^{-/-}$.. 164

Figure 41 : Représentation schématique récapitulant le phénotype systémique des souris Atg5 LysM Cre. 168

Figure 42 : Représentation schématique récapitulant les interactions entre métabolisme de fer et infection helminthe.

..... 175

Liste des principales abréviations

Ac : Anticorps
ACD : Anemia of Chronic Disease
Adr : réductase de Adx
Adx : Adrénodoxine
Ag : Antigène
ALA : AminoLevulinAte
ALAD : ALA Déshydratase
ALR : AIM2 [absent in melanoma 2]-like receptors
APC : Cellule Présentatrice d'Ag
Arh1 : ferrédoxine réductase
Baso : Erythroblastes Basophiles
BCG : Bilié de Calmette et Guérin
BFU-E : Bust Forming Unit-Erythroid
BMP : Bone Morphogenetic Protein
CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne Hémoglobine
CCR : C-C chemokine Receptor
CD : Cluster de Différenciation
CFU-E : Colony Forming Unit Erythroid
CHC : Carcinome HépatoCellulaire
CID : ImmunoDéficience Combinée
CLAB : Bleu de calcéine
CLR : C-type Lectin Receptors
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNS : Central Nervous System
Copro III : Coproporphyrinogène III
COX : Cytochrome OXydase
CP : CeruloPlasmine
CPO : CoproPorphyrinogène Oxydase
CRP : Protéine C-Réactive
CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
Dcytb : cytochrome Duodénal b
DMT1 : Transporteur d'ions Métalliques Divalents 1
EPO : ErythroPOïétine
ERFE : ERythroFErrone
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
exVE : Viscéral extra-Embryonnaire
FcεRI : Récepteurs de haute affinité pour les IgE
FDA : Food and Drug Administration
Fe-S : Fer-Soufre
Fe-Tf : Fer lié à son transporteur Transferrine
FeCh : FerroChélatase
FLVCR-1 : Récepteur du Virus de la Leucémie Féline
FPN : FerroPortine
Fx : Frataxine
GDF15 : Growth Differentiation Factors 15
GM-CSF : Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et de Macrophages
GPI : GlycosylPhosphatidylInositol
GPx4 : Gluthation Peroxydase 4
GR : Globule Rouge
H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HBD : Heparin Binding Domain
HCMV : CytoMégaloVirus Humain
HCP1 : Heme Carrier Protein 1
HFE : High Fe
HIF : Facteurs Induits par Hypoxie
HJV : Hémojuvéline
HO-1 : Hème Oxygénase-1
HRE : Éléments de Réponses à Hypoxie
HRG : protéines régulatrices de l'hème
HSPA9 : heat shock protein family A (Hsp70) member 9
HSV1 : Virus de l'Herpès Simplex 1
Ht : Hématocrite
IFNg : Interféron gamma
IgG : Immunoglobuline G
IL- : Interleukine
ILC : Cellules Lymphoïdes Innées
IMM : Membranes Mitochondriales interne
IRE : Élément de Réponse au fer
IRG1 : Immune Responsive Gene 1
IRIDA : Anémie ferriprive
IRP : Protéines Régulatrices du fer
IRP1 : Immune Responsive Protein 1
ISC : Biosynthèse des Clusters fer-Soufre
JAK : Janus Kinase
LB : Lymphocyte B
Lf : Lactoferrine
LIP : Pool de fer Labile
LPS : Lipopolysaccharide
LTβR : Récepteur LTβ
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
M1 : Macrophages de type I
MA : Macrophages Alvéolaires
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MDM : Monocyte-Derived Macrophages
MFRNs : Mitoferines
MI : Macrophages Interstitials
Mrs3/4 : Mitoferrines
MtF : Ferritine Mitochondriale
NAFLD : stéatose hépatique non alcoolique
NCOA4 : Nucléaire Récepteur CO-Activateur
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
NFS1 : cystéine désulfurase
NK : Natural Killer
NLR : NOD-Like Receptor
NTBI : Non-Transferrin-Bound serum Iron
OMM : Membranes Mitochondriales externe
OrthoE : Erythroblastes Orthochromatiques
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PBGD : PorphoBilinoGène Désaminase
PCBP1 : Protéine Chaperons de fer cytosoliques
PCFT : Proton-Coupled Folate Transporter
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
Pmf : force motrice Protonique
PolyE : Erythroblastes Polychromatophiles
PPGIX : ProtoPorphyrinoGène IX
PPIX : ProtoPorphyrine IX
PPO : ProtoPorphyrinogène Oxydase
ProE : ProErythroblastes
PRR : Pattern recognition Receptor
RLR : RIG-I-Like Receptor
ROS : Reactive Oxygen Species
SD : Sprague-Dawley
SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SLC : Solute carrier proteins
Smad4 : Mothers against decapentaplegic homolog 4
SR : Scavenger Receptor
SRAS-CoV-2 : CoronaVirus 2 du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STING : Stimulator of Interferon Genes
TAM : Macrophages Associés au Tumeurs

TCA : Cycle de l'Acide Tricarboxylique
TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
TcR : Récepteur des cellules T
Tf : Transferrine
Tfh : Lymphocytes T auxiliaires folliculaires
TfR : Récepteur membranaire à la Transferrine
TfRs : Récepteur soluble à la Transferrine
Th : T helper
TIBC : Total Iron-Binding Capacity
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Facteur de Nécrose Tumorale
Treg : T régulatrices
TSAT : SATuration de la Transferrine,
TWGPH1 : TWisted Gastrulation Protein Homolog 1
UIBC : Unsaturated Iron Binding Capacity
URO3S : UROporphyrinogène 3 Synthase
UROD : UROporphyrinogène Décarboxylase
VDAC : Canal Anion Dépendant de la tension
VGM : Volume Globulaire Moyen
VHB : Virus de l'Hépatite B
VIH1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine 1

Remerciements

Arrivée au terme de la rédaction de ce mémoire, je tiens à exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous ceux qui, par leur soutien, leurs conseils ou leurs enseignements, m'ont aidé à sa réalisation.

Je tiens tout d'abord à destiner mes chaleureux remerciements, à Madame Carole Peyssonnaux, Monsieur Olivier Loréal, Monsieur Benjamin Dewals, et Monsieur Alain Legrand, d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury de soutenance.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Catherine Mura, pour m'avoir supervisé tout au long de ce projet. Je lui suis infiniment reconnaissante pour tous les enseignements qu'elle m'a prodigués, ainsi qu'aux charges de laboratoire qu'elle m'a confié. Je la remercie de m'avoir appris la persévérance, la ténacité, spécialement face à des manips qui fonctionnement pas tout à fait dès premier coup. J'ai énormément appris à ses côtés, et j'ai particulièrement appréciée travailler sous sa direction sur un projet de recherche tout aussi passionnant. Merci de m'avoir dévoilé les différentes facettes du métabolisme du fer.

Je tiens également à remercier Valérie Quesniaux, Directrice de Recherche CNRS de m'avoir accueillie au sein de l'INEM, de m'avoir aidée dans mes démarches administratives et d'avoir été attentive à nos travaux de recherches.

Je tiens par ailleurs à remercier Berhnard Ryffel, Directeur de Recherche émérite, pour son aide, conseils et encouragements. Je remercie aussi le Professeur Dieudonné Togbé pour ses conseils, ainsi que le Professeur François Erard, et le Dr. Madeleine Erard pour leurs encouragements.

Je remercie Monsieur Benjamin Dewals, maître de recherche à l'Université de Liège pour m'avoir fourni les larves *Nippostrongylus brasiliensis* et de m'avoir formé à la méthode d'extraction de Baermann.

Je profite de l'occasion pour exprimer ma reconnaissance envers tous les professeurs qui m'ont enseigné à l'université d'Orléans, à l'université de l'USTHB d'Alger, et à l'université Jagiellonian de Cracovie. C'est à eux tous que je dois ma passion pour la science.

J'exprime ma profonde gratitude à la grande famille de l'INEM, incluant l'équipe hôte/ pathogène, l'équipe smoke, l'équipe neuros, et les membres de la startup Artimmune, avec les permanents, ceux qui sont parties, et ceux qui sont arrivés, je préfère ne pas citer de noms aux risques d'en oublier certains, on apprend énormément rien qu'en vous observant travailler. Votre générosité, vos sourires, et votre intégrité resteront à jamais gravés dans ma mémoire.

Je tiens bien évidemment à remercier tout le personnel de l'INEM, du TAAM, et du CNRS, ainsi que l'ensemble des animaliers pour leur professionnalisme.

Je remercie les différents stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : Maya, Clément, Charuya, Paolyne, Léa, Sylvain, Delphine et Samantha. Je leur souhaite beaucoup de réussite dans leur vie professionnelle et personnelle.

Je remercie également les étudiants EDIFICE, Soukaina, Méline, Ophélie, Rémy et Robin, et leurs professeur SVT Mme Maury.

Je remercie mes collègues, et ami(e)s du laboratoire, les anciens : Rafiou, Sulaymane, Badreddine, Claire, Mégane, Quentin, Mathieux, Enico, Clara, Alicia, ceux de passages ainsi que ceux qui sont arrivés, je pense particulièrement à vous tous : Nicolas, Norinne et leurs petite fille Nina, Camille, les deux Sarah (immuno et neuro), Vidian, Elodie, Yasmine, Asma, Mathilde, ainsi que tous les autres étudiants et stagiaires, pour les différents échanges, soutien et encouragements. Je remercie également mes ami(e)s du CBM, Chayma, Nadira, et Oliver. Vous êtes les meilleurs.

Je remercie également tous mes ami(e)s d'ici ou d'ailleurs, ainsi que toutes ces belles âmes rencontrées tout au long de cet exaltant périple. Je remercie particulièrement Djalil, Badreddine et Fatima, Sean, Tamil et Mena, Yasmine et Fatima, ainsi que mes anciennes clocatrices, Erika, Graicey, Madison et Daniela pour leurs gentilles attentions.

Je remercie mes deux frères, ma belle-sœur et mes deux petites nièces pour leur amour sincère. Je remercie également oncles, tantes cousins et cousines. Je pense particulièrement à ma grand-mère, mamie Zakia, ainsi qu'à mon défunt grand père, papi Moussa, qui 45 ans auparavant à séjourner dans cette même ville dans le cadre de son activité professionnelle.

Mes pensées vont naturellement à mon autre grand-mère, yaya Sakoura, et mon oncle Mohamed, qui nous ont quitté au commencement de cette thèse, votre droiture, votre amour pur, et votre générosité resteront à jamais mon modèle de vie.

Je tiens à remercier mes parents pour leur amour pur et inconditionnel, leurs amitiés, leurs soutiens sans faille et leurs encouragements ! Je ne saurai mettre par écrit toute la gratitude que j'ai à votre égard. MERCI pour tout.

Enfin, un grand merci à toi Mehdi pour ta présence et ton soutien.

Un immense merci s'impose également envers tous ces animaux et souris qui, à l'encontre de leurs grès, sont sacrifiés pour l'avancement de la Science.

Mon cœur m'a dit : « Je veux savoir, je veux connaître ! Instruis-moi, Khayyâm, toi qui as tant travaillé ! » J'ai prononcé la première lettre de l'alphabet, et mon cœur m'a dit : « Maintenant, je sais. Un est le premier chiffre du nombre qui ne finit pas... »

Les quatrains (rubayat) d'Omar Khayyâm

INTRODUCTION

On m'a dit : « Tu n'es que cendres et poussières. »
On a oublié de me dire qu'il s'agissait de poussières d'étoiles. Hubert Reeves

Chapitre 1. Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer

1. Biologie du fer

1.1. Propriétés chimiques du fer

Du fait de sa stabilité, le fer est le quatrième élément le plus abondant sur terre et le deuxième métal après l'aluminium. Il fait partie du groupe 8 du tableau périodique, celui des métaux de transitions, caractérisés par une orbitale « d » incomplète (Figure 1). Il présente différents degrés d'oxydation, allant de la forme -II à +VI, et dont les principaux étant les états II (d6), fer ferreux soluble, et l'état III (d5), fer ferrique, forme insoluble à pH physiologique. Son fort potentiel redox, lui permettant de passer alternativement d'une forme à une autre, lui confère des propriétés uniques dans les systèmes biologiques, et est en effet nécessaire à quasiment toute forme de vie sur terre. Ce métal de transition est principalement utilisé pour transporter l'oxygène ou catalyser des réactions de transfert d'électrons. Le fer complexé à de nombreuses molécules organiques génère des métalloprotéines impliquées dans une large gamme de réactions métaboliques qui assurent de nombreux processus cellulaires vitaux telles que la respiration, la prolifération, la différenciation, ou la génération de neurotransmetteurs (Crichton 2016).

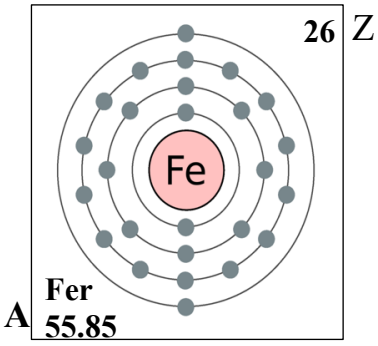


Figure 1. *Configuration électronique du fer selon le modèle de Bohr. **A** masse atomique, **Z** numéro atomique, configuration électronique Fe.$1s^2$ $2s^2$ $2p^6$ $3s^2$ $3p^6$ $4s^2$ $3d^6$.*

La présence de fer dans le sang a été noté pour le première fois par deux chimistes français Louis Lemery (1679-1743) et François Etienne Geoffrey (1672-1737) dès 1713. Bien que son rôle soit inconnu à l'époque, ce métal a toujours suscité l'intérêt des biologistes, et de nombreux praticiens l'ont utilisé dans leurs stratégies thérapeutiques. Nous savons que Nicholas Monarde, médecin du XVIe siècle à Séville, Thomas Sydenham, ou Vincenzo Menghini, le premier à décrire que le fer est concentré dans les globules rouges, l'ont utilisé pour traiter un large éventail de maladies telles que l'acné, la tuberculose, l'aménorrhée, ou l'anémie (Haden1938).

La compréhension des mécanismes sous-jacents de l'homéostasie du fer a considérablement progressé notamment avec l'identification et la caractérisation d'un grand nombre de protéines effectrices.

1.2. Fonctions biologiques du fer

Le fer est un composant fonctionnel d'une pléthore de protéines essentielles aux processus métaboliques cellulaires. Le passage de la vie anaérobie à la vie aérobie a été une étape essentielle de l'évolution, l'oxygène facilitant le transfert d'électrons (Frey et Outten 2011). La fonction principale du fer réside dans la génération d'énergie *via* le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. Les enzymes de la chaîne respiratoire, ainsi que beaucoup d'autres enzymes vitales sont soit des protéines à centre fer-soufre, soit nécessitent du fer comme cofacteur.

De plus, chez les vertébrés un système circulatoire associé à des molécules et cellules spécialisées, permet de surmonter la limitation imposée par la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau, assure le transport de l'oxygène et alimente activement les cellules en oxygène. Ces transporteurs d'oxygène, les protéines globines, incluent l'hémoglobine contenue dans les érythrocytes responsable du transport de l'oxygène dans le sang, et la myoglobine qui sert de réserve d'oxygène et facilite le transport de l'oxygène à l'intérieur du muscle. La capacité des globines à fixer l'oxygène repose sur l'hème, groupement prosthétique contenant un atome de fer, dont l'oxygénation donne à l'hémoglobine et à la myoglobine leur couleur rouge caractéristique. Plusieurs autres protéines, nécessitent la présence de groupements prothétiques caractéristiques pour exercer leurs fonctions.

1.2.1. Utilisation mitochondriale du fer - Fer et mitochondrie

La mitochondrie qui participe à la synthèse de l'hème et des clusters fer-soufre (Fe-S) est l'un des sites essentiels d'utilisation du fer.

a. Biosynthèse des clusters fer-soufre (ISC)

Les protéines à centre Fe-S sont retrouvées dans tous les règnes du vivant et jouent un rôle crucial dans divers processus cellulaires. Chez les mammifères, ces protéines à cluster Fe-S sont impliquées, par exemple, dans les activités du métabolisme mitochondrial (complexe I et III de la chaîne respiratoire, aconitase, succinyl déshydrogénase et ferrochélatase), cytosoliques (IRP1), et nucléaires (homologue de l'endonucléase humaine III). Bien qu'il existe une gamme de configurations, les ISC se présentent principalement sous la forme [4Fe-4S] ou [2Fe-2S]. Ces groupes prothétiques sont assemblés au niveau des mitochondries, puis transférés au cytosol pour fixer les apoprotéines. L'assemblage implique des protéines d'échafaudage qui aident à l'incorporation du fer, comme la frataxine (Fx), et des enzymes de stabilisation telles que la cystéine désulfurase (NFS1) (Mühlenhoff *et al*. 2003) (Figure 2). Une mutation au niveau de la frataxine est à l'origine de l'ataxie de Friedreich, anomalie qui conduit à une augmentation du fer mitochondrial sans augmenter le taux cellulaire total de fer, provoquant une dégénérescence neurologique et cardiaque progressive (Pandolfo et Pastore 2009).

Le transfert de ces clusters Fe-S vers le cytosol et leurs acheminements aux protéines respectives sont facilités par les protéines chaperons HSPA9/HSC20 (Olive et Cowan 2018).

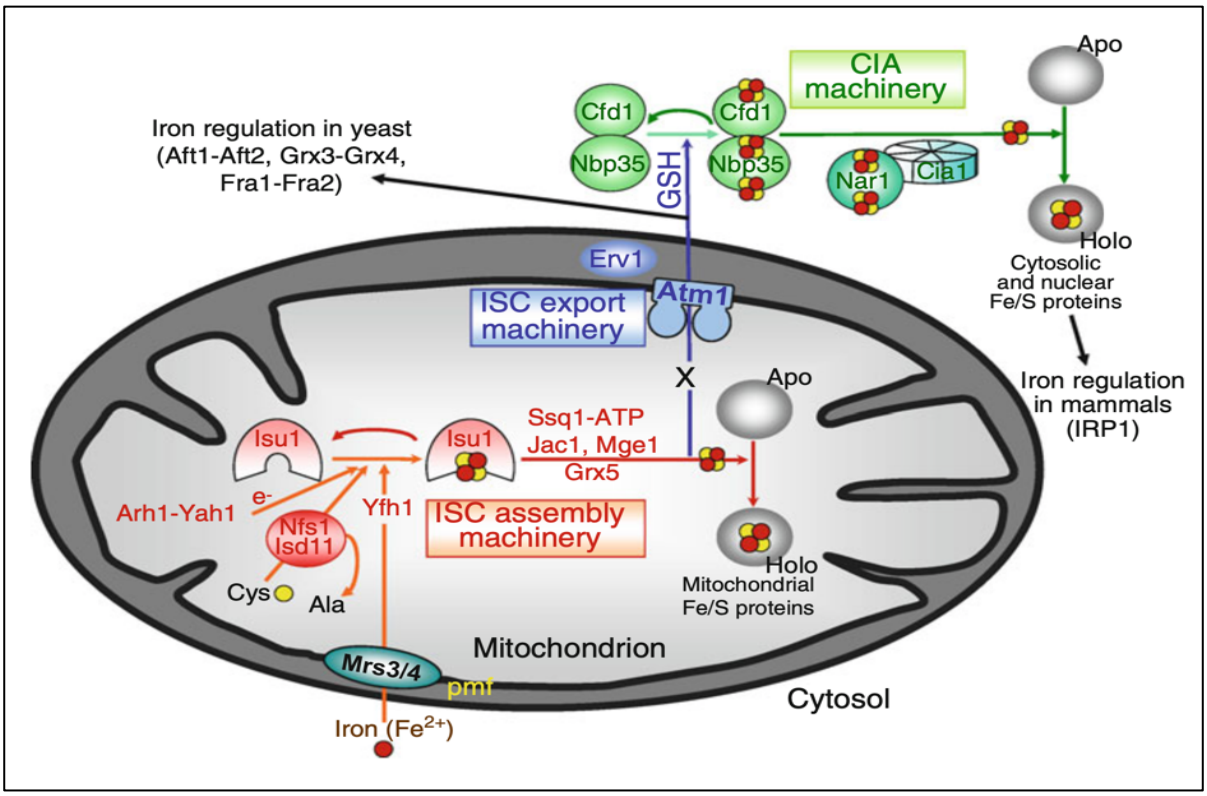


Figure 2. *Modèle de biosynthèse de protéine Fe-S chez la levure et les eucaryotes supérieurs. La biosynthèse des clusters Fe-S à l'intérieur des mitochondries comprend : a) génération d'un cluster Fe-S transitoire sur la protéine d'échafaudage Isu1 faisant intervenir le complexe de cystéine désulfurase Nfs1 – Isd11 comme donneur de soufre, Yfh1 (frataxine) comme donneur de fer et la chaîne de transfert d'électrons (e^-) constituée de la ferrédoxine réductase (Arh1) et de la ferrédoxine (Yah1) ; b) transfert du cluster Fe- S de Isu1 aux apoprotéines. Cette étape est facilitée par un système chaperon dédié et le monothiol glutarédoxine Grx5. Le système d'exportation ISC comprenant le transporteur ABC Atm1, exporte un composé inconnu (X) vers le cytosol, où il prend en charge la maturation des protéines Fe-S sur Cfd1– Nbp35. Les clusters Fe-S assemblés sont ensuite transférés aux apoprotéines via Nar1 et Cia1 pour l'assemblage de protéines Fe-S extra-mitochondriales. Abréviations : force motrice protonique pmf, glutathion GSH (D'après Lill et al. 2012).*

b. Biosynthèse de l'hème

L'hème est composé d'une partie organique, la protoporphyrine IX constituée de quatre cycles pyrroles et un atome de fer lié aux quatre atomes d'azote au centre du noyau protoporphyrinique. L'atome de fer dans l'hème peut être à l'état ferreux (Fe^{2+}) ou ferrique (Fe^{3+}) pour former respectivement la ferrohémoglobine qui fixe l'oxygène de manière réversible et la ferrihémoglobine, également appelée méthémoglobine.

La biosynthèse de l'hème nécessite l'activité catalytique séquentielle de huit enzymes. Chez les eucaryotes, les mitochondries abritent la 1re ainsi que les trois dernières réactions de production d'hème, tandis que les quatre étapes intermédiaires se déroulent dans le cytosol. La réaction est initiée par l'action des enzymes 5'-aminolevulinate synthase (ALAS1) et (ALAS2), qui catalysent la formation du 5'-aminolevulinate (ALA) par l'association de succinyl-CoA et de la glycine. ALAS1 est exprimée de

manière ubiquitaire, tandis que l'expression d'ALAS2 est limitée aux cellules érythroïdes (Ajioka *et al.* 2006). L'ALA quitte les mitochondries pour le cytosol où les quatre prochaines étapes ont lieu. L'ALA convertie en coproporphyrinogène III est transporté vers l'espace inter-membranaire mitochondrial, éventuellement par le transporteur ABCB6, puis sous l'action de la protoporphyrinogène oxydase l'oxydation produit la protoporphyrine IX. Cette dernière traverse ensuite la membrane interne, puis est convertie en hème par l'insertion d'un ion fer par la ferrochélatase. L'hème est soit utilisé dans les mitochondries, soit exporté vers le cytoplasme pour s'associer aux diverses hémoprotéines (Figure 3). La majeure partie est incorporée à l'hémoglobine, où le fer aide à fixer et à libérer l'oxygène. Les autres protéines héminiques sont la myoglobine qui assure une réserve d'oxygène pour le muscle squelettique, ainsi que les peroxydases et catalases qui jouent un rôle protecteur contre les radicaux libres et les différents cytochromes impliqués dans la respiration et/ou le métabolisme cellulaire (Napier *et al.* 2005).

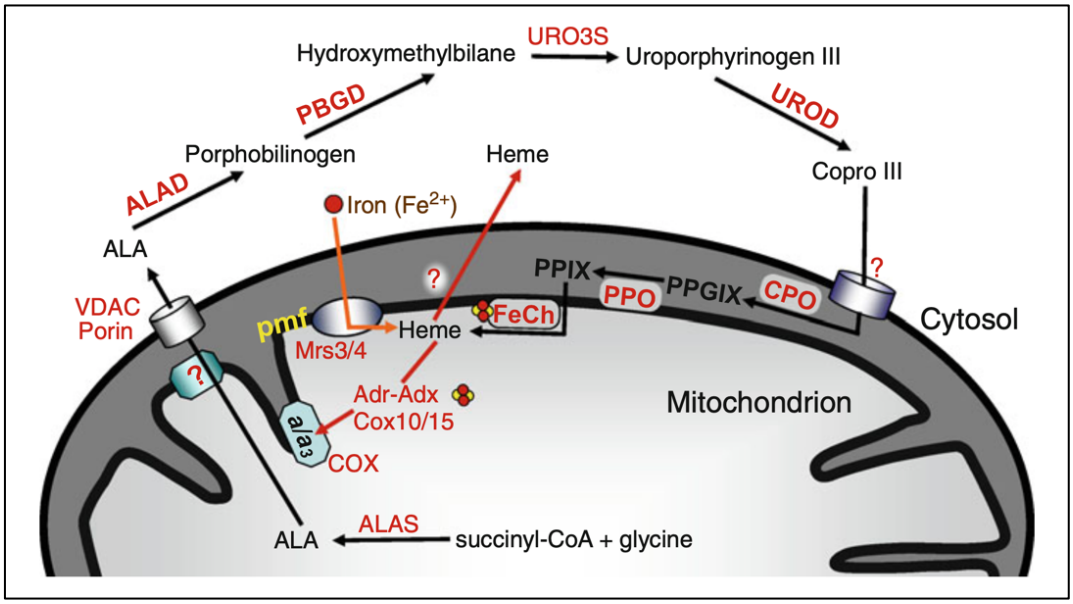


Figure 3. *Voie de biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes. Les mitochondries hébergent la première et les trois dernières réactions de production d'hème, tandis que quatre étapes intermédiaires sont effectuées dans le cytosol. Abréviations : coproporphyrinogène III (Copro III), protoporphyrinogène IX (PPGIX), coproporphyrinogène oxydase (CPO), protoporphyrinogène oxydase (PPO), protoporphyrine IX (PPIX), ferrochélatase (FeCh), mitoferrines Mrs3/4, potentiel membranaire (pmf), cytochrome oxydase, (COX), protéine Fe-S adrénodoxine (Adx), réductase de Adx (Adr), canal anion dépendant de la tension VDAC, ALAD ALA déshydratase, PBGD porphobilinogène désaminase, UROS uroporphyrinogène III synthase, UROD uroporphyrinogène décarboxylase (D'après Muckenthaler et Lill 2016).*

1.2.2. Utilisation du fer dans le processus d'érythropoïèse

Chez les mammifères environ 75% du fer est utilisé pour la synthèse de l'hème. En conditions physiologiques normales, les processus de production et de clairance des érythrocytes sont à l'équilibre. L'érythropoïèse a lieu dans la moelle osseuse chez l'adulte, et dans le foie et la rate pendant le développement fœtal. Une érythropoïèse extramédullaire peut réapparaître dans des conditions pathologiques. L'érythropoïèse se divise en deux stades majeurs, prolifération des progéniteurs

érythroïdes, et différenciation en érythrocytes anucléés matures. Le premier stade se caractérise par la différenciation du mégacaryocyte en un progéniteur érythroïdes précoce BFU-E (Bust Forming Unit-Erythroid), puis en progéniteur tardif CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) en présence de l'érythropoïétine (EPO), considérée comme premier signal de stimulation de l'érythropoïèse et produite au niveau des cellules interstitielles péritubulaires rénales chez l'adulte et dans les hépatocytes chez le fœtus. Puis l'étape de maturation dépendante du fer permet la différenciation des précurseurs érythroïdes précoces en érythroblastes, avec les stades successifs de proérythroblastes (ProE), érythroblastes basophiles (Baso), érythroblastes polychromatophiles (PolyE) et enfin érythroblastes orthochromatiques (OrthoE). Au cours de leurs différents stades de différenciation, les érythrocytes subissent de nombreux changements dynamiques perdant l'expression de certains marqueurs, laissant place à d'autres (Muckenthaler *et al*. 2017) (Figure 4). Ces marqueurs de surface permettent de distinguer les différentes étapes du développement des érythroblastes, comme par exemple chez la souris l'expression de CD71, correspondant à TfR1, Ter119, une glycoprotéine de surface présente du stade proérythroblaste précoce à celui de l'érythrocyte mature, et CD44 une glycoprotéine de surface des cellules souches (Chen *et al.* 2009 ; Yang et Lewis 2020 ; Morath *et al.* 2016).

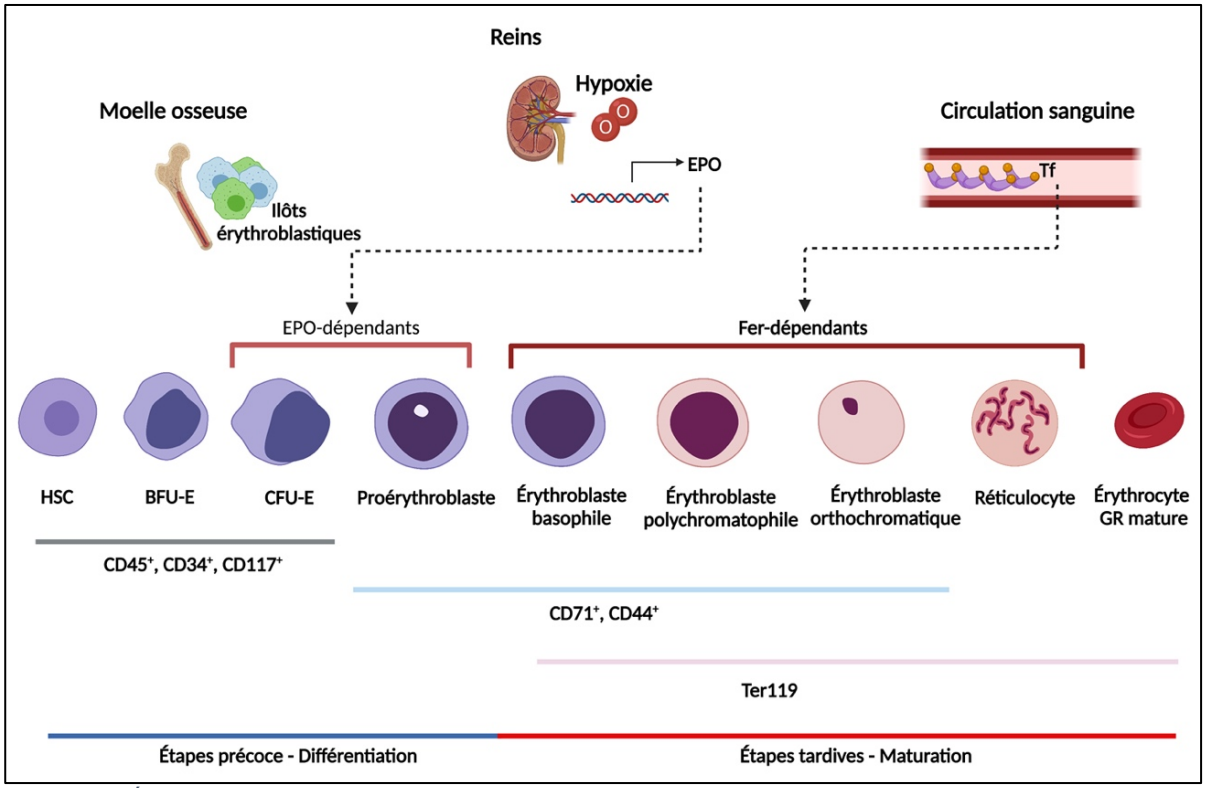


Figure 4. *Érythropoïèse. Principaux changements phénotypiques et physiologiques associés aux différents stades de différenciation et de maturation des cellules érythropoïdes. Ter119 est exprimé dans tous les sous-ensembles avec une expression plus faible dans les proérythroblastes. L'expression de CD71 (ou TfR1) est progressivement réduite tout au long de la maturation jusqu'à perte totale dans les stades les plus avancés. La production d'hémoglobine commence au dernier stade érythroblastique. La taille des cellules diminue progressivement au cours du processus de différenciation. L'extrusion des noyaux a lieu au stade érythroblastes orthochromatiques aboutit à des réticulocytes, dont les organites et l'ARN subissent une dégradation pour finalement créer des érythrocytes ou GR (globule rouge) matures. EPO : Erythropoietine.*

Les défauts fonctionnels de la synthèse de l'hème ou de transport du fer dans la mitochondrie entraînent divers événements pathologiques, et se manifestent par des anémies sidéroblastiques. Il s'agit d'un groupe de troubles caractérisés par une anémie hypochrome microcytaire, accompagnée d'une augmentation des marqueurs de fer circulants (fer sérique, ferritinémie et saturation de la transferrine), ainsi que de la présence de sidéroblastes annelés (mitochondries périnucléaires gorgées de fer).

La forme la plus fréquente d'anémie sidéroblastique héréditaire est celle liée à la mutation du gène *ALAS2*, qui comme cité précédemment catalyse la première étape de la voie de biosynthèse de l'hème dans les cellules érythroïdes. L'invalidation du gène *Alas2* chez la souris entraîne l'arrêt de la différenciation érythroïde et la mort embryonnaire après 11,5 jours sans formation d'anneaux sidéroblastes (Yamamoto et Nakajima 2000). L'expression partielle d'ALAS2 humain chez ces souris provoque la transformation de la plupart des cellules érythroïdes indifférenciées en anneaux, tandis que la majorité des cellules érythroïdes circulantes deviennent des sidérocytes. Ce résultat suggère que les défauts d'apport d'hème, même partiels, altèrent la maturation des sidéroblastes (Nakajima *et al*. 2006).

1.3. Paramètres hématologiques

La majeure partie du fer se trouve dans l'hémoglobine. De fait, les paramètres hématologiques sont des indicateurs de l'état du niveau de fer dans l'organisme et de son utilisation et permettent de définir des états pathologiques. L'examen des frottis sanguins renseigne sur la morphologie des hématies, forme et taille, la couleur des hématies reflétant leur teneur en hémoglobine. Une anémie ferriprive se caractérise ainsi par une microcytie et une hypochromie. Des informations complémentaires sont apportées avec d'autres paramètres tels que la numération des érythrocytes, le volume globulaire moyen (VGM), l'hématocrite (Ht, nombre de globules rouges x VGM), ainsi que la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (CCMH). La diminution du TCMH en dessous de la moyenne est le premier signe d'un défaut érythropoïétique, qui non corrigé entraîne une diminution du VGM et le développement d'une anémie hypochrome microcytaire (Vernet *et al*. 2001).

2. Stress oxydant et fer

La capacité du fer à osciller entre deux états d'oxydation est la clé de son activité biologique mais aussi de la base de sa toxicité (Pierre et Fontecave 1999). En effet, le fer peut initier de multiples réactions d'oxydoréduction provoquant l'apparition de radicaux libres oxygénés (ROS). Ainsi, par réaction de Fenton le fer libre Fe^{2+} réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sous-produit courant des processus cellulaires, pour former du Fe^{3+} et un radical hydroxyle hautement réactif ($OH^{\cdot}$) (Fenton 1894) (Figure 5). Ce dernier peut provoquer des dommages cellulaires graves en attaquant les lipides membranaires, les protéines cellulaires et l'ADN. De plus, le Fe^{3+} généré peut à nouveau réagir avec les radicaux superoxydes (sous-produits courants des processus métaboliques cellulaires) pour régénérer le

Fe^{2+} perpétuant le cycle dans une réaction connue sous le nom de cycle Haber-Weiss (Haber *et al.* 1934) (Figure 5).

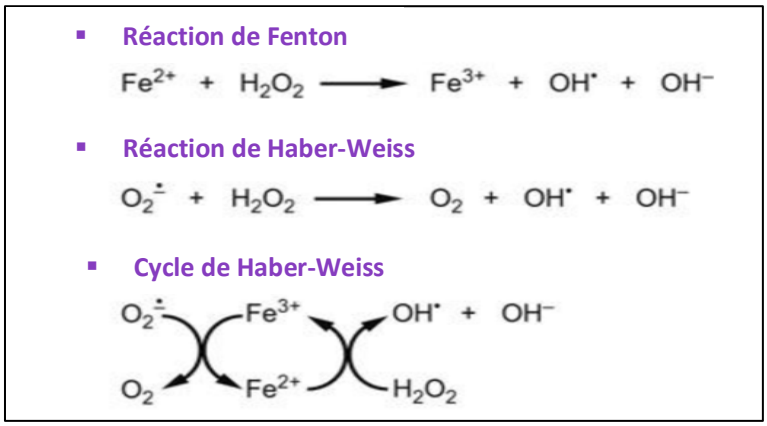


Figure 5. *Génération de ROS par le fer. De petites quantités de Fe^{2+} réagissent avec le peroxyde d'hydrogène et produisent du Fe^{3+} et le radical hydroxyle (OH) dans la réaction de Fenton. Le Fe^{3+} à son tour peut réagir avec le radical superoxyde (O_2^-) et régénérer du Fe^{2+} dans le cycle d'Heber-Weiss (Adapté de Pierre et Fontecave 1999).*

Plus récemment, la ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire nécrotique dépendante de la chimie du fer, a été identifiée grâce à l'utilisation d'un composé chimique, l'érastine (eradicator of Ras and ST-expressing cell), sélectionné sur sa capacité à tuer les cellules cancéreuses porteuses de l'oncogène Ras activé HRas (HRas V12). La ferropotose après exposition des cellules à ce composé semble dépendre de l'induction de trois événements simultanés, accumulation de fer libre (LIP), blocage du transport de la cystéine (système Xc- d'importation cystine/ Glutamate), et de la synthèse du glutathion (Figure 6). Ce dernier est à l'origine de l'inhibition de l'activité de l'enzyme gluthation peroxydase 4 (GPx4), élément clé dans les défenses de la peroxydation lipidique (Dixon *et al.* 2012). La ferroptose n'a jusqu'à présent été étudiée que dans un nombre limité de systèmes expérimentaux. Cependant, cette forme de mort cellulaire pourrait présenter un intérêt clinique, notamment dans des modèles *in vivo* afin d'envisager des stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses (Yang *et al.* 2014 ; Dixon *et al.* 2012).

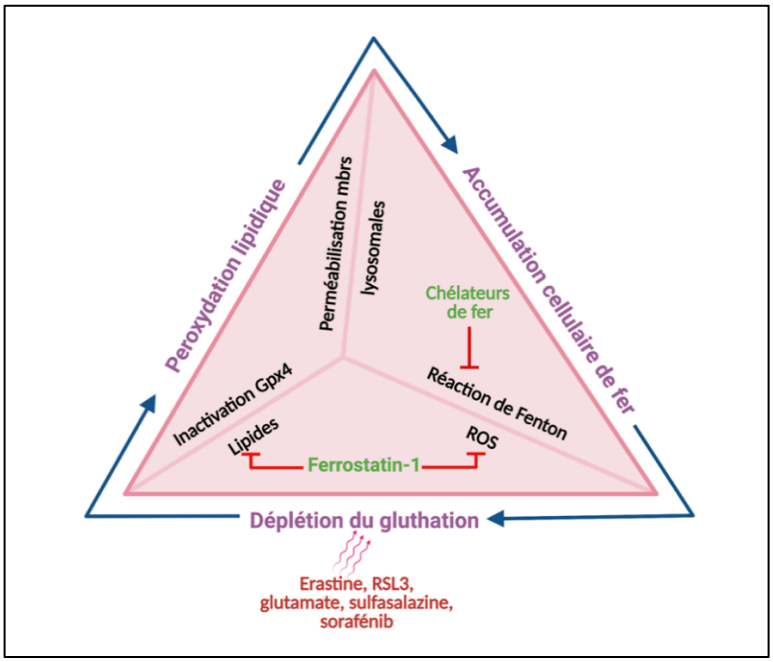


Figure 6. *Diagramme récapitulant les événements nécessaire à l'initiation du mécanisme de ferroptose. Rouge : inducteurs de la ferroptose. Vert : inhibiteurs de la ferroptose.*

3. Métabolisme du fer chez les mammifères

En raison du potentiel toxique et du besoin permanent de fer pour le bon fonctionnement cellulaire, l'organisme mobilise une grande variété de protéines qui régulent et coordonnent étroitement son métabolisme. Il existe deux mécanismes de contrôle du niveau de fer, un contrôle au niveau cellulaire et un au niveau systémique, qui permettent l'apport des quantités appropriées de fer en fonction de la demande physiologique de l'organisme.

Le fer se répartit majoritairement dans quatre compartiments, absorption, circulation, utilisation, et réserves. Le fer est absorbé par les entérocytes, se fixe à la transferrine et circule par voie sanguine, pour être distribué aux différents sites d'utilisation, principalement la moelle osseuse, où se déroule le processus d'érythropoïèse. Il est principalement retrouvé au niveau des érythroblastes médullaires, et des hématies circulantes. Le reste est réparti entre les macrophages, particulièrement ceux du système réticulo-endothélial qui après éryhrophagocytose remettent le fer en circulation et les hépatocytes qui prennent en charge les excès (Figure 7).

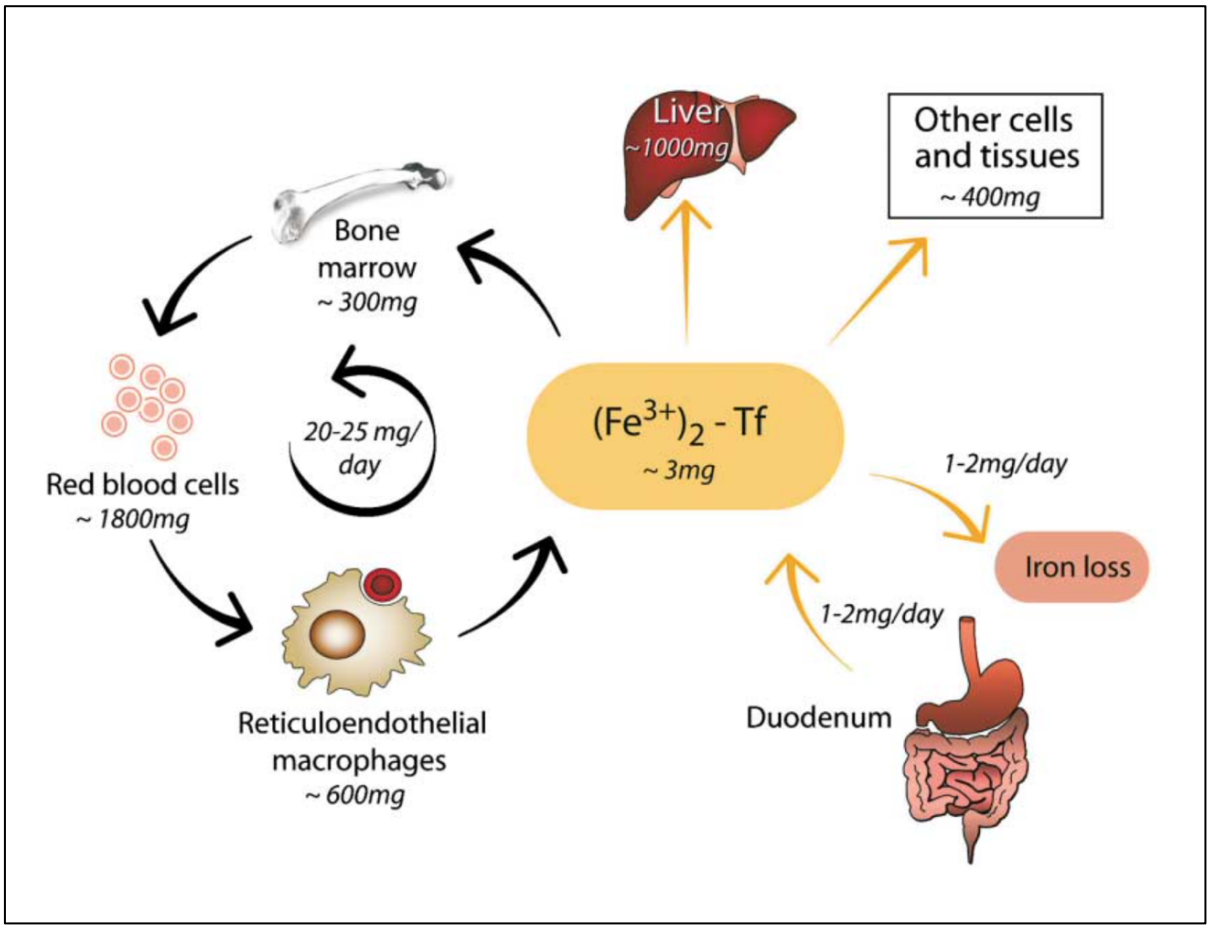


Figure 7. *Principales voies de circulation du fer entre les différents tissus et cellules. Fe-Tf : fer lié à son transporteur transferrine. (Hentz et al. 2004).*

3.1. Recyclage du fer par le processus d'érythrophagocytose

Au terme d'une demi-vie moyenne de 120 jours chez l'homme et 45 jours chez la souris, les érythrocytes sénescents circulants sont éliminés par les macrophages du système réticulo-endothélial, macrophages de la rate, de la moelle osseuse et du foie, *via* le mécanisme d'érythrophagocytose. Ainsi, les macrophages érythrophagocytiques sont les sites les plus riches en fer. Le vieillissement des globules rouges comprend de nombreux changements biochimiques, notamment l'apparition de néo-antigènes sur la membrane, la peroxydation de la membrane, l'externalisation des phosphatidylsérines, une diminution de l'activité métabolique ou des changements morphologiques. Ces altérations permettent de rendre l'érythrocyte spécifiquement reconnaissable par le macrophage pour son internalisation, qui s'effectue par des mécanismes dépendants ou non de l'opsonisation impliquant l'élément C3b du complément et les immunoglobulines fixées aux surfaces, et sa dégradation ultérieure dans le phagolysosome. L'hème oxygénase-1 (HO-1) clive l'hème et libère du monoxyde de carbone, de la biliverdine réduite en bilirubine antioxydante, et du fer ferreux. Il existe deux isoformes fonctionnelles de HO, l'isoforme HO-2 constitutive présente à un niveau plus élevé dans le cerveau, et HO-1 inductible en particulier par l'hème, son substrat naturel, l'hypoxie et le stress oxydatif.

Le fer est ensuite stocké dans la ferritine ou exporté dans le sang par la ferroportine ; cette dernière étant le seul exportateur transmembranaire de fer connu, l'efficacité de ce processus de recyclage du fer est liée à son expression. Ce mécanisme d'érythrophagocytose assure l'apport majoritaire du fer nécessaire à l'érythropoïèse chez les mammifères adultes (Beaumont et Canonne-Hergaux 2005).

Les pathologies associées aux dommages des globules rouges causent de multiples dégâts, par exemple, l'hémolyse peut libérer de l'hémoglobine et de l'hème, entrainant des lésions rénales aiguës, des anémies et de l'érythrophagocytose accrue peut altérer les capacités d'élimination physiologique des érythrocytes libérant de grandes quantités de fer toxique sous une forme non liée à la transferrine.

3.2. Absorption intestinale

La quantité totale en fer chez l'homme est estimée à environ 35 à 40 mg/ kg, ce qui équivaut approximativement 3 à 5 g chez un adulte sain d'environ 70 kg. Son apport dans le corps se fait exclusivement par voie alimentaire. L'apport alimentaire est estimé à environ 10 à 15 mg/jour, cependant, seule une infime quantité de 1 à 2 mg/jour est effectivement absorbée. Il est à noter que la quantité de fer absorbée varie selon l'âge et le sexe, avec une demande plus importante au cours du développement et plus réduite chez l'adulte. En raison des pertes menstruelles, les femmes ont besoin d'un apport en fer plus élevé que les hommes. L'absorption intestinale du fer représente un point critique de l'homéostasie systémique du fer, car contrairement à d'autres nutriments, il n'existe aucun mécanisme d'excrétion de fer chez les mammifères (Beguin 2002).

Le fer alimentaire se présente sous deux formes principales, le fer héminique provenant de la viande, et le fer non héminique, fer inorganique lié à des peptides, des sels ou des acides inorganiques présents

dans les végétaux et les produits laitiers (Miret *et al*. 2003). L'absorption digestive du fer a lieu de manière optimale au niveau du duodénum et de la partie proximale du jéjunum (McKie *et al.* 2001).

a. Fer non-héminique

L'absorption du fer inorganique dépend de sa solubilité et de son état d'oxydation. Dans l'alimentation, le fer non héminique est principalement présent sous forme de Fe^{3+} qui doit d'abord être réduit en Fe^{2+} pour être absorbé par les entérocytes. La réduction du Fe^{3+} est favorisée par le pH bas conféré par l'acide gastrique de l'estomac ou par la combinaison avec certains composés de l'alimentation tel que l'acide ascorbique. D'autres composants alimentaires, en revanche, comme les phytates ou les polyphénols, se lient au fer et forment des complexes qui réduisent sa biodisponibilité et son absorption. Les études portant sur l'absorption du fer chez l'animal mis à jeun préalablement à l'administration d'une source de fer radiomarquée ont en effet montré que le régime alimentaire est un facteur qui influence la capacité d'absorption du fer (Turnbull *et al.* 1962).

Au niveau de la membrane apicale des entérocytes une ferriréductase, la cytochrome duodénal b (Dcytb), assure la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+}. L'expression de Dcytb est régulée à la hausse en réponse à une carence en fer, à l'hypoxie ou à une érythropoïèse accrue, et des niveaux élevés de Dcytb sont associés à une forte absorption de fer dans les modèles de culture cellulaire (McKie 2008).
Les études sur des modèles murins déficients en Dcytb ne conduisent pas à des perturbations vitales du statut en fer (Gunshin *et al.* 2005), bien qu'une réduction du contenu en fer splénique et un défaut d'hémoglobinisation aient été noté (Choi *et al.* 2012). Contrairement aux rongeurs, les humains sont inaptes à synthétiser l'acide ascorbique, ce qui rend difficile l'extrapolation de ces observations de rongeurs aux humains.

Le fer réduit en Fe^{2+} est transporté à travers la membrane apicale des entérocytes *via* le transporteur d'ions métalliques divalents 1 (DMT1) codé par le gène *SLC11A2*, seul transporteur intestinal actuellement identifié de fer non héminique. DMT1 est une protéine transmembranaire active avec un échange de protons et couplée à un canal sodium/ hydrogène, dont l'action est favorisée à pH bas tel que celui du duodénum (Gunshin *et al*. 1997 ; Fleming *et al*. 1997). La perte de fonction DMT1 chez la souris n'est pas viables au-delà de 7 jours, en raison d'une profonde carence martiale, et d'une anémie hypochrome microcytaire très sévère. La déficience spécifique du gène *Slc11a2* dans l'intestin conduit à une réduction du taux de fer ainsi qu'à une anémie plus modérée (Gunshin *et al.* 2005).

b. Fer héminique

Le mécanisme d'entrée intestinale de l'hème n'est que partiellement élucidé. Il a été proposé que l'absorption d'hème pourrait s'effectuer soit par endocytose soit par transport actif par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique.

En 2005, HCP1 (Heme Carrier Protein 1) a été identifié comme potentiel candidat assurant le transport spécifique du fer héminique au niveau apical des entérocytes du duodénum de souris (Shayeghi *et al.* 2005). D'autres travaux ont par la suite révélé que cette protéine était plus active pour le transport du folate et a été renommée PCFT/ SLC46A1 (Proton-Coupled Folate Transporter) (Qiu *et al.* 2006). Cependant, une double fonctionnalité dans le transport du folate et de l'hème n'est pas exclue car il est rapporté que HCP1 joue également un rôle dans le métabolisme de l'hémoglobine par captation de l'hème au niveau des macrophages (Schaer *et al.* 2008).

En outre, la famille des protéines régulatrices de l'hème (HRG) identifiée chez *C. elegans*, joue un rôle essentiel dans le transport et l'homéostasie de l'hème chez les nématodes. Leurs orthologues sont également exprimés chez les vertébrés, notamment chez l'homme, en effet, les recherches par homologies ont identifié un gène hHRG-1 chez l'homme présentant une similitude de 23% et 65% avec les protéines HRG-1 du ver et du poisson zèbre, respectivement. De plus, chez l'homme, le gène hHRG-1 est localisé sur le chromosome humain 12q13, à environ 3,2 mégabases du gène codant pour le transporteur d'ions divalents (DMT-1), qui pourrait suggérer que les protéines HRG peuvent également jouer un rôle dans la biologie de l'hème chez les mammifères (Rajagopal *et al.* 2008).

Une fois dans le cytoplasme, l'hème est soit :

- exporté sous forme intacte vers la circulation sanguine, FLVCR1 (Virus de la Leucémie Féline) et ABCG2 (Protéine de résistance au cancer du sein) ont été identifiés comme exportateurs potentiels d'hème, et les études *in vitro* montrent en effet une forte expression de FLVCR1 par les lignées cellulaires intestinales et hépatiques (Quigley *et al.* 2004 ; Keel *et al.* 2008).
- dégradé dans les vésicules endosomales par l'hème oxygénase 1 (HO-1) en biliberdine/ bilirubine, monoxyde de carbone (CO), et le centre ferreux Fe^{2+} libéré dans la cellule rejoint le pool de fer non héminique (Maines 1997).

Les modèles murins de déficience pour le gène *Flvcr1* codant la protéine FLVCR et *Hmox*, codant pour HO-1 soutiennent le rôle de ces deux protéines dans le maintien de l'homéostasie du fer. Les souris knock-out *Flvcr1* développent une anémie macrocytaire avec arrêt de la maturation des proérythroblastes, ce qui suggère que l'exportation de l'excès d'hème des précurseurs érythroïdes est essentielle pour la survie cellulaire. En outre, FLVCR est nécessaire pour l'exportation de l'hème des macrophages au cours de l'érythrophagocytose, révélant que le trafic de l'hème est une composante importante de l'homéostasie du fer (Keel *et al.* 2008). De même, les souris knock-out *Hmox1*, présentent une anémie, de faibles taux de fer sérique et une augmentation des taux hépatiques et rénaux de fer. Ce phénotype est potentiellement dû à l'incapacité de recycler le fer héminique pour une réutilisation ultérieure (Poss et Tonegawa 1997 ; Yachie *et al.* 1999).

3.3. Export du fer

La sortie du fer de l'entérocyte est médiée par la ferroportine (FPN), codé par le gène *SLC40A1* qui fait partie de la famille des transporteurs de solutés (Solute carrier proteins SLC). A ce jour la

ferroportine est le seul exportateur de fer cellulaire identifié chez les mammifères, elle est exprimée de manière ubiquitaire, avec des niveaux plus importants dans les cellules spécialisées pour la mise en circulation du fer. Elle joue un rôle prépondérant dans les entérocytes après absorption alimentaire, mais aussi dans les macrophages, les hépatocytes, et les syncytiotrophoblastes placentaires (Abboud et Haile 2000 ; Donovan *et al.* 2000). De nombreuses études rapportent que l'expression de la ferroportine est localisée au niveau basolatéral des entérocytes, avec une expression plus importante au niveau du duodénum, principal site d'absorption du fer intestinal (McKie *et al.* 2000). Une possible expression de la ferroportine au niveau de la membrane apicale des entérocytes a été relevée, mais cela reste controversé (Thomas et Oates 2004). Dans les macrophages, la ferroportine semble résider dans les vésicules intracellulaires mais est rapidement transférée à la membrane plasmique suite à un apport en fer, notamment après érythrophagocytose (Delaby *et al.* 2005).

Les études de modèles murin ont montré que la délétion totale de la ferroportine est létale dès le stade embryonnaire (Donovan *et al.* 2005). Il en est de même pour les souris knock-out au niveau de la muqueuse intestinale conçues par un croisement d'animaux $Fpn^{flox/flox}$ avec des animaux exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de la villine (Donovan *et al.* 2005). L'explication de la létalité précoce de ces dernières vient du fait que l'expression du transgène villine est également étendue à l'endoderme viscéral extra-embryonnaire (exVE) qui assure le transport des nutriments embryonnaires maternels avant la formation du placenta (Marjou *et al.* 2004). Le modèle de délétion intestinale spécifique, *vil-Cre-ERT2* $Fpn^{flox/flox}$, inductibles au tamoxifène conduit à une anémie hypochrome modérée due à une rétention de fer dans la muqueuse intestinale appuyant le rôle essentiel de la ferroportine dans l'import du fer alimentaire. Ces modèles soulignent le rôle capital de la ferroportine intestinale pour constituer un stock approprié de fer dans les premiers stades de la vie. Par la suite, ce sont principalement les mécanismes de recyclage du fer à partir des érythrocytes qui assurent le maintien des niveaux adéquats à la demande de l'organisme. Le modèle murin *Fpn LysM Cre*, de déficience de la ferroportine au niveau des macrophages montre une augmentation des taux de fer tissulaire, dans les macrophages de la rate et du foie (Zhang *et al.* 2011). Cependant, ce phénotype de surcharge martiale, est accompagné d'une diminution des paramètres hématologiques, mais une anémie relativement légère, suggérant que les souris *knock-out* pourraient probablement augmenter leurs apports en fer intestinal par le biais de l'alimentation. Il est en effet décrit que l'absorption du fer est régulée par un mécanisme de contrôle négatif en retour, c'est-à-dire que plus il y a de fer dans le corps, moins le fer est absorbé par le tractus intestinal, et *vice versa* (Boron 2006). Une autre possibilité est que les souris *knock-out Fpn LysM Cre* pourraient utiliser des mécanismes d'exportation de l'hème sous sa forme intègre *via* l'exporteur Flvcr. Les deux hypothèses ont été soulevées par les auteurs de ce travail mais aucune des deux n'a été démontrée (Zhang *et al.* 2011).

3.4. Circulation du fer

La ferroportine exporte le fer ferreux (Fe^{2+}), cependant sa libération dans la circulation nécessite son oxydation en fer ferrique (Fe^{3+}). Au niveau de l'entérocyte cette réaction est assurée par l'héphaestine, une ferrioxydase membranaire cuivre dépendante, fortement exprimée au niveau basolatéral des entérocytes, mais faiblement exprimée dans les autres tissus. Des approches à la fois *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'héphaestine et la ferroportine colocalisent sur la membrane basolatérale des cellules intestinales, suggérant que ces deux protéines agissent de concert (Han et Kim 2007). Les souris avec la mutation *sla* du gène codant l'héphaestine (sex-linked anemia, *sla*) présentent une entrée normale du fer au niveau apical de l'entérocyte, mais un défaut de sortie de l'entérocyte caractérisée par une anémie microcytaire (Vulpe *et al.* 1999).

Dans la circulation, la ceruloplasmine (CP), un homologue circulant de l'héphaestine, oxyde le fer libéré par la ferroportine (Hellman et Gitlin 2002). L'acéruloplasminémie héréditaire, est un trouble autosomique récessif rare de l'homéostasie du fer causée par des mutations dans le gène de la céruloplasmine *(Cp).* Les patients atteints présentent des signes de surcharge hépatique en fer, une concentration élevée de fer sérique, de l'anémie microcytaire, ainsi que diabète, dégénérescence rétinienne périphérique, atteintes neurologiques, dont dystonie (Harris *et al*. 1995 ; Pérez-Aguilar *et al.* 2005). Contrairement aux phénotypes hémochromatosiques, la surcharge hépatique en fer est généralement asymptomatique dans l'acéruloplasminémie, et les patients ne développent pas de signes de dysfonctionnement hépatique (Loréal *et al.* 2002). Plusieurs modèles d'invalidation du gène *Cp* ont été développé. Chez la souris, l'invalidation du gène *Cp* montre une augmentation graduelle des taux de fer dans les cellules de Kupffer et les macrophages de la rate, ainsi que dans les hépatocytes. Ces souris ne présentent aucun défaut de captation du fer mais des altérations plutôt frappantes dans sa sortie des macrophages et des hépatocytes (Harris *et al.* 1999). Le phénotype de l'acéruloplasminémie observé chez la souris ne reproduit pas les observations cliniques chez l'homme. En effet, contrairement aux modèles de souris $Cp^{-/-}$, les patients atteints d'acéruloplasminémie ne développent pas de surcharge en fer dans les macrophages hépatiques et spléniques. Un autre modèle d'acéruloplasminémie chez le rat Sprague-Dawley a récemment montré un profil plus fidèle à celui observé chez l'homme. A l'instar du phénotype humain, ce modèle montre une surcharge en fer hépatocytaire, associée à une diminution du fer splénique. De plus, les concentrations plasmatiques de fer et la saturation de la transferrine sont réduites dans les animaux $Cp^{-/-}$ sans pour autant montrer de signes d'anémie (Kenawi *et al.* 2019). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de la céruloplasmine dans la mobilisation du fer contenu dans les compartiments de réserve. De plus, les données obtenues à partir d'études *in vitro* sur les cellules HeLa montrent un rôle stabilisateur de la CP *via* le glycosylphosphatidylinositol (GPI) de la ferroportine pour son expression au niveau de la surface cellulaire (Kono *et al.* 2010). Les modèles actuels d'acéruloplasminémie chez le rongeur ne reproduisent cependant pas les altérations neurodégénératives résultant d'anomalies de la céruloplasmine chez l'homme, indiquant d'autres rôles de cette protéine qui reste à caractériser.

La délétion combinée en céruloplasmine et en héphaestine, obtenus par croisement de souris knock-out *Cp* avec des souris *sla* entraine à la fois une surcharge tissulaire en fer, principalement dans les entérocytes duodénaux, le foie, le cœur et le pancréas, et une anémie ferriprive sévère avec de faible teneur en fer sérique. Ce modèle double knock-out met en évidence le rôle de l'héphaestine et de la céruloplasmine dans la distribution extra-intestinale du fer, soutenant l'importance des ferroxydases dans le maintien du niveau de fer systémique (Fuqua *et al.* 2018 ; Jiang *et al.* 2016).

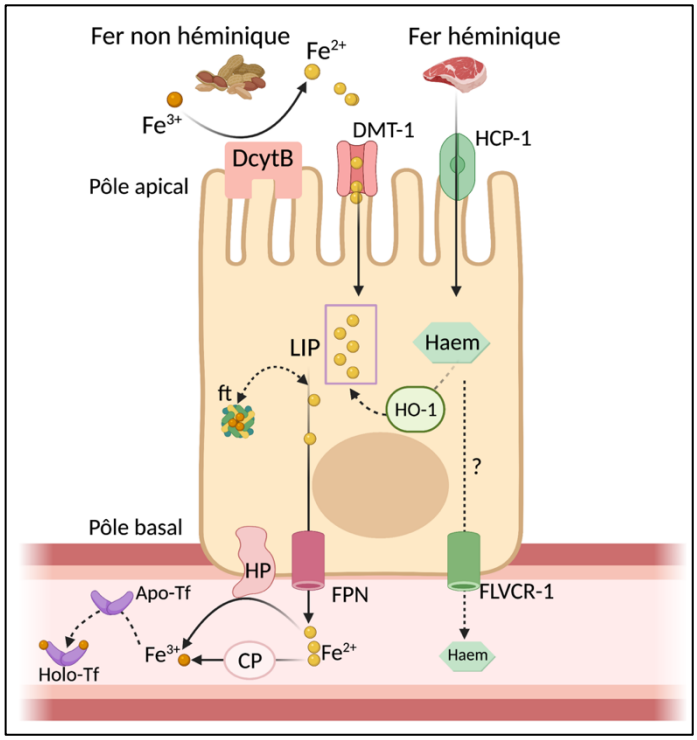


Figure 8. *Mécanisme d'entrée et de sortie intestinale du fer. Dcytb : Cytochrome duodénal b, DMT1 : transporteur des ions divalents, HCP-1 : transporteur de l'hème, HO-1 : hème oxygénase 1, Ft : ferritine, Hp : héphaestine, FPN : ferroportine, FLVCR-1 : récepteur du virus de la leucémie féline, CP : céruloplasmine, Tf : transferrine.*

3.5. Transport et captation cellulaire du fer

a. Fer lié à la transferrine

La transferrine (Tf) est une glycoprotéine sérique, de poids moléculaire de 80 kDa, principalement produite par le foie, dont la fonction majeure est le transport plasmatique du fer. La transferrine peut se lier de manière réversible au Fe^{3+} pour le transporter dans le sang vers les différents tissus. Il s'agit d'une globuline monomère portant 2 sites de captation de fer ferrique. Une fois la liaison Tf-Fe établie, un changement conformationnel de la transferrine se produit pour faciliter sa reconnaissance et sa liaison à son récepteur TfR1 sur les membranes cellulaires.

A l'état physiologique, la saturation de la transferrine est maintenue en moyenne à 30 % chez l'homme et 45% chez la souris. Ce taux de saturation de la transferrine varie en fonction du statut en fer de l'organisme et est l'un des paramètres biologiques indicatifs de la carence ou de la surcharge en fer. La synthèse de la transferrine est inversement proportionnelle à la quantité de fer présent dans la cellule. Une diminution des réserves en fer entraine une augmentation de la synthèse. La transferrine joue aussi un rôle dans l'absorption intestinale du fer : le pourcentage de fer alimentaire absorbé dépend du degré de saturation de la transferrine (McKnight *et al.* 1980; Bomford et Munro 1985).

L'hypotransferrinémie chez l'homme, une maladie génétique rare causée par des mutations du gène de la transferrine, ainsi que la souris mutée dans le gène de la transferrine se caractérisent par une anémie hypochrome microcytaire sévère avec surcharge tissulaire en fer généralisée, à l'exception des macrophages qui se révèlent exempts de fer (Craven *et al.* 1987). Le modèle de souris $^{hpx/hpx}$ avec une mutation dans le gène de la transferrine montre des signes sévères d'anémie, bien que ces animaux puissent vivre jusqu'à deux semaines après la naissance, ils n'atteignent pas l'âge adulte s'ils ne reçoivent pas d'injections hebdomadaires de sérum de souris ou d'apo-Tf. Il est intéressant de noter que lorsque le traitement est interrompu après sevrage, ces animaux survivent et continuent de croître mais restent pâles par rapport aux animaux témoins (Bernstein 1987). Les adultes survivants développent une anémie hypochrome sévère et une surcharge en fer élevée dans le tissu parenchymateux, tandis que les macrophages de la rate restent exempts de dépôts de fer (Weinstein *et al.* 2002). De plus, l'expression de l'hepcidine est totalement abolie chez ces souris $^{hpx/hpx}$, ce qui explique probablement l'augmentation de l'absorption intestinale (Trenor *et al.* 2000).

b. Fer sérique

Le taux de fer sérique ne varie que faiblement en fonction des apports alimentaires. Cependant, il est plus en lien avec le statut global en fer de l'individu et le niveau de saturation de la transferrine ; de plus le taux de fer sérique suit des variations nycthémérales. Il est augmenté en cas de surcharge martial, et diminué en cas de carence en fer mais aussi en situation d'inflammation, d'où l'importance d'associer ce paramètre au coefficient de saturation de la transferrine. En cas d'entrée accrue ou de surcharge en fer sévère, la capacité de la transferrine à se lier au fer dépasse la quantité de fer dans le sérum, ce qui conduit à l'apparition d'une forme de fer non liée à la transferrine dit NTBI. La nature chimique du NTBI est mal connu, il est néanmoins suggéré qu'il s'agit d'une forme liée à de petits anions comme le citrate, des chélateurs ou des protéines plasmatiques (Hider 2002).

3.6. Captation cellulaire du fer

a. TfR1

L'acquisition du fer lié à la transferrine par les cellules s'effectue par endocytose par l'intermédiaire de récepteur membranaire à la transferrine (TfR). Il existe deux types de TfR, TfR1 exprimé de manière

ubiquitaire et TfR2 exprimé plus spécifiquement dans les hépatocytes qui sera décrit ultérieurement (Gkouvatsos *et al.* 2012).

TfR1 est un récepteur exprimé de manière ubiquitaire. Cependant, il est plus largement exprimé au niveau des cellules nécessitantes des apports importants en fer, comme les précurseurs médullaires erythroblastiques et les cellules en division. TfR1 est surexprimé dans diverses cellules malignes, et plusieurs approches thérapeutiques anticancéreuses reposent sur le ciblage de TfR1 soit par des anticorps anti TfR1 spécifiques afin de bloquer la liaison Tf-TfR1 et diminuer l'apport en fer, soit pour délivrer spécifiquement des agents anticancéreux *via* les nanovecteurs liposomes fonctionnalisés par la transferrine pour permettre un adressage ciblé sur les cellules cancéreuses (Luria-Pérez *et al.* 2016).

Chez la souris, la délétion du gène TfR1 est létale au stade embryonnaire, et se caractérise par une anémie sévère et des anomalies neurologiques. De plus, les souris hétérozygotes portant une seule copie de l'allèle TfR1 présentent une anémie microcytaire hypochrome, avec des valeurs normales d'hémoglobine et d'hématocrite, expliquées par une augmentation compensatoire du nombre de globules rouges. L'haploinsuffisance en TfR1, génotype $Trfr^{+/-}$, conduit également à une diminution du fer tissulaire total sans modifier la saturation de la transferrine sérique, ce qui suggère que la microcytose n'est pas due à un déficit systémique mais à un défaut de régulation de l'homéostasie du fer (Levy *et al.* 1999).

Une éventuelle implication du récepteur CD44 dans l'absorption du fer a récemment été rapportée. Il a été observé que les cellules cancéreuses internalisaient le fer associé à l'acide hyaluronique *via* le récepteur CD44. Le fer intracellulaire est transporté vers les mitochondries et participerait donc à la reprogrammation métabolique déclenchée pour l'activation de l'état métastatique (Müller *et al.* 2020).

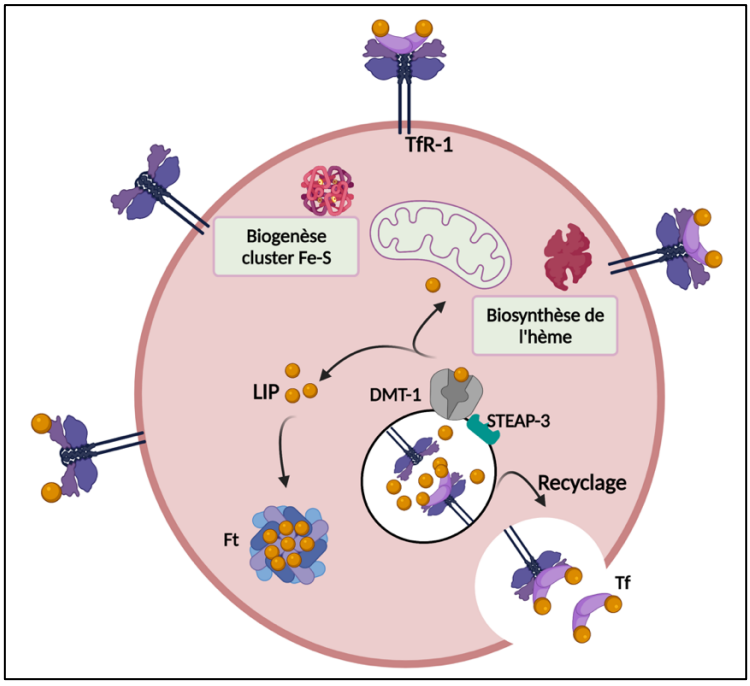


Figure 9. *Acquisition du fer par TfR-1. Endocytose médiée par les clatherines du complexe holo-Tf/TfR1 dans des vésicules endosomales, la diminution du pH induit un changement conformationnel permettant la libération du Fe^{3+}, celui-ci est réduit en Fe^{2+} par la réductase intraendosomale STEAP-3, puis libéré dans le cytoplasme par DMT1. TfR1 est recyclé au niveau de la membrane plasmique et l'apo-Tf libérée à nouveau dans la circulation.*

b. Cycle de la transferrine

Après fixation de l'holo-transferrine à son récepteur, le couple est internalisé par endocytose médiée par les clathrines dans des vésicules endosomales précoces. La liaison du fer à la transferrine est réversible et dépend du pH, ainsi, l'acidification de l'endosome grâce à une pompe à proton ATP dépendante permet de libérer le Fe^{3+} de la transferrine, qui quant-à-elle reste liée à son récepteur. Le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} par l'action de la réductase intraendosomale STEAP3 (Ohgami *et al.* 2005), et quitte l'endosome *via* le transporteur DMT1 (Gunshin *et al.* 2005). Enfin l'endosome contenant le complexe apotransferrine/TfR1 transite vers la surface cellulaire pour la libération de l'apotransferrine et le recyclage de TfR1 au niveau de la membrane cellulaire (Figure 9).

DMT1 est donc nécessaire non seulement pour l'absorption intestinale du fer, mais également pour la libération du fer du compartiment endosomal au compartiment cytoplasmique. Les souris *Slc11a2*$^{mk/mk}$, homozygotes pour une mutation faux-sens glycine-arginine (G185R) dans DMT1, présentent une absorption intestinale défectueuse du fer et des apports de fer réduits pour le développement des cellules érythroïdes se traduisant par une anémie hypochromique microcytaire (Su *et al.* 1998). Par ailleurs, plusieurs mutations du gène *SLC11A2* chez l'homme sont associées à des anémies ferriprives sévères qui contrairement à la souris s'accompagnent de surcharges hépatiques, suggérant l'importance de DMT1 dans l'absorption intestinale du fer mais aussi dans son homéostasie (Mims *et al.* 2005; Iolascon *et al.* 2006; Beaumont *et al.* 2006).

c. Le récepteur soluble à la transferrine (TfRs)

L'expression de TfR1 à la surface cellulaire est régulée positivement par l'activité érythropoïétique et la carence en fer de la cellule. La forme soluble du récepteur TfR1, TfRs, est une forme tronquée de celui-ci obtenue après protéolyse de la forme membranaire. Le recyclage des récepteurs TfR1, majoritairement exprimés sur les précurseurs érythroïdes, permet leur libération en circulation sous forme soluble où ils deviennent quantifiables. La mesure des niveaux du TfRs est donc une manière indirecte d'estimer les niveaux du TfR1 et l'activité érythropoiétique (Cazzola et Beguin 1992) (Punnonen *et al.* 1994). Il a en effet été montré que le taux de TfRs est directement corrélé à la masse totale des précurseurs érythroïdes dans un large spectre de troubles hématologiques, allant de l'aplasie médullaire à la thalassémie majeure (Huebers *et al.,* 1990). L'activité érythropoïétique accrue qui se produit lors des anémies hémolytiques, des anémies mégaloblastiques, des syndromes myélodysplasiques ou dans les hémochromatoses secondaires conduisent tous à une augmentation des taux du TfRs. Cependant, ses taux restent inchangés dans les épisodes d'anémie inflammatoire chronique où l'activité érythropoïétique reste faible, d'où l'intérêt de ce marqueur dans les stratégies de diagnostic de la carence en fer dans les situations inflammatoires où d'autres marqueurs du métabolisme du fer peuvent être modifié indépendamment du statut en fer (Cullis 2011).

d. Captation indépendante du TfR

Le cycle d'endocytose de la transferrine est le principal, mode de captation cellulaire du fer (Figure 9). Cependant, certaines conditions pathologiques de surcharge martiale conduisent à l'apparition du NTBI (Hider 2002; Brissot *et al.* 2012). Celui-ci peut être assimilé par certaines cellules spécialisées capables de capter le fer par des voies alternatives, indépendantes de la voie Tf-TfR. Des études *in vitro* sur cultures de cellules hépatiques et des études *in vivo* sur des modèles murins ont identifié le transporteur de Zinc Zip14 (ou SLC39A14), comme étant un transporteur de NTBI. Ce transporteur ZIP14 est exprimé dans les cellules parenchymateuses, et en particulier par les hépatocytes (Liuzzi *et al.* 2006). L'accumulation de fer hépatique corrélé avec le niveau de NTBI dans les maladies de surcharge en fer, atteste du rôle du NTBI dans la surcharge tissulaire, notamment dans les troubles de surcharge martiale (Knutson 2019).

3.7. Fer cellulaire

3.7.1. Pool cellulaire de fer libre (LIP)

Seule une petite quantité de fer cellulaire est trouvée sous forme libre Fe^{2+}, formant le pool de fer labile (LIP). Ce fer cytosolique constitue la fraction directement mobilisable pour les différentes activités cellulaires. Il suit différentes voies de distribution, il est principalement acheminé vers les mitochondries, site majeur d'utilisation, mais aussi vers d'autres partenaires cytosoliques (système golgi, noyaux, ribosome, etc.). Le LIP constitue donc un pool de fer de transit, qui permet d'établir des échanges entre différents processus métaboliques au sein de la cellule. Cependant, le LIP est considéré comme potentiellement toxique, car il s'agit du pool redox potentiellement actif du fer, qui est généralement impliqué dans le transfert d'électrons dans la réaction de Fenton, entraînant la génération

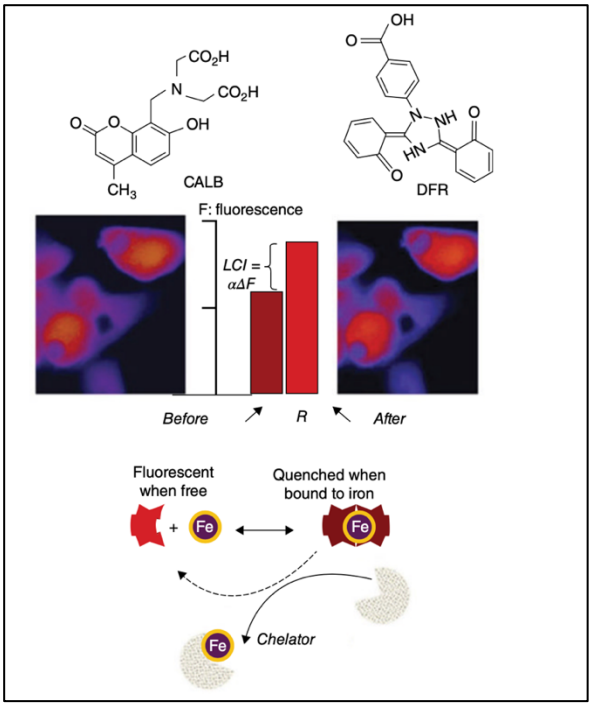


Figure 10. *Principe de détection du pool de fer libre (LIP) via des capteurs métalliques fluorescents. CALB : Bleu de calcéine, DFR : chélateur déférasirox. La calcéine traverse les membranes cellulaires. Une fois dans la cellule, si cette dernière est vivante, ses estérases sont actives et vont éliminer le groupement acétométhoxyl, dérivé non fluorescent de la calcéine la rendant fluorescente, cette fluorescence de la calcéine est fortement inhibée par les ions Co^{2+}, Ni^{2+} et Cu^{2+} et sensiblement par Fe^{3+} et Mn^{2+} à pH physiologique. (D'après Cabantchik. 2014).*

d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui conduit à la peroxydation lipidique ou la dénaturation des protéines qui causent des dommages cellulaires ultérieurs (Petrat *et al.* 2002).

Une méthode de mesure expérimentale du LIP est basée sur des approches utilisant des capteurs métalliques fluorescents tels que la calcéine. Le principe repose sur la capacité de ses capteurs à éteindre (quenching) leur fluorescence une fois complexé au Fe^{2+} (Espósito *et al.* 2002) (Figure 10).

3.7.2. Stockage du fer par la ferritine

a. Ferritine

Un équilibre est maintenu entre la forme mobilisable du fer et celle de stockage afin d'éviter ses effets toxiques. La ferritine est une protéine de stockage du fer cytosolique non réactif et facilement bio-disponible. Elle a été cristallisée pour la première fois par le physiologiste tchèque *Vilem Laufberger* (1890 – 1986), à partir de rate du cheval (Laufberger 1937). Son nom fut adapté du composé protéique ferreux, ferratin (du *latin : ferratus, garni de fer)* isolé à partir du foie de porc par le pharmacologue allemand Oswald Schmiedeberg (1838 – 1921). La ferritine est une protéine très conservée dans le monde du vivant, des formes analogues existent dans le monde végétal, bactérien, fongique, celui des animaux non-vertèbres ainsi que celui des vertèbres (Liu et Theil 2005).

Chez les mammifères, la ferritine est un hétéropolymère hydrosoluble d'environ 450 kDa, composé de 24 sous-unités par assemblage en proportions variables de deux sous-unités de chaînes légères (L-ferritine) et lourdes (H-ferritine) formant une nanocage pouvant contenir jusqu'à 4500 atomes de Fe^{3+} au sein de sa cavité centrale (Figure 11). La sous-unité H présente une activité catalytique ferroxydase qui oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} facilitant son incorporation dans la cage de ferritine. La sous-unité L, quant à elle, catalyse la formation du noyau ferrique au centre de la coquille protéique. Les ferritines riches en sous-unités L prédominent dans les organes qui stockent le fer pour des périodes prolongées, comme le foie et la rate. A l'inverse, les ferritines riches en sous-unités H sont en générale caractéristiques des organes qui ont des teneurs moyennes, voire relativement faibles en fer, tels que le cœur et le cerveau (Levi *et al.* 1998).

Chez la souris, l'invalidation complète du gène *Ft-H* entraîne une létalité embryonnaire précoce (Ferreira *et al.* 2000). Le modèle de l'haplo-insuffisance *Ft-H*$^{+/-}$ montre des altérations dans le cerveau, une réduction de moitié du stock de Ft-H associée à une augmentation de TfR, Ft-L, Dmt1 et de la céruloplasmine suggérant un état de carence en fer. Ces souris présenteraient également un stress oxydatif accru dans le cerveau (Thompson *et al.* 2003).

A l'état physiologique normal, la circulation sanguine est pauvre en ferritine. Celle-ci apparaît dans la circulation dans des conditions de surcharge sévère, elle est proportionnelle à la ferritine du compartiment de réserve hépatique. Elle représente un paramètre important du suivi de la surcharge martiale.

La ferritine sérique est également une protéine de réaction de phase aiguë de l'inflammation et augmente alors indépendamment du stock de fer (Mburu *et al.* 2008; Thurnham *et al.* 2010). Une augmentation de la ferritine au niveau sérique peut entraîner une surcharge en fer tissulaire, et participer à l'anémie inflammatoire.

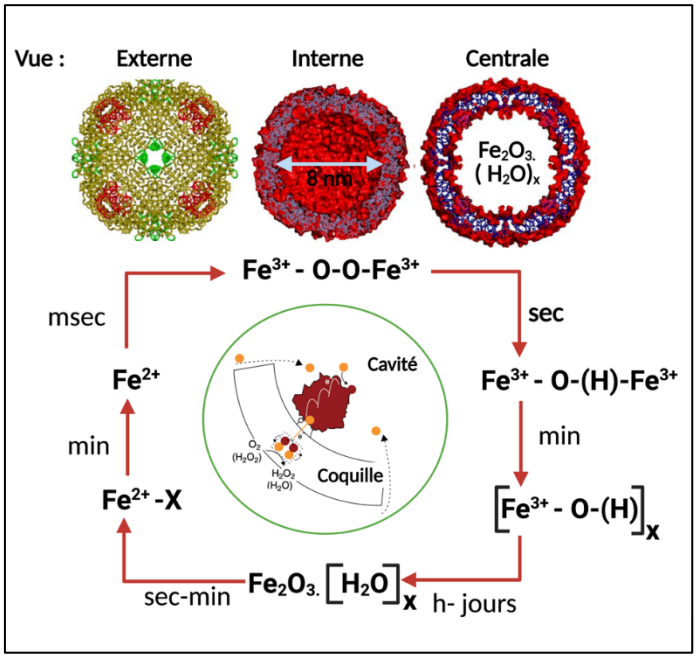


Figure 11. *Vue extérieure de la ferritine, Coupes transversales d'une ferritine montrant sa grande cavité interne (à droite) et son canal ionique (à gauche). Mécanisme de fonctionnement du centre ferroxydase de la ferritine Ft-H : le Fe^{2+}entre et quitte la nanocage protéique, grâce à un cycle d'oxydation, de minéralisation et de réduction du Fe^{2+} et en fonction du temps et de l'espace différents intermédiaires Fe^3/O sont trouvés à l'intérieur de la nanocage (Adapté de Theil et al. 2006).*

b. Hémosidérine

L'hémosidérine est la forme prédominante de stockage de fer détectée dans les macrophages spléniques et du système réticulo-endothélial, mais aussi dans les conditions de surcharge martiale. Des études histologiques ont montré qu'il s'agit d'un conglomérat riche en fer, qui donne une coloration bleue intense lorsqu'elle réagit avec du ferrocyanure de potassium (Perls 1867). C'est une forme insoluble de fer, visible au microscope sous forme de granules bruns localisés dans des structures intracellulaires endomembranaires appelées sidérosomes (Richter 1978). En plus du fer, l'hémosidérine renferme un agrégat hétérogène de protéines, de glucides et de lipides (Iancu 1992). Sa structure reste moins bien caractérisée que celle de la ferritine, mais les études convergent à dire que c'est une forme de dégradation lysosomale de cette dernière après autophagie ou trafic endosomal (Saito 2014).

Le modèle actuel de mobilisation/ stockage de fer retenu suit un flux LIP-hémosidérine et *vice versa*. Quatre transferts de fer ont été proposés : i) de LIP vers ferritine, voie directe, ii) de LIP à l'hémosidérine en contournant la synthèse de la ferritine, iii) de la ferritine à l'hémosidérine, et iv) de l'hémosidérine à la ferritine. Seules les voies LIP vers la ferritine et hémosidérine vers LIP ont été confirmées expérimentalement (Saito 2014) (Figure 12).

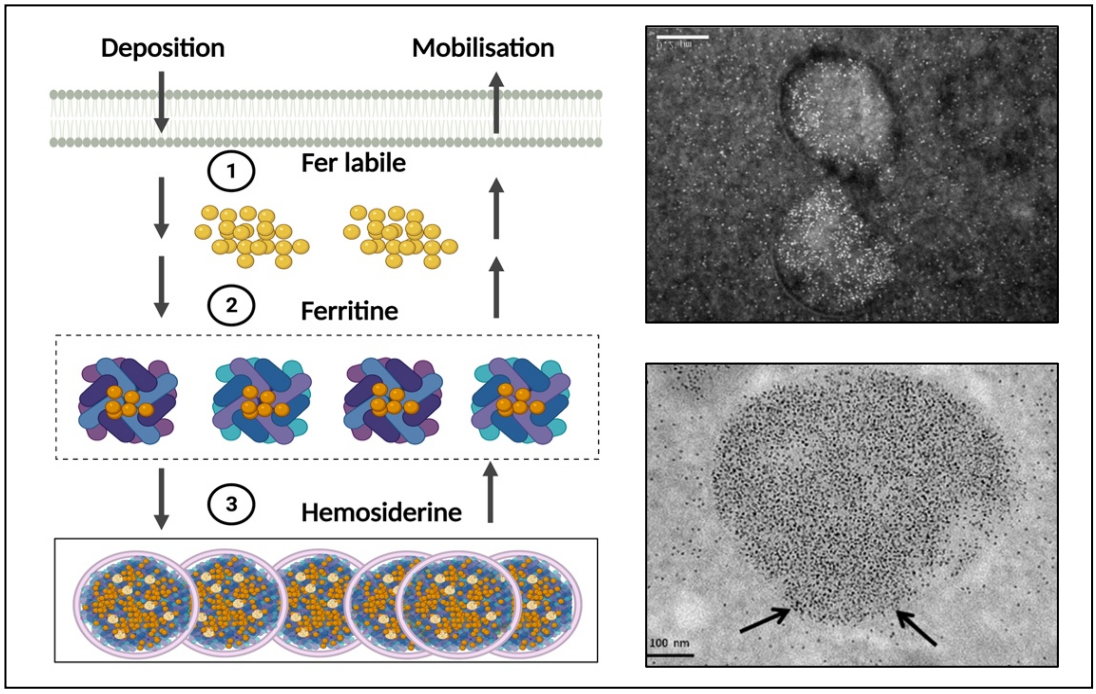


Figure 12. *Voies de dépôt et de mobilisation du fer dans la ferritine et l'hémosidérine (gauche). Formation des sidérosomes, cellule endothéliale du foie, le processus d'internalisation de structures membranés contenant de la ferritine (droite) (Adapté de Saito. 2014).*

c. Ferritinophagie

Le taux de fer libre intracellulaire est maintenu en équilibre afin de fournir à la cellule la quantité de fer requise et de stocker l'excès sous forme non toxique et réutilisable en cas de besoin. La ferritine est effectivement le réservoir responsable de cette fonction de stockage et de déstockage du fer. Ces mécanismes garantissent l'approvisionnement en fer de la cellule lorsque cela est nécessaire.

La ferritine est dégradée dans le lysosome acidifié pour l'utilisation des réserves de fer. Cependant, dans les MEF primaires l'autophagie joue un rôle dans le ciblage lysosomal de la ferritine dans des conditions de carence en fer, mais pas en conditions normales. Ce mécanisme indépendant de l'autophagie est absent des lignées de cellules cancéreuses (HeLa, MCF7, Hepa1-6) ce qui joue un rôle protecteur contre la toxicité du fer suggérant une régulation différentielle de la dégradation de la ferritine (Asano *et al.* 2011).

Des études protéomiques ont révélé le rôle spécifique du co-activateur NCOA4 (Nucléaire Récepteur Co-activateur) (Mancias *et al.* 2014) pour l'acheminement de la ferritine dans la voie de la dégradation lysosomale, récepteur initialement connu pour avoir des fonctions régulatrices sur les récepteurs nucléaires (Kollara et Brown 2012). NCO4 intervient également dans un mécanisme d'autophagie sélective de la ferritine, ou ferritinophagie.

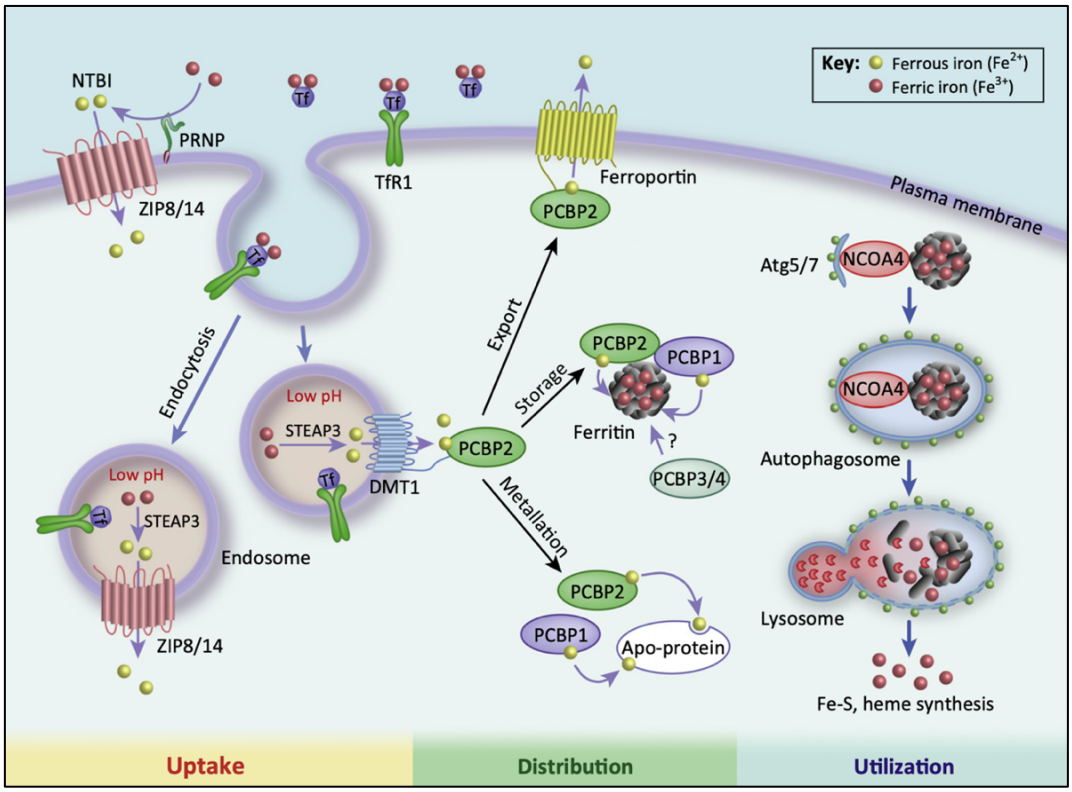


***Figure 13**. Mécanismes de régulation du métabolisme intracellulaire du fer. ZIP : transporteurs du fer non lié à la transferrine (NTBI), transferrine (Tf), antigène épithélial six trenasmembranaire de la prostate 3 (STEAP3), transporteur du métal divalent 1 (DMT1), protéine chaperons de fer cytosoliques (PCBP1 et 2), Nucléaire récepteur Co-activateur (NCOA4). (D'après Bogdan et al. 2016).*

Le modèle murin déficient en NCOA4 a confirmé les observations *in vitro* de son rôle potentiel dans la dégradation de la ferritine, et les conséquences globales de sa perte sur l'homéostasie systémique du fer. Les souris déficientes en NCOA4 présentent une surcharge hépatique et splénique en fer, avec une saturation accrue de la transferrine, et augmentation de la ferritine sérique et de l'hepcidine et une diminution de la ferroportine duodénale. Malgré ces signes de surcharge, ces souris présentent également des signes d'anémie hypochrome microcytaire ; probablement dû à un défaut de mobilisation du fer à partir de la ferritine et donc à une altération du processus d'érythropoïèse. Ce phénotype est exacerbé lorsque les animaux sont soumis à un régime pauvre en fer. A l'inverse, une alimentation enrichie en fer entraîne une mort prématurée en raison d'une surcharge accrue en fer au niveau du foie avec de lésions hépatiques. La ferritinophagie médiée par NCOA4 joue un rôle central dans l'équilibre des niveaux de fer cellulaires et systémiques, en prévenant l'accumulation de fer dans les tissus parenchymateux et en garantissant des quantités adéquates pour une érythropoïèse efficace (Bellelli *et al.* 2016).

d. Stockage mitochondrial

Dans les mitochondries, chez les mammifères, le stockage du fer est réalisé par la ferritine mitochondriale (MtF), qui est un homopolymère structuralement similaire à la chaine H de la ferritine

cytolosolique. Contrairement à la ferritine cytosolique, la ferritine mitochondriale semble très peu exprimée, voire absente dans les tissus riches en fer tels que le foie, et la rate. Cependant, son expression est très élevée dans les tissus métaboliquement actifs tels que le cerveau, le pancréas, les reins, et les testicules. Cette observation suggère qu'au-delà du stockage, cette forme de ferritine joue un rôle important dans la protection contre la génération de ROS au cours de différents processus métaboliques (Levi et Arosio 2004).

3.8. Transport intracellulaire du fer

Le fer cytosolique est véhiculé à l'intérieur des cellules pour être utilisé, exporté ou délivré à la ferritine pour être stocké (Figure 13). Un modèle de levure a permis de caractériser les protéines chaperonnes du fer, Poly (rC) 1 et 2 (PCBP1, et PCB2). L'isoforme PCBP1 peut se lier au fer et faciliter son adressage à la ferritine, ou se lier directement à la ferritine pour l'approvisionner directement en fer. De plus, l'inhibition de la protéine PCBP1 avec des approches siRNA dans les cellules de mammifères a montré des défauts d'incorporation de fer dans la ferritine associés à une augmentation du pool de fer cytosolique (Shi *et al.* 2008). D'autres travaux ont montré que l'isoforme PCBP2 peut également interagir avec le transporteur de fer DMT1 et l'exportateur de fer ferroportine (Lane et Richardson 2014).

La majorité du fer est utilisée par les mitochondries. Il sert à la biogenèse des clusters Fer-Soufre et à la synthèse de l'hème dans la matrice, ou bien il est stocké dans la ferritine mitochondriale (MtF). Le transport du fer dans la mitochondrie nécessite le passage des deux membranes mitochondriales, externe (OMM) et interne (IMM). Deux voies potentielles de transit du fer du cytosol vers la membrane externe de l'OMM ont été proposées. Le Fer, peut-être absorbé directement grâce à un potentiel membranaire et une consommation d'énergie sous forme d'ATP pour déplacer des ions à l'encontre de leur gradient de concentration. Le fer peut aussi être délivré *via* un mécanisme endosomal putatif « kiss and run », au moins dans les cellules érythroïdes, ou le fer est délivré par la transferrine et son récepteur. Le fer libre, généralement complexé avec des protéines cytosoliques, pourrait éventuellement être absorbé *via* des mécanismes de transfert impliquant des transporteurs.

Le passage du fer de la membrane externe à la membrane interne des mitochondries est médié par le transporteur DMT-1, ce dernier est en effet localisé sur la membrane externe des mitochondries. Le passage de la membrane interne IMM quant-à-lui se fait grâce aux mitoferrines 1, et 2 (MFRNs), ces dernières font partie de la famille des transporteurs mitochondriaux SLC25. La mitoferrine 2 est exprimée de manière ubiquitaire, tandis que la mitoferrine 1 est particulièrement importante dans le développement des cellules érythroïdes (Paradkar *et al.* 2009). L'invalidation de la mitoferine *Mfrn1* induit la létalité embryonnaire chez la souris, en raison d'une maturation défectueuse des précurseurs érythroïdes conduisant une anémie profonde (Shaw et al. 2006 ; Chen *et al.* 2009).

3.9. Régulation du métabolisme du fer

Le trafic du fer est régulé aussi bien, au niveau systémique qu'au niveau intracellulaire, afin de maintenir un équilibre entre les besoins propres de la cellule et les exigences de l'organisme dans son ensemble, tout en évitant l'accumulation toxique du fer.

3.9.1. Régulation systémique du fer

3.9.1.1. Régulation *via* l'axe hepcidine – ferroprotine

L'hépcidine a été initialement identifiée chez l'homme comme peptide antimicrobien dans le plasma (Krause *et al.* 2000) et dans l'urine (Park *et al.* 2001). Elle présente une ressemblance structurelle avec la famille des défensines qui comportent quatre ponts disulfures dans leur structure tertiaire qui sont restés conservés au cours de l'évolution et sont retrouvés chez différentes espèces (Figure 14).
L'hepcidine est fortement exprimée par les hépatocytes aussi bien chez l'homme que chez la souris. Ce peptide tient son nom de son site principal de synthèse : « Hep » pour hépatocytes et « cidine » pour son activité antimicrobienne (bactéricide). Il a été montré que l'hepcidine joue un rôle dans la défense immunitaire innée de l'hôte face aux infections grâce à ses propriétés antimicrobiennes, charge cationique et caractère amphipathique (hydrophobe et hydrophile), qui facilitent sa capacité à perforer les membranes des agents pathogènes. Cependant, cette activité antimicrobienne n'a été déterminée qu'*in vitro* et reste donc à être prouvée *in vivo (Ganz 2013)*.

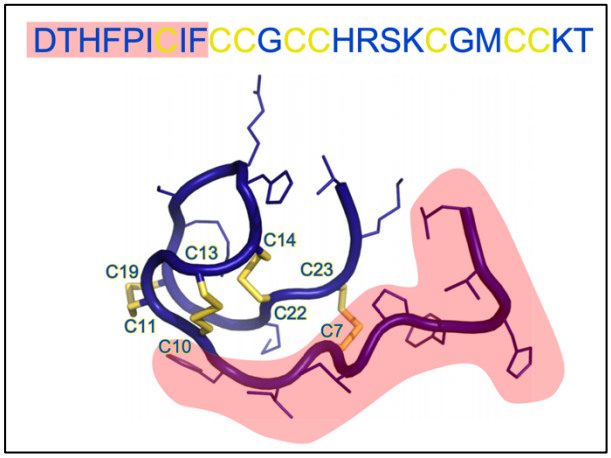


Figure 14. *Structure de l'hepcidine. Cystéines caractéristiques et leurs ponts disulfures en jaune. Segment N-terminal d'interaction avec la ferroportine (FPN1) ombré en rose. (D'après Ganz 2013).*

Chez l'homme, l'hepcidine est codée par un seul gène *HAMP*, localisé sur le chromosome 19 en position q13.1. Chez la souris il existe deux gènes homologues *Hamp1* et *Hamp2* localisés dans la même région du chromosome 7, dont seul *Hamp1* qui présente 90 % d'homologie avec la séquence humaine récapitule la même fonction (Pigeon *et al.* 2001). L'hepcidine est synthétisée sous forme prohepcidine, précurseur de 84 acides aminés, contenant dans sa partie N-terminale un site de clivage de type furine. Le clivage enzymatique aboutit à la forme mature et active de 25 acides aminés (Ganz et Nemeth 2006).

L'hepcidine est produite principalement par les hépatocytes, distribuée dans le plasma et excrétée dans l'urine. En 2001, il a été montré que l'expression de l'hepcidine présente une régulation à la hausse chez les souris soumises à un régime enrichi en fer ou après une injection de fer par voie systémique, première pierre apportée à l'élaboration du modèle régulateur de l'hepcidine dans le métabolisme du fer

(Pigeon *et al.* 2001). Il a été déterminé que l'invalidation du gène de l'hepcidine chez la souris conduit à une surcharge massive en fer avec un dépôt dans le foie et autres tissus (Nicolas *et al.* 2001). Par ailleurs, les souris surexprimant l'hepcidine, présentent une accumulation du fer intracellulaire et une anémie. Ces données corroborent que l'hepcidine est un peptide hormonal qui fonctionne comme un régulateur majeur de l'homéostasie systémique du fer. Elle joue un rôle hyposidérémiant en contrôlant l'efflux de fer circulant, et ce en régulant l'absorption intestinale, le recyclage par les macrophages et la mobilisation hépatique du fer (Collins *et al.* 2008). Le rôle central de l'hepcidine chez l'homme et les rongeurs a été confirmé par l'identification de mutations impliquant soit le gène *HAMP* directement, soit d'autres gènes impliqués dans les voies de régulation de l'expression de l'hepcidine, toutes conduisant à des troubles de l'homéostasie du fer (Roetto *et al.* 2003).

En outre, la synthèse de l'hepcidine n'est pas exclusive au foie. La sécrétion locale de l'hepcidine a été rapporté dans différents tissus dont les reins, les macrophages, l'estomac, le tissu adipeux, le cerveau, le cœur, et le pancréas (Deschemin *et al.* 2017; Malerba et Peyssonnaux 2020). Des modèles murins knock-in Fpn^{C326Y}, qui code une mutation de résistance à l'hepcidine, spécifiquement inductible, a montré que : les tubules rénaux, les cellules cardiaques, cardiomyocytes, ou le tissu placentaire répondent à la teneur en fer en augmentant leurs niveaux d'expression de l'hepcidine (Kämmerer *et al.* 2020). Cette sécrétion locale d'hepcidine pourrait avoir un autre point de contrôle avec un effet autocrine/ paracrine dans l'homéostasie du fer, qui reste à démontrer.

a. Mode d'action de l'hepcidine

La ferroportine possède à sa surface membranaire un domaine de liaison HBD (Heparin Binding Domain) qui permet une interaction directe avec l'hepcidine, cette interaction induit l'internalisation de la ferroportine et sa dégradation ultérieure soit par voie protéasomale ou lysosomale (Domenico *et al.* 2006). Ainsi, lorsque les réserves en fer sont suffisantes ou élevées, le foie produit l'hepcidine, qui entraîne l'internalisation de la ferroportine au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes, et de la membrane des macrophages, principaux sites d'expression de la ferroportine, bloquant la seule voie d'exportation du fer cellulaire, et réduisant ainsi les taux de fer circulant (Ganz 2013). Récemment, une étude structure-fonction basée sur une analyse de cryo-microscopie électronique suggère un modèle selon lequel la liaison de l'hepcidine à la ferroportine est dépendante du fer, où seule la ferroportine chargée de fer est ciblée par l'hepcidine pour dégradation (Billesbølle *et al.* 2020).

Les mammifères n'ayant pas de voies physiologiques d'excrétion du fer, le contrôle du contenu total en fer repose principalement sur l'axe hepcidine-ferroportine. L'expression de l'hepcidine est régulée positivement ou négativement en réponse à différents stimuli, notamment la charge hépatique en fer, la demande en fer sérique pour l'érythropoïèse, l'hypoxie et l'inflammation. L'excès de fer et l'inflammation stimulent la synthèse de l'hepcidine, ce qui diminue l'apport en fer *via* l'entérocyte et sa libération pas les macrophages. A l'inverse, la carence en fer et l'activité érythropoïétique suppriment la synthèse de l'hepcidine, afin d'augmenter son absorption alimentaire, et sa libération par les

macrophages (Ganz et Nemeth 2006). Les défauts de régulation de l'expression de l'hepcidine hépatique entraînent une surcharge tissulaire de fer qui épargne les macrophages et les entérocytes témoignant d'un export non contrôlé du fer (Pietrangelo et Trautwein 2004).

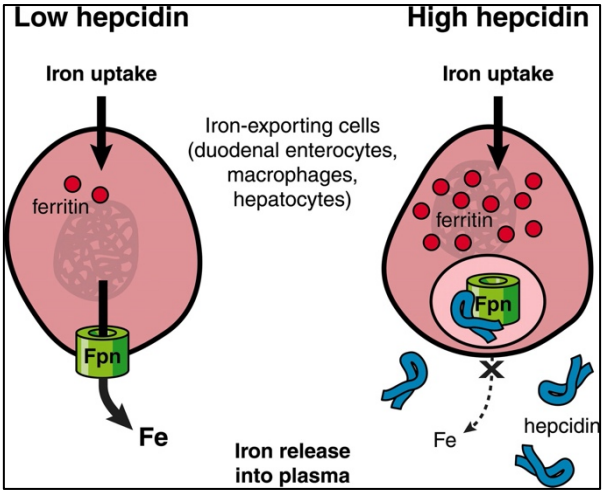


Figure 15. *Principale ligne d'action hepcidine/ ferroportine. Les conditions de surcharge en fer induisent la synthèse de l'hepcidine qui cible la dégradation de FPN, conduisant à une diminution de l'export du fer et donc des taux de fer sérique. FPN : ferroportine (D'après Ganz 2007).*

3.9.1.2. Régulation de l'hepcidine par la voie – HFE/ TfR2 – HJV

L'expression de l'hepcidine hépatique répond aux taux de fer circulant *via* la saturation de la transferrine (Hentze *et al.* 2010) et implique les protéines HFE et TfR2. HFE est la protéine communément associée à l'hémochromatose héréditaire (HH). Il s'agit d'une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I-like qui s'associe à la β2-microglobuline mais ne participe pas à la présentation des peptides antigéniques. Chez l'homme, la mutation C282Y abolit l'interaction avec β2-microglobuline et provoque un défaut de réponse à l'hepcidine entraînant une hyperabsorption intestinale et une augmentation excessive des réserves tissulaires de fer (Feder *et al.* 1996). Les mutations au niveau du TfR2, aussi bien chez l'homme que chez la souris, conduisent à des profils de surcharges en fer similaires (Wallace et Subramaniam 2007; Goswami et Andrews 2006). En effet, contrairement à TfR1, l'expression du TfR2 est limitée aux hépatocytes. L'affinité du TfR2 pour l'holo-transferrine est 30 fois inférieure à celle du TfR1. Ainsi, lors des épisodes de surcharges martiales TfR2 jouerait un rôle de régulateur de l'homéostasie du fer (Kawabata *et al.* 1999). Les études sur modèle murins ont montré que TfR2 est incapable de compenser la létalité due à la suppression de TfR1 ce qui témoigne des rôles distincts de ces deux récepteurs (Herbison *et al.* 2009). Le modèle d'action HFE-TfR propose qu'en conditions physiologiques HFE s'associe à TfR1, entrant directement en compétition avec la transferrine et provoquant une diminution de l'affinité apparente du TfR1 à la transferrine. L'augmentation des taux plasmatiques de transferrine conduit à la dissociation du complexe HFE-TfR1, le HFE libre interagit alors avec TfR2 et le complexe HFE-TfR2 induit une cascade de signalisation conduisant à la transcription de l'hepcidine (Figure 16).

Les souris déficientes en TfR2 présentent de faibles taux d'hepcidine, une surcharge hépatique en fer et une expression accrue des gènes de transport duodénal et d'absorption hépatique du fer

(Andriopoulo *et al.* 2009; Drake *et al.* 2007). De même, la délétion de TfR2 spécifiquement dans les hépatocytes induit une surcharge hépatique avec une hepcidine réduite indiquant que ces cellules sont le site d'action de TfR2 (Wallace *et al.* 2007).

Les mutations du gène de l'hémojuvéline (*HJV)* ou de l'hepcidine *(HAMP*) sont liées à une forme d'hémochromatose juvénile, forme sévère de surcharge en fer caractérisée par une diminution considérable des taux d'hepcidine, et dont les signes cliniques se manifestent à un âge précoce. Ces observations suggèrent que, plutôt qu'un médiateur, le HJV pourrait jouer un rôle direct dans la signalisation hépatique de l'hepcidine (Lee *et al.* 2004 ; Papanikolaou *et al.* 2004).

A l'exception des mutations de l'hepcidine *per se*, toutes les autres mutations dans des gènes de l'hémochromatose héréditaire, à savoir HFE, HJV, TfR2 conduisent à des défauts de synthèse de l'hepcidine *via* des perturbations du signal SMAD4. La compréhension de leur mode d'action a en effet été apportée par un modèle knock-out SMAD4 spécifique au niveau du foie qui récapitule un phénotype de surcharge en fer systémique qui s'accompagne d'une carence quasi complète en hepcidine (Wang *et al.* 2005).

3.9.1.3. Régulation de l'hepcidine par la voie – BMP

La régulation de l'hepcidine par la teneur en fer est principalement médiée par la voie de signalisation BMP-SMAD. Les BMPs (Bone Morphogenetic Protein) représentent un groupe de protéines appartenant à la superfamille des cytokines du facteur de croissance tumorale (TGFβ) qui interagissent avec leurs récepteurs à activité serine/ thréonine kinase, les BMPRs 1 et 2, qui comptent sept et cinq récepteurs respectivement. Les ligands de la superfamille du TGFβ peuvent se lier sélectivement à différentes combinaisons de récepteurs. Plus particulièrement, BMP6 se révèle être le messager clé de l'induction de l'hepcidine (Andriopoulo *et al.* 2009). En effet, la délétion du gène *Bmp6* tout comme celle de *Smad4* chez la souris entraîne une surcharge en fer associée à une réduction de l'expression de l'hepcidine (Meynard *et al.* 2009 ; Andriopoulos *et al.* 2009). Il a également été démontré que BMP2 contrôle la signalisation de l'hepcidine et la régulation du métabolisme du fer. Les souris *Bmp2*$^{fl/fl}$*; Tek-Cre,* souris *Bmp2* déficientes dans les cellules endothéliales, présentent un phénotype hémochromatosique similaire aux souris knock-out *Bmp6*$^{-/-}$ (Canali *et al.* 2017). L'association de BMP6 avec ses récepteurs induit la phosphorylation des protéines SMAD 1, 5 et 8, qui se lient alors au cofacteur SMAD4, l'ensemble du complexe transloque vers le noyau pour fixer les éléments de réponses aux BMPs (BMP-RE) localisés entre autres sur le promoteur de l'hepcidine et induire sa transcription (Kautz *et al.* 2008). Communément, la signalisation de la voie BMP6 est modulée par des corécepteurs, dont l'hémojuvéline HJV, corécepteur membranaire spécifique de la régulation du fer (Figure 16).

TMPRSS6, également appelé matriptase-2, est une enzyme protéolytique transmembranaire, qui contient une sérine like protéase à son extrémité C-terminale (Du *et al.* 2008). Elle est exprimée sur la membrane des cellules hépatiques et module négativement l'hepcidine. Cette enzyme est capable de cliver HJVm en une forme soluble, provoquant la suppression de la voie de signalisation BMP-SMAD

et réduisant ainsi l'expression de l'hepcidine (Lee 2009) (Figure 16). Les souris *Tmprss6* mutantes présentent une anémie ferriprive (Folgueras *et al.* 2008). Chez l'homme la mutation est associée à des anémies ferriprives réfractaire, ne répondant pas au fer, avec des niveaux élevés d'hepcidine (Lee *et al.* 2005 ; Finberg *et al.* 2008).

3.9.1.4. Régulation de l'hepcidine par le signal inflammatoire

L'inflammation induit une surexpression de l'hepcidine, ce qui explique en partie les anémies qui accompagnent généralement les maladies inflammatoires chroniques. L'IL-6 est la principale mais pas la seule cytokine nécessaire pour déclencher l'expression de l'hepcidine en réponse à des stimuli inflammatoires (Nemeth *et al.* 2004). L'inflammation régule à la hausse la transcription de l'hépcidine *via* la voie JAK-STAT3 (Nemeth *et al.* 2004). En outre, l'inflammation *via* l'activine β, cytokine de la famille TGF-β, qui peut se lier au récepteur BMP permet d'activer davantage la transcription de l'hepcidine (Canali *et al.* 2016). Les voies BMPs et STAT3 peuvent se chevaucher et intensifier le signal d'activation de l'hépcidine au cours de l'inflammation.

De nombreuses études ont montré que l'hepcidine peut être aussi induite *in vivo* et *in vitro via* des agents inflammatoires tels que les agonistes des TLRs (Toll-like receptor). Les différents TLRs activent de manière différentielle l'hepcidine dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse, les ligands des TLR4, TLR3, TLR7/8, TLR9, induisent l'expression de l'hepcidine, inversement Pam3CSK4 et l'ImQ ligands respectifs du TLR 1/2 et du TLR3 répriment l'expression de la ferroportine (Agoro et Mura 2016 ; Layoun *et al.* 2018).

3.9.1.5. Régulation négative de l'hepcidine par l'érythropoïèse

Une grande partie du fer biodisponible est utilisé pour l'érythropoïèse. Ce processus est activé par l'érythropoïétine (EPO), une hormone produite principalement par les reins, nécessaire aux premiers stades du développement des globules rouges. L'induction de l'érythropoïèse conduit à une diminution de l'expression de l'hepcidine afin de satisfaire les besoins en fer nécessaire à ce processus (Díaz *et al.* 2013). L'érythroferrone (ERFE), sécrétée par la moelle osseuse, codée par le gène *Fam132b* (Kautz *et al.* 2014) régulé positivement par l'EPO a été identifié comme régulateur négatif de l'expression de l'hepcidine. En réponse à l'érythropoïèse, des souris *Fam132b* déficientes sont incapables de réprimer l'hepcidine comparés aux souris témoins (Kautz *et al.* 2014). De plus, les patients atteints de β-thalassémie (Ganz *et al.* 2017) et d'anémie ferriprive (El Gendy *et al.* 2018) présentent des taux élevés de Erfe. Ce dernier semble agir sur la voie BMP-SMAD. Cependant, le mode d'action de Erfe sur les hépatocytes n'est pas tout à fait clair (Figure 16).

D'autres candidats ont été proposés comme régulateurs érythroïdes potentiels des voies de signalisation négatives des BMPs tels que (GDF15) et (TWSG1), cependant, les études *in vivo* utilisant

des souris déficientes pour ces gènes ont montré que ces derniers étaient dans l'incapacité de réprimer efficacement l'hepcidine (Finkenstedt *et al.* 2009).

Il est rapporté que l'expression de la ferroportine augmente dans de nombreuses situations pathologiques liées à une érythropoïèse inefficace, telle qu'observée lors d'un régime carencé en fer chez la souris C57BL/6 sauvage, dans les modèles murins d'anémie génétique : modèles *sla, mk, hpx*, ou lorsque l'érythropoïèse est stimulée par traitement à l'érythropoïétine (EPO) ou à la phénylhydrazine (PHZ), ou modèle murin polycythémie *Pcm x* (Mok *et al.* 2004). Malgré des taux de fer normaux, ces modèles montrent une diminution de l'expression de l'hepcidine au profit d'une augmentation de la ferroportine, suggérant que c'est la demande érythropoïétique qui contrôle cette expression et non le taux de fer corporel (Canonne-Hergaux *et al.* 2006). Par ailleurs, le modèle murin *Tg6*, exprimant de manière constitutive l'érythropoïétine (Epo), conduisant à une érythropoïèse excessive, montre une inhibition de l'hepcidine accompagnée d'une augmentation de l'expression duodénale de la ferroportine et du métal divalent tranporter-1 (DMT1), ainsi qu'une amélioration de l'absorption duodénale du fer. En dépit de ces mécanismes compensatoires, les souris *Tg6* présentaient une carence en fer circulante marquée et de faibles taux de fer dans le foie, la rate et les muscles. La modulation de la disponibilité du fer soit par un apport systémique *via* une injection de fer-dextran, soit par une réduction de la consommation de fer dépendante de l'érythropoïèse par splénectomie rétablit l'expression hépatique de l'hepcidine et la voie BMP6/SMAD, malgré des taux plasmatiques d'Epo constamment élevés et une érythropoïèse efficace, ce modèle suggère que, plutôt que la demande érythropoïétique, ce sont les niveaux de fer intracellulaire qui contrôlent la signalisation de l'hepcidine (Díaz *et al.* 2013) . Ces modèles suggèrent des mécanismes réciproques entre la demande érythropoïétique et les niveaux de fer intracellulaire dans la régulation de la signalisation de l'hepcidine.

3.9.1.6. Régulation cellulaire par HIF

Le fer étant indispensable au transport et au stockage de l'oxygène, son métabolisme est directement lié à l'état d'oxygénation de la cellule. Les conditions hypoxiques augmentent l'expression des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIF), une famille de facteurs de transcription sensibles à la biodisponibilité de l'oxygène. Les HIFs se lient aux éléments de réponses à l'hypoxie (HRE) dans les gènes cibles, particulièrement ceux impliqués dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse ou le métabolisme, et modulent leur expression (Wenger 2002). Les facteurs HIFs sont dégradés par le protéasome en conditions normoxiques, et stabilisés en conditions hypoxiques. L'hypoxie régule l'expression de l'hepcidine à la fois de manière dépendante et indépendante de l'EPO (Liu *et al.* 2012). Plusieurs études montrent une régulation directe de l'hépcidine par les HIFs. Il a été montré que la liaison de HIF-1α et HIF-2α sur les motifs HRE dans le promoteur de l'hépcidine conduisent à la diminution de sa production (Peyssonnaux *et al.* 2007 ; Chepelev et Willmore 2011).

De plus, l'hypoxie induit directement l'absorption du fer au niveau de l'intestin. Le duodénum est caractérisé typiquement par un environnement hypoxique, ce qui conduit à une stabilisation de HIF-2α qui fixe les HREs des gène *Slc11a2*, *DcytB*, et *Fpn* favorisant leurs synthèses, ce qui conduit une absorption de fer du côté apical des entérocytes et améliore l'exportation du fer du côté basolatéral, indépendamment de l'hepcidine (Shah *et al.* 2009). En effet, chez la souris, la délétion sélective de HIF-2α dans les entérocytes se traduit par une diminution des taux de DMT1 et Dcytb, ainsi que de celle de FPN1 et de l'héphaestine, ce qui implique que la régulation de ces gènes s'effectue par des mécanismes HIF-2α dépendants. Ces animaux présentent de faibles taux de fer sérique et hépatique accompagnés d'une anémie, indiquant ainsi que l'absorption du fer est une réponse précoce à l'hypoxie (Raja *et al.* 1988 ; Mastrogiannaki et al. 2009).

Au niveau systémique, l'hepcidine est aussi régulée par la voie VHL/HIF. L'anémie conduit à une diminution de l'oxygénation tissulaire, qui à son tour conduit à la stabilisation de de HIF-2α, celui-ci entraîne la suppression de l'hepcidine, une augmentation des taux de ferroportine et donc une augmentation de la disponibilité du fer sérique. Ensemble, ces éléments contribuent à leur tour à soutenir l'érythropoïèse grâce à une induction d'EPO (Peyssonnaux *et al.* 2007 ; Yoon *et al.* 2006 ; Liu *et al.* 2012 ; Mastrogiannaki *et al.* 2012).

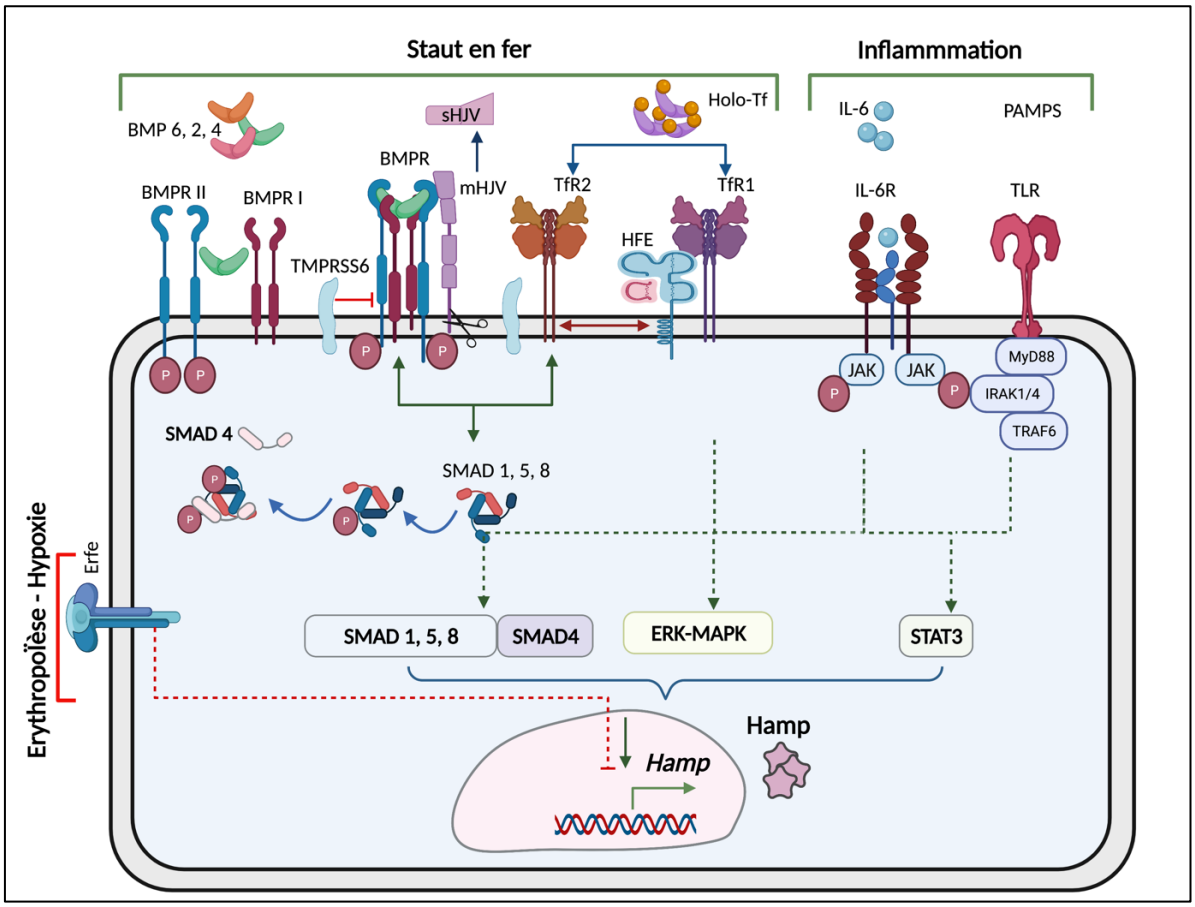


Figure 16. *Voies moléculaires de la régulation de l'hepcidine par le taux de fer circulant, hépatique et par l'inflammation. La régulation par les niveaux de fer est régie par la voie des BMP/ SMAD ; celle de l'inflammation via la voie STAT3. Les deux voies SMAD et STAT3 peuvent interférer lors de l'inflammation*

3.9.2. Régulation post-transcriptionnelle intracellulaire *via* le système IRP/ IRE

Au niveau intracellulaire, la concentration de fer est régulée principalement par le système IRE-IRP, éléments de réponses au fer et protéines de régulation du fer respectivement. Les IRPs (IRP 1 et IRP 2) sont des protéines cytosoliques capables de se lier aux motifs IRE présents dans les séquences non traduites de certains ARNs messagers (ARNm) et de moduler leur traduction. Le mécanisme de régulation par IRP1 dépend de la concentration intracellulaire de fer, par un processus d'assemblage et de désassemblage de centre fer-soufre. En présence de fer, IRP1 après insertion d'un centre [4Fe-4S] acquiert une activité aconitase et perd sa capacité de fixation aux IREs. IRP2 quant à lui, ne possédant pas d'activité aconitase, est ubiquitinée et dégradée dans le protéasome lorsque les niveaux de fer sont élevés (Rouault *et al.* 1991) (Figure 17).

Les IREs sont des motifs structuraux tige-boucle situés dans les régions non codantes de certains ARNm. L'effet régulateur d'un IRP est tributaire de la position du motif IRE. La fixation d'un IRP sur une région 5'-IRE inhibe la traduction des ARNm, tandis que la fixation d'un IRP sur une région 3'-IRE protège les ARNs des ribonucléases et augmentent leur traduction (Muckenthaler *et al.* 2008).

Plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du fer, notamment en relation avec son entrée (TfR1, DMT1), son utilisation (HIF-2α, ALAS2), son stockage (Ft-H, Ft-L) ou son exportation (FPN) sont concernées par cette régulation post-transcriptionnelle. Les ARNm des protéines DMT1 et TfR1 ont des motifs IRE dans leurs régions 3', alors que les ARNm codant les la ferritine et la ferroportine les comptent sur leurs régions 5', ainsi, lorsque les apports en fer sont insuffisants, les protéines DMT1 et TfR1 sont régulées à la hausse, tandis que FPN et Ft-H sont régulées à la baisse, favorisant ainsi une meilleure biodisponibilité du fer pour l'utilisation cellulaire (Eisenstein et Blemings 1998 ; Abboud et Haile 2000 ; McKie *et al.* 2000) (Figure 17).

De plus, en fonction de leur distribution tissulaire, les ARNm de DMT1 et de la ferroportine incluent des isoformes supplémentaires, générés par épissage alternatif ne contenant pas d'IRE. L'isoforme FPN1B de la ferroportine ne comprenant pas de motif IRE, est spécifiquement exprimé dans les entérocytes duodénaux et dans les cellules précurseurs érythroïdes, ce qui permettrait de contourner le mécanisme de régulation IRP/ IRE dans ces tissus, facilitant l'exportation du fer vers la circulation dans des conditions carencées en fer, permettant ainsi de meilleure réponses aux demandes systémiques (Zhang *et al.* 2009).

Le transporteur DMT1 quant à lui compte 4 isoformes (A-I, A-II, B-I et B-II) avec des répartitions cellulaires et tissulaires distinctes. DMT1A-I et DMT1A-II sont principalement localisés dans les cellules qui assimilent le fer alimentaire, le duodénum et les reins, avec une expression plus faible de DMT1A-II par rapport aux autres isoformes. DMT1B-I et II, sont eux localisés dans les endosomes/ lysosomes des cellules qui absorbent le fer, et se trouvent donc principalement dans les cellules du système réticuloendothélial. (Yanatori et Kishi 2019) (Tableau 1). Ces formes de DMT1 dépourvues de motifs IRE ne répondent pas aux concentrations intracellulaires de fer et il est postulé que les

mécanismes de régulation dictant leur expression pourraient être régis par un contrôle transcriptionnel et/ ou un contrôle par des mécanismes de dégradation protéiques.

Tableau 1. *Localisation cellulaire des isoformes DMT1*

DMT1 isoformes	Localisation cellulaire	Motifs IRE
DMT1A-I	Membrane plasmique	+
DMT1A-II	Endosome	-
DMT1B-I	Endosome/ Lysosome tardif	+
DMT1B-II	Endosome	-

Comme évoqué précédemment la majeure partie du fer lié à la transferrine dans la circulation est destinée à la moelle osseuse pour la fabrication de l'hémoglobine des érythrocytes. Contrairement à ALAS1, l'ARNm d'ALAS2 a un IRE dans sa région 5'-UTR et est régulé *via* le système IRP-IRE, faisant valoir que la synthèse de l'hème est également sensible aux niveaux de fer cytosolique (Figure 17).

Chez la souris, l'invalidation génétique totale simultanée des IRP 1 et 2 est létale au stade embryonnaire (Galy *et al.* 2005 ; Smith *et al.* 2006). De même, l'invalidation du système IRP au niveau de la muqueuse intestinale conduit à une létalité précoce des animaux quelques semaines après la naissance, montrant une importance du système IRP/ IRE dès les premiers stades de développement. Ces derniers présentent des taux anormalement élevés de ferroportine soutenant l'importance du système IRP/ IRE dans la régulation de la ferroportine intestinale (Galy *et al.* 2008).

Les souris invalidées pour *Irp1* ne manifestent aucune anomalie du métabolisme du fer, alors que, les souris invalidées pour *Irp2* développent une anémie microcytaire caractérisée par une carence en fer dans les macrophages de la rate et de la moelle osseuse, avec de faible expression de TfR1 et une forte expression à la fois de la ferritine et de la ferroportine malgré un niveau normal d'ARNm (Galy *et al.* 2008). Cette carence est toutefois accompagnée d'une distribution altérée du fer avec une surcharge en fer duodénale et hépatique (Meyron-Holtz *et al.* 2004). IRP2 pourrait donc jouer un rôle de senseur systémique dans le métabolisme du fer. De plus, les animaux présentant à la fois une invalidation dans les deux allèles IRP2 et dans un allèle IRP1 montrent une anémie plus prononcée et des signes neurodégénératifs, suggérant l'importance des deux IRP1, et 2 dans la régulation des gènes de mobilisation du fer (Smith *et al.* 2006 ; Rouault 2006).

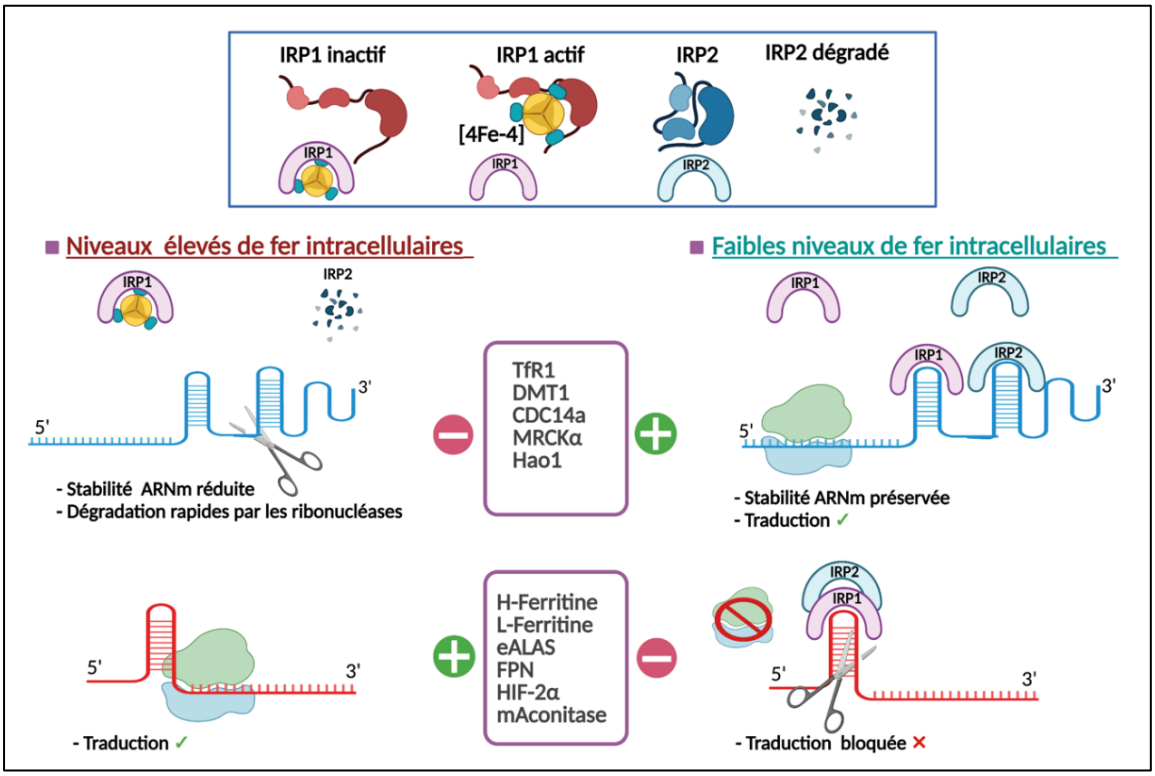


Figure 17. *Voie de régulation post-transcriptionnelle via le système IRP/ IRE.*

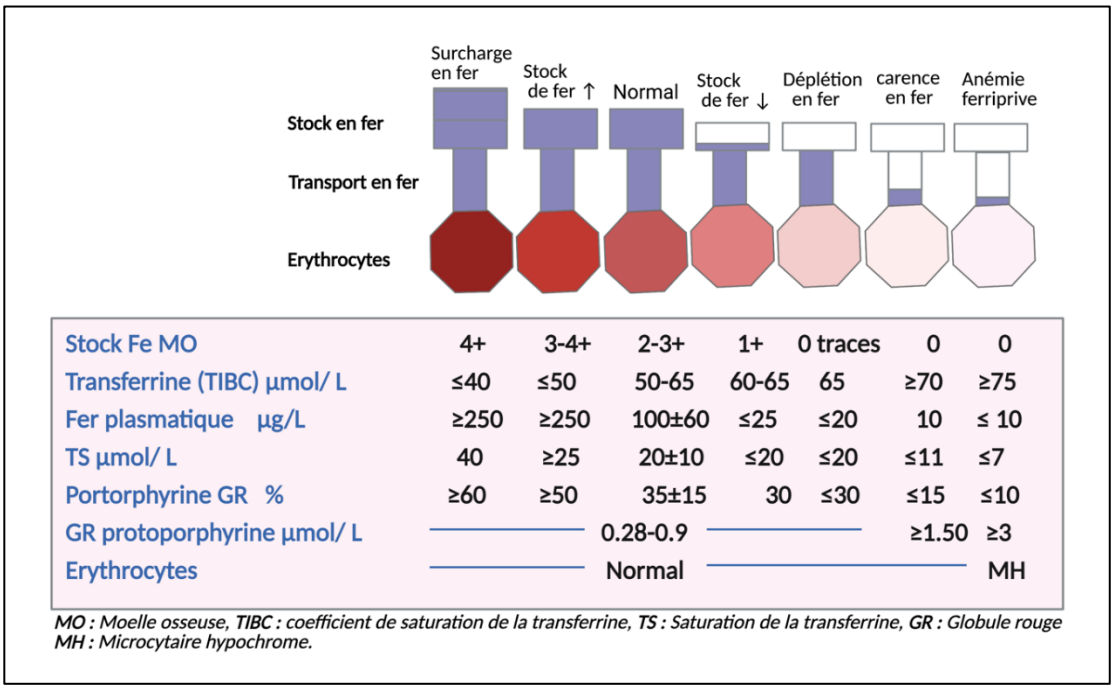
3.10. Défauts du métabolisme du fer

Un ensemble de marqueurs biologiques fournit des informations sur l'état martial d'un individu, afin de détecter d'éventuels états pathologiques allant de la carence à la surcharge. Différents paramètres sanguins comme la capacité totale de liaison du fer par la transferrine et son coefficient de saturation, le fer sérique, et la ferritine sérique permettent de renseigner l'état global du niveau de fer (Figure 18).

a. Les carences en fer

La carence en fer est la carence nutritionnelle la plus courante dans le monde. Elle survient lorsque l'apport en fer n'est pas suffisant pour répondre aux besoins physiologiques ou lorsque les réserves de fer tissulaire s'épuisent notamment en raison, de saignements ou de mauvaises absorptions des aliments. De fait, la carence en fer se manifeste par un large tableau clinique pouvant ou non être associée à une anémie (Denic et Agarwal 2007).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2008 ; McLean *et al.* 2009) estime que la carence en fer est la principale cause des troubles anémiques, avec une prévalence mondiale de 24,8%, ce qui correspond à 1,62 milliard de personnes. L'anémie ferriprive affecte plus les enfants et les femmes enceintes avec une incidence plus élevée dans les pays en voie de développement. Les stratégies de santé publique qui visent à améliorer le statut en fer comprennent, l'utilisation de compléments alimentaires par voie orale ou par injection *iv*, ainsi que l'utilisation de l'enrichissement et de la biofortification des aliments.



Stock Fe MO	4+	3-4+	2-3+	1+	0 traces	0	0
Transferrine (TIBC) µmol/ L	≤40	≤50	50-65	60-65	65	≥70	≥75
Fer plasmatique µg/L	≥250	≥250	100±60	≤25	≤20	10	≤ 10
TS µmol/ L	40	≥25	20±10	≤20	≤20	≤11	≤7
Portorphyrine GR %	≥60	≥50	35±15	30	≤30	≤15	≤10
GR protoporphyrine µmol/ L			0.28-0.9			≥1.50	≥3
Erythrocytes			Normal				MH

MO : Moelle osseuse, TIBC : coefficient de saturation de la transferrine, TS : Saturation de la transferrine, GR : Globule rouge MH : Microcytaire hypochrome.

Figure 18. *Paramètres du métabolisme du fer dans des conditions de surcharge et de carence en fer. (Adapté de Danielson et Geisser. 2008).*

b. Les hémochromatoses héréditaires ou surcharges primaires

Le diagnostic des hémochromatoses est basé sur le bilan martial et la confirmation par des tests génétiques. Communément, les hémochromatoses sont un groupe de maladies héréditaires dues à une production insuffisante d'hepcidine ou à une résistance à la réponse du signal de l'hepcidine.

La forme la plus courante d'hémochromatose chez les Caucasiens est due à des mutations homozygotes HFE (C282Y) (Feder *et al.* 1996), avec une prévalence de 1/200 dans la population nord Européenne (Merryweather-Clarke *et al.* 1997). Les formes d'hémochromatose non HFE ont été décrites. Les mutations de TfR2, qui interagit avec HFE, donnent une forme similaire à l'hémochromatose de type HFE. Les mutations de perte de fonction HJV et HAMP conduisent à des formes plus sévères, caractérisées par une surcharge en fer plus sévère et une apparition précoce des symptômes (Pietrangelo 2005).

Les défauts de ferroportine provoquant une gamme d'effets dus à la perte ou au gain de la fonction d'exportation du fer. En effet, les patients porteurs de mutations *SLC40A1* sont répartis en deux classes, avec des phénotypes distincts en fonction de la mutation particulière qu'ils possèdent. Un premier type de mutations autosomiques dominantes appelé maladie de la ferroportine, se caractérise par une réduction des taux de FPN sur la membrane plasmique ou à une capacité de transport du fer réduite, conduisant à une diminution du fer plasmatique face à son accumulation au niveau des macrophages du système réticulo-endothéliales. Dans le foie, l'accumulation de fer est principalement observée dans les cellules de Kupffer, contrairement à la distribution périportale dominée par les hépatocytes observés aux premiers stades de l'hémochromatose liée à HFE. Une diminution du fer plasmatique peut

également signifier le développement d'une légère anémie, en particulier avec un traitement par phlébotomie. Le deuxième type de mutations de la ferroportine, caractérisé par un mode de transmission autosomique récessif, appelé hémochromatose associée à la ferroportine est causé par une mutation faux-sens dans *SLC401* qui génère une protéine FPN qui a une réactivité réduite à l'hepcidine. Dans cette situation, le phénotype est assez similaire à celui associé aux défauts HFE TfR2, HjV et hepcidine, avec une saturation élevée de la transferrine et un dépôt périportal de fer dans les hépatocytes du foie. L'incapacité de la ferroportine à répondre de manière appropriée à l'hepcidine signifie un dysfonctionnement du mécanisme de rétroaction normal qui permet de limiter la surcharge martiale.

De manière générale, les hémochromatoses sont caractérisées par la présence du NTBI. A l'inverse de l'absorption du fer par la transferrine qui est un processus étroitement régulé, la captation du NTBI ne l'est pas, et un apport excessif en fer évolue vers une surcharge en fer, ce qui conduit à la génération d'espèces réactives de l'oxygène et des lésions cellulaires, provoquant une fibrose hépatique, qui peut évoluer vers la cirrhose ou carcinome hépatocellulaire dans les cas plus graves.

c. Les surcharges secondaires

Les surcharges en fer secondaires sont causées par des anomalies de l'érythropoïèse, où l'activation de ce processus est anormalement élevée mais de manière inefficace. Elles résultent soit d'un effet direct dû à de faibles taux d'hepcidine, et donc d'une forte absorption de fer, soit d'un effet indirect dû aux transfusions sanguines répétées que subissent les patients anémiques. Les maladies les plus courantes associées aux surcharges en fer secondaire sont les hémoglobinopathies : β thalassémie et la drépanocytose (Rotaru *et al.* 2014).

d. Statut en fer élevé et autres pathologies

De plus, des niveaux élevés de fer intracellulaire dus à un apport élevé en fer ou à un déséquilibre dans sa régulation sont impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies, notamment le carcinome colorectal (CCR), le carcinome hépatocellulaire (CHC) et la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Manz *et al.* 2016 ; Dongiovanni *et al.* 2011 ; Fargion *et al.* 2011).

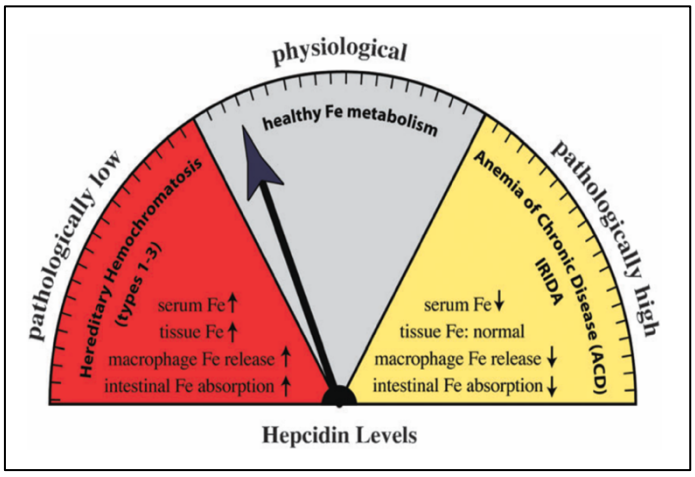


Figure 19. *Altérations de l'homéostasie systémique du fer causées par des déséquilibres du système de régulation hepcidine/ ferroportine. Une perturbation partielle ou complète de l'expression de l'hepcidine se produit dans les hémochromatoses héréditaires, qui conduit respectivement à une surcharge en fer parenchymateuse légère ou sévère. Des taux d'hepcidine pathologiquement élevés sont rencontrés pendant l'anémie des maladies chronique (ACD) ou IRIDA (anémie ferriprive par carence en fer), et conduisent à une hypoferrémie due à la rétention du fer dans les macrophages (D'après Sebastiani et Pantopoulos. 2011).*

La sécrétion d'hepcidine par le foie joue un rôle déterminant dans l'homéostasie systémique du fer, elle agit comme médiateur entre les différents compartiments d'absorption, de recyclage, et de réserve de fer (Figure 19). La dégradation de la ferroportine par l'hepcidine hépatique est considérée comme principale voie de régulation systémique, néanmoins, ce mécanisme d'action ne semble pas expliquer pleinement les effets et les signaux d'échange régulateurs émis entre ses différents compartiments, malgré la grande quantité de données disponibles, la manière dont les hépatocytes rallient les informations du statut systémique en fer reste mal comprise. Plusieurs modèles d'études ainsi que certaines pathologies génétiques due au dysfonctionnement des gènes du métabolisme du fer montrent des phénotypes de surcharges dans certains compartiments mais accompagnées de déficience dans d'autres ; ces phénotypes sont également accompagnés ou pas d'anémie selon les gènes mutés (Tableau 2, et tableau 3).

Tableau 2. *Modèles murins KO total de déficience pour les protéines du métabolisme du fer. (Adapté de Fleming et al. 2011)*

	Protéines	Modèle murin génétiquement modifié	Phénotype	Références
Modèles d'hémochromatose héréditaire (HH)	HH type 1 (HFE)	*Hfe*$^{-/-}$ *Hfe*$^{C282Y/C282Y}$ *Hfe*$^{H63D/H63D}$	Augmentation du fer corporel, peu de fer splénique, Diminution de l'hepcidine Phénotypes plus modérés que la délétion totale de Hfe	*Ahmann et al. 2002* *Bahram et al. 1999* *Levy el al. 1999* *Tomatsu et al. 2003*
	HH type 2A (hémojuveline)	*Hjv*$^{-/-}$	Augmentation du fer corporel, peu de fer splénique Diminution de l'hepcidine	*Huang et al. 2005* *Niederkofler et al. 2005*
	HH type 2B (hepcidine)	*Hamp1* $^{-/-}$	Augmentation du fer corporel, peu de fer splénique Absence d'hepcidine	*Lesbordes-Brion et al. 2006* *Nicolas et al. 2001*
	HH type 3 (TfR2)	*Tfr2* $^{-/-}$ *Tfr*$^{2Y245X/Y245X}$	Augmentation du fer corporel, peu de fer splénique Augmentation de l'absorption de fer Diminution de l'hepcidine	*Kawabata et al. 2005* *Drake et al. 2007* *Fleming et al. 2002*
	HH type 4 (ferroportine)	*Mutation faux-sens (H32R) dans Slc40a1*	Surcharge en fer dans les cellules de Kupffer, Ferritine sérique élevée Faible saturation en transferrine	*Zohn et al. 2007*
Régulateurs de l'hepcidine	Bmp6	*Bmp6* $^{-/-}$	Augmentation du fer corporel, épargnant la surcharge splénique Diminution de l'hepcidine	*Andriopoulos et al. 2009* *Meynard et al. 2009*
	Matriptase 2 (Tmprss6)	*Tmprss6*$^{-/-}$ *Tmprss6*$^{msk/msk}$	Anémie microcytaire, faibles réserves de fer, faible taux de fer sérique, Augmentation de l'hepcidine	*Du et al. 2008* *Folgueras et al. 2008*
Protéines liées au métabolisme de fer	Transferrine	*Hypotransferrinemic (Tf*$^{hpx/hpx}$*)*	Anémie sévère Surcharge en fer	*Bernstein. 1987* *Trenor et al. 2000*
	Récepteur à la Transferrine 1 (TfR1)	*Tfrc Knock-out*	Létalité embryonic Anémie Apoptose du neuroépithélium	*Levy et al. 1999*
	B2-Microglobuline	*B2-m knock-out*	Surcharge en fer Peu de fer splénique Surcharge en fer au niveau du CNS Mild anemia	*De Sousa et al. 1994* *Muckenthaler et al. 2004* *Rothenberg et al. 1996*
	Céruloplasmine	*Cp knock-out*	Surcharge hépatique en fer Peu de fer splénique Mild anemia	*Kenawi et al. 2009*

Protéines liées au métabolisme de fer			
Céruloplasmine/ héphaestine	*Double knock-out Cp et héphestin*	Surcharge généralisée en fer Anémie ferriprive	*Fuqua et al. 2018* *Jiang et al. 2016*
H-ferritine (Ft-H)	*Ft-H knock-out*	Homozygote létale Hétérozygote, niveaux cérébraux de fer normaux avec stress oxydatif	*Ferreira et al. 2000* *Thompson et al. 2003*
Haptoglobine	*Hp knock-out*	Transport accrue de fer Augmentation de l'expression de FPN Accumulation du fer au niveau de la rate et des reins	*Marro et al. 2007*
Haptoglobine/ Hfe	*Hp et Hfe double knock-out*	Transport accrue de fer Augmentation de l'expression de FPN Accumulation du fer au niveau de la rate et des reins	*Tolosano et al. 2005*
Hemopexine	*Hx knock-out*	Augmentation du fer dans le CNS Augmentation des lésions rénales	*Morello et al. 2009* *Tolosano et al. 1999* *Vinchi et al. 2008*
Irp1	*Irp1 knock-out*	Aucun phénotype apparent	*Galy et al. 2005* *Meyron et al. 2004*
Irp2	*Irp2 knock-out*	Microcytic anemia Augmentation du fer hépatique et duodénale	*Cooperman et al. 2005* *Galy et al. 2005*
Heme oxygénase (HO-1)	*Hmox1 knock-out*	Anémie, diminution du fer sérique Augmentation du fer hépatique et rénale	*Poss et al. 1997*
Flvcr	*Flvcr knock-out*	Anémie macrocytaire avec arrêt de maturation erythroblaste	*Keel et al. 2008*
Cytochrome B duodénal	*Cybrd1 knock-out*	Pas de phénotype apparent	*Gunshin et al. 2005*

Tableau 3. *Modèles murins d'invalidation conditionnelle (Adapté de Fleming et al. 2011)*

Protéines	Modèle murin génétiquement modifié conditionnels	Phénotype	Références
Hfe	*Hépatocyte spécifique* *Intestin spécifique*	Phénotype HH Pas de phénotype	*Vujic et al. 2008* *Vujic et al. 2007*
Tfrc2	*Hépatocyte spécifique*	Phénotype HH	*Wallace et al. 2007*
Dmt1 (Slc11a2)	*Intestin spécifique* *Hippocampe spécifique*	Anémie ferriprive Perturbations du développement neuronal	*Gunshin et al. 2005* *Carlson et al. 2009*
Fpn (Slc40a1)	*Intestin spécifique*	Anémie ferriprive	*Donovan et al. 2005*
Irp2	*Hépatocyte spécifique* *Intestin spécifique*	Surcharge tissulaire en fer	*Ferring-Appel et al. 2008* *Galy et al. 2005*
Double mutant Irp1 et 2	*Intestin spécifique*	Malabsorption du fer et la mort	*Galy et al. 2008*
Smad4	*Smad 4$^{-/-}$ (Hépatocyte spécifique)*	Augmentation du fer corporel, épargnant la surcharge splénique Diminution de l'hepcidine	*Wang et al. 2005*

Il est important de rappeler que le fer est toujours complexé avec d'autres protéines afin de le stabiliser et de minimiser sa toxicité à l'état libre. Le fer est en effet impliqué à plusieurs niveaux, et établit donc diverses connexions cellulaires, de ce fait il est en mouvement constant entre ses différents compartiments d'absorption, d'utilisation et de stockage à une échelle systémique ; mais interagit aussi à plusieurs niveaux au sein même de la cellule, en établissant des liens avec différents organites et protéines intracellulaires. Ainsi les mécanismes de transport ou trafic membranaire, peuvent régir les échanges des protéiques du métabolisme du fer entre les différents compartiments cellulaires qu'ils impliquent afin d'assurer leur bon adressage et localisation.

4. Transport vésiculaire ou trafic membranaire

Cette machinerie utilise des vésicules qui peuvent bourgeonner à partir d'un compartiment donneur et fusionner avec un compartiment receveur afin de délivrer leur contenu luminal. Les principales voies cellulaires du trafic membranaire sont la voie de biosynthèse chargée de transporter les protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique vers l'espace extracellulaire, par exocytose, ou vers d'autres compartiments cellulaires, membrane, cytoplasme ou noyau ; et la voie d'endocytose responsable de l'absorption des composés du milieu extra vers le milieu intracellulaire pour leur incorporation et utilisation cellulaire. (Bard et Malhotra, 2006 ; McNiven et Thompson, 2006). Cette machinerie est également impliquée dans les mécanismes de recyclage, pour la réutilisation ultérieure des protéines, par exemple en les redirigeant vers leur site fonctionnel, ou transportées vers les endosomes et les lysosomes pour la dégradation de leur contenu internalisé. Cette machinerie consiste en une communication bidirectionnelle entre complexe de Golgi et endosome. En effet, un équilibre constant est maintenu entre le flux de synthèse et celui de dégradation afin d'assurer l'homéostasie cellulaire, des défauts dans ces mécanismes de trafic intracellulaire, qu'ils soient ou non causés par des mutations génétiques, sont à l'origine de plusieurs désordres chez l'homme. La régulation du trafic vésiculaire est complexe et nécessite une coordination entre les différents processus de synthèse moléculaire entretenus par la famille des protéines : Rab GTPases, Rho GTPases, la famille SNARE et les moteurs moléculaires, ainsi que des processus de dégradation par des mécanismes d'ubiquitination et/ ou d'autophagie.

4.1. Autophagie

L'autophagie, du grec «auto» : soi-même, et «phagy» : manger, est un processus d'auto-dégradation cellulaire conservé au cours de l'évolution des eucaryotes. Ce processus alternatif à la voie du protéasome implique l'intervention d'un ensemble de partenaires qui agissent dans une série de réactions qui se traduit par une dégradation lysosomale des composants intracellulaires (Hayat 2017). L'autophagie existe au niveau basal de la cellule, pour le contrôle intracellulaire de la qualité de certaines protéines mais est aussi stimulée en réponse aux stress métaboliques et à la déprivation cellulaire, en

l'occurrence à une absence de nutriments ou d'acides aminés, stress hypoxique, ou du réticulum endoplasmique. etc. Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en garantissant la décomposition continuelle des composants cellulaires non essentiels et le recyclage de leurs éléments constitutifs pour leur réutilisation ultérieure dans les mécanismes de néo-synthèse (Ryter, Cloonan, et Choi 2013) (Figure 20).

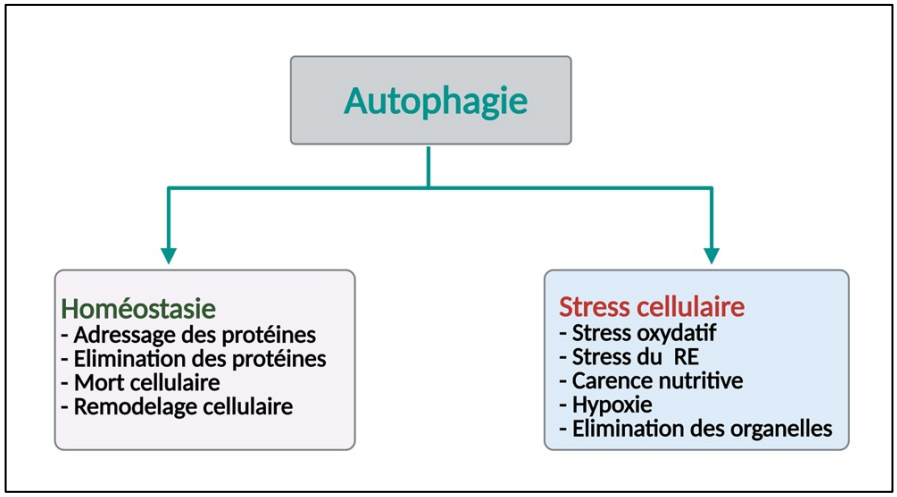


Figure 20. *Différents rôles de l'autophagie.*

L'autophagie est divisée en trois types distincts qui sont décrits dans la figure 21.

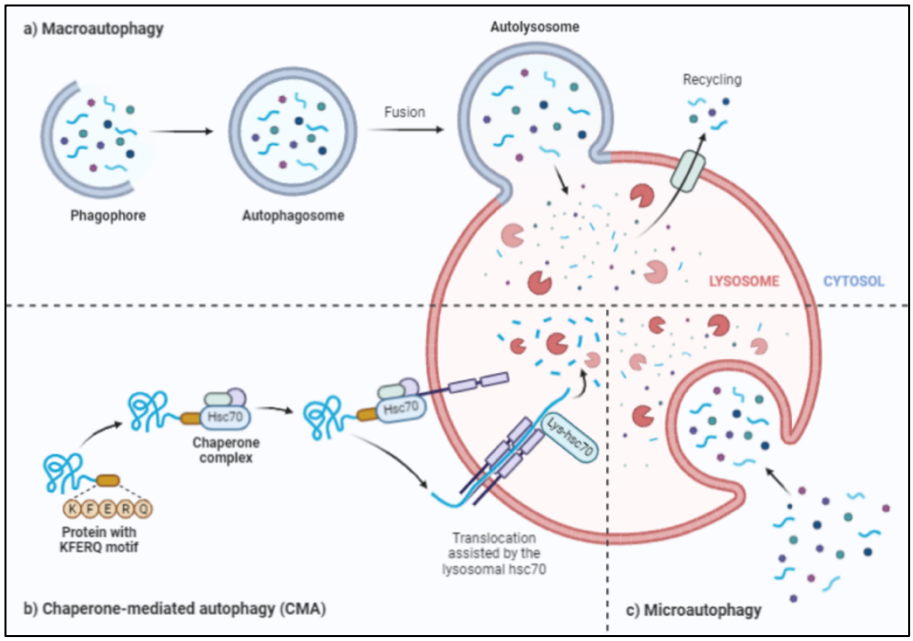


Figure 21. *Schéma représentatif des trois voies autophagiques chez les mammifères. a). Macroautophagie nécessite la séquestration de la cargaison cytosolique par une double membrane, appelée autophagolysosome, elle est régie par les protéines de la famille des ATG (protéines liées à l'autophagie). b). Microautophagie, la cargaison cytosolique est piégée dans de petites vésicules qui se forment par invagination de la membrane lysosomale. c). Autophagie médiée par les chaperons (CMA), les protéines cytosoliques sont sélectivement ciblées par hsc70 sur les microvésicules pour l'internalisation et la dégradation dans la lumière lysosomale (Template BioRENDER).*

4.2. Mécanismes moléculaires de l'autophagie

L'autophagie implique une multitude de protéines distinctes qui sont conservées entre la levure et les mammifères, regroupées sous la famille ATG (Klionsky *et al.* 2003).
Ces protéines ATG sont recrutées de manière hiérarchique et séquentielle à proximité de la vacuole et organisent la structure pré-autophagosomale (PAS) qui est essentielle pour la formation de l'autophagosome. Ces étapes de formation de l'autophagosome peuvent être subdivisées en quatre grandes étapes (Figure 22).

1. Activation et initiation de la formation du phagophore *via* l'action de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

2. Élongation de la membrane autophagosomale et sa fermeture en une vésicule, gouvernée par deux systèmes de conjugaison des protéines ATGs, dont l'activité est interdépendante et semblable aux systèmes d'ubiquitination des protéines, ces systèmes sont désignés « Ubiquitin-like conjugaison system », et renferment le système de conjugaison ATG12-ATG5 et le système de conjugaison ATG8 LC3-PE LC3 : (LC3 : protéine associée aux microtubules de la chaîne légère 3, PE : phosphatidyléthanolamine).

3. Transport des autophagosomes et leurs fusions avec les lysosomes, médiés par la machinerie du complexes Rab GTPases, SNARE (récepteur soluble de la protéine de fixation du facteur sensible au N-méthylmaléimide) et HOPS (protéines homotypique et tri des protéines vacuoliques).

4. Dégradation lysosomale du contenu vésiculaire, dirigée par les hydrolases lysosomales dont les cathepsines et les lipases. Ces enzymes dégradant les composants intra-autophagosomaux mais aussi les LC3-II présents sur la surface interne de l'autophagosome. Les protéines LC3-II exprimées à la surface de la membrane externe de l'autophagosome sont délipidées par ATG4B permettant ainsi leur recyclage pour la formation d'autres autophagosomes (Klionsky *et al.* 2012 ; Ding, Manley, et Ni 2011).

Un nombre croissant de rapports montrent des interactions entre le mécanisme de l'autophagie et la régulation des médiateurs du métabolisme du fer. Ce lien est en particulier décrit dans les mécanismes d'échanges du fer dans la ferritine, qui sont désormais définis comme fonctionnant par un mécanisme d'autophagie sélective, la ferritinophagie, présentée précédemment (Asano *et al.* 2011 ; Bellelli *et al.* 2016).

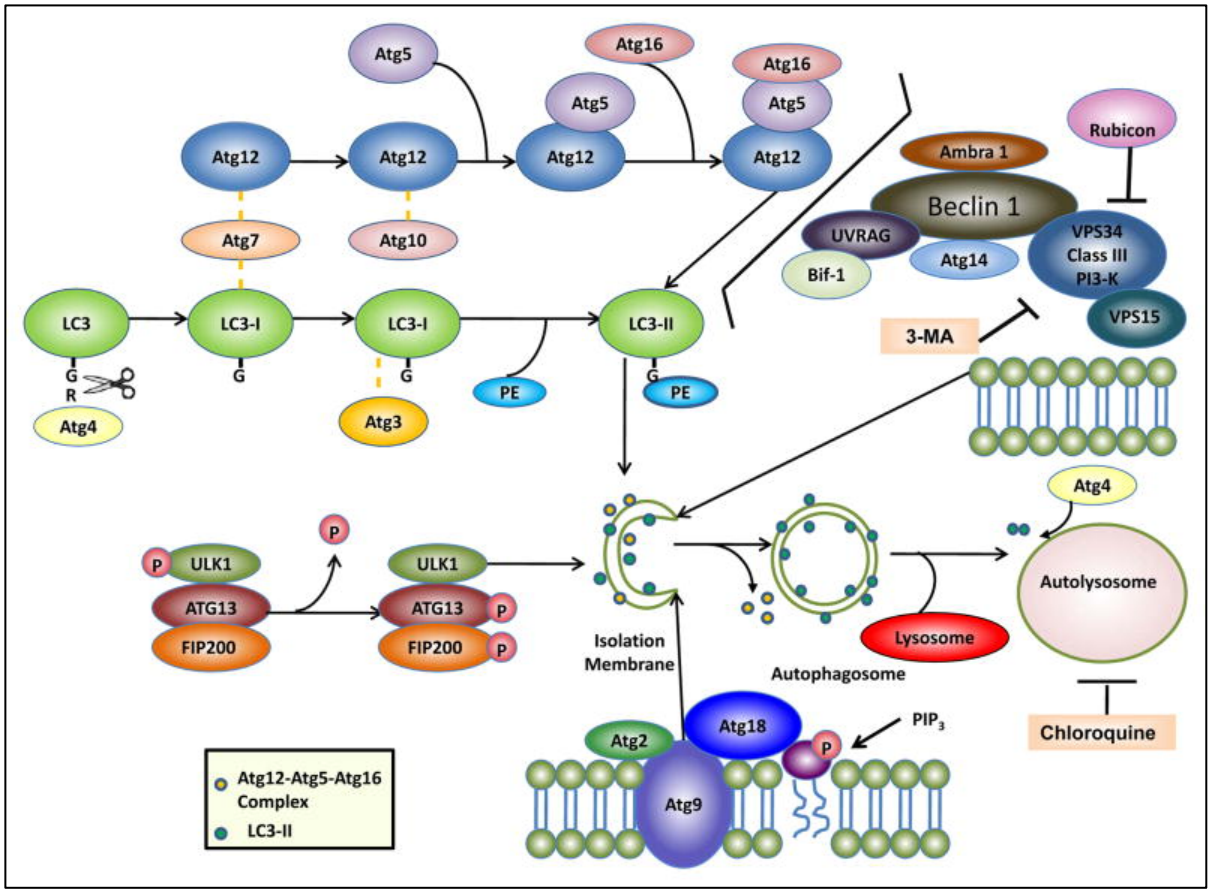


Figure 22. *L'autophagie implique la formation d'autophagosomes à double membrane qui fusionnent avec les lysosomes pour former des autolysosomes (PAS) pour la dégradation des protéines intracellulaires et des organites. Au moins quatre groupes fonctionnels importants de protéines Atg sont nécessaires pour l'autophagie : (1) le complexe des protéine-kinase ULK1 et (2) le complexe VPS34-Beclin 1 PI3-kinase régulent l'initiation de l'autophagie, (3) le complexe Atg9-Atg2-Atg18 régule l'expansion du PAS en transportant des lipides, et (4) les systèmes de conjugaison Atg5-Atg12-Atg16 et LC3 régulent l'élongation des membranes de l'autophagosome. LC3 conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) (appelée LC3-II) reste sur les membranes de l'autophagosome, le complexe Atg12-Atg5-Atg16 s'associe de manière transitoire aux membranes isolés et se dissocie des membranes de l'autophagosome. Une fois que les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des autolysosomes, la membrane interne LC3-II est dégradée par les enzymes lysosomales tandis que la membrane externe LC3-II est déconjuguée et recyclée par Atg4. Inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie : 3-méthyladénine (3-MA), chloroquine. (D'après Ding et al. 2011).*

4.3. Autophagie sélective

Le caractère de sélectivité de l'autophagie est principalement assuré par des adaptateurs, qui se lient spécifiquement à la fois au substrat à dégrader et au phagophore, facilitant ainsi la séquestration et la dégradation des macromolécules ciblées *via* la machinerie d'autophagie de base. Le récepteur p62 également appelé séquestrosome-1 SQSMT1 représente la première protéine rapportée pour avoir une telle fonction adaptatrice faisant le lien entre le substrat à dégrader et l'autophagosome en formation. Depuis cette découverte, la liste des récepteurs spécifiques de l'autophagie n'a cessé de s'allonger et de plus en plus de protéines cargo ont émergé, mais les détails moléculaires de leur fonctionnement ne sont toujours pas tout à fait clairs (Hayat 2017).

Felix qui potuit rerum cognoscere causas.
Heureux celui qui a pu pénétrer les causes secrètes des choses. Virgile

Chapitre 2. Interactions entre métabolisme du fer et système immunitaire

1. Système immunitaire

Le système immunitaire est constitué d'un réseau complexe de cellules et de leurs protéines effectrices, qui fournissent des mécanismes de défense remarquables contre la myriade de micro-organismes potentiellement pathogènes ou de substances toxiques que nous rencontrons. Il apporte des réponses rapides, spécifiques, protectrices, le plus souvent efficaces, et adaptées à l'agent nocif rencontré. Les réponses protectrices générées pendant l'infection par un pathogène commencent par des réponses rapides et non spécifiques du système inné, suivies par des réponses hautement spécifiques mais plutôt lentes du système immunitaire adaptatif (Figure 23). Ces deux aspects de la réponse immunitaire sont interconnectés par divers mécanismes par lesquels les cellules du système immunitaire inné préparent le déclenchement de l'immunité adaptative (Iwasaki et Medzhitov 2010).

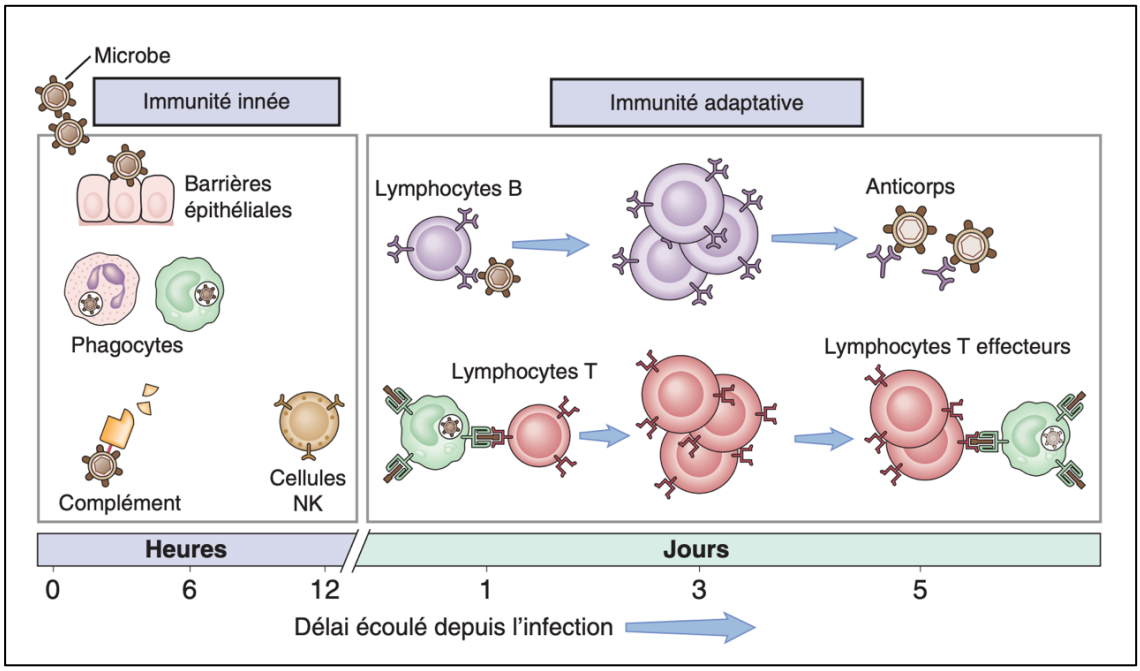


Figure 23. *Principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative. (D'après Abbas et Litchtman. 2008)*

Si un agent pathogène enfreint la première ligne de défense, une réponse immune innée est rapidement induite, elle comprend différentes stratégies dont, la génération de bactéricides, l'activation de la phagocytose, l'induction de voies alternatives du complément, une déplétion nutritive et l'expression de médiateurs de la réponse immune, cytokines et chimiokines. Cette réponse immune innée est initiée grâce à un ensemble de cellules exprimant à leur surface une panoplie de récepteurs dont les récepteurs de reconnaissance de formes (PRR : Pattern recognition Receptor), susceptibles de détecter des motifs caractéristiques communs à des groupes de pathogènes restés constants et conservés

au cours de l'évolution, les PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern, (Ma et Damania 2016 ; Creagh et O'Neill 2006) (Figure 24). La réponse générée n'est pas spécifique de l'agent pathogène envahissant. Néanmoins, cette réponse immunitaire innée peut éradiquer l'infection dans le meilleur des cas, ou aide à contenir la primo-infection jusqu'à ce que les cellules de la réponse immunitaire adaptative soient activées. Le système immunitaire innée contrôle la réponse immunitaire adaptative, permettant la présentation d'antigène (Ag), l'activation des lymphocytes T auxiliaires ainsi que les lymphocytes T cytotoxiques et B producteurs d'anticorps (Ac).

Les cellules du système immunitaire peuvent être distinguées en fonction de leur lignage d'origine myéloïde ou lymphoïde ainsi que de leurs fonctions effectrices.

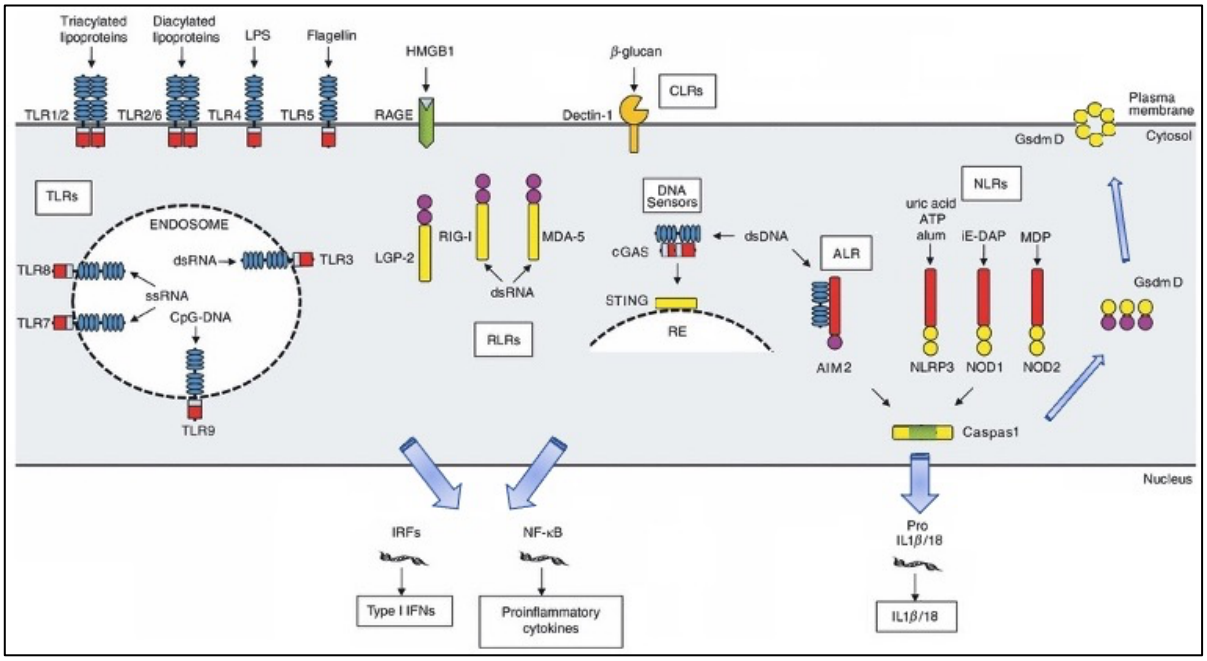


Figure 24. *Activation des différentes voies cellulaire de l'immunité innée. TLR, Toll Like Receptor; RLRs, NOD, nucleotide-binding and oligomerization domain; RIG-I, Retinoic acid Inducible Gene-I like receptor; MDA-5, melanoma differentiation-associated protein, LGP2, ou RIG-2, cGas, Cyclic GMP-AMP synthase; STING, stimulator of IFN genes, ALR, absent in melanoma (AIM)-like receptor, NLRs, NOD-like receptors; Gsdm D, gasdermin D; NF-kB, nuclear factor kappa B; IL, interleukin; IFN, interferon. (Adapté de Kvarnhammar et Cardell 2012).*

1.1. Caractéristiques générales de la réponse immune

1.1.1. Réponse immune innée

a. La phagocytose

La phagocytose est un phénomène d'engloutissement et de destruction qui a pour fonction d'éliminer les corps étrangers, les débris, les cellules défectueuses ou microbiennes, mais aussi de recruter et éduquer les acteurs de l'immunité adaptative (Van Furth *et al.* 1972). Le phagocyte développe des pseudopodes autour de la particule et l'internalise par endocytose dans un phagosome, vésicule entourée

de membrane cellulaire. Les particules ou cellules adhèrent à la membrane cellulaire sur des récepteurs non spécifiques (récepteur mannose-fucose, CD14) ou par opsonisation, processus au cours duquel des opsonines (anticorps ou molécules du complément) fixent la particule étrangère et un récepteur membranaire pour les opsonines ce qui favorise la phagocytose. Le phagosome après fusion avec un lysosome forme un phagolysosome, cette acidification crée un environnement hostile qui arrête la croissance des microbes et permet d'acquérir des propriétés microbicides (Gordon 2008) (Figure 25).

Les cellules phagocytaires incluent les monocytes, macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles. Les phagocytes professionnels possèdent aussi un équipement enzymatique varié, ils peuvent générer rapidement des espèces réactives de l'oxygène et des médiateurs lipidiques capables d'altérer les agents pathogènes et d'amplifier la réponse inflammatoire (Underhill et Goodridge 2012).

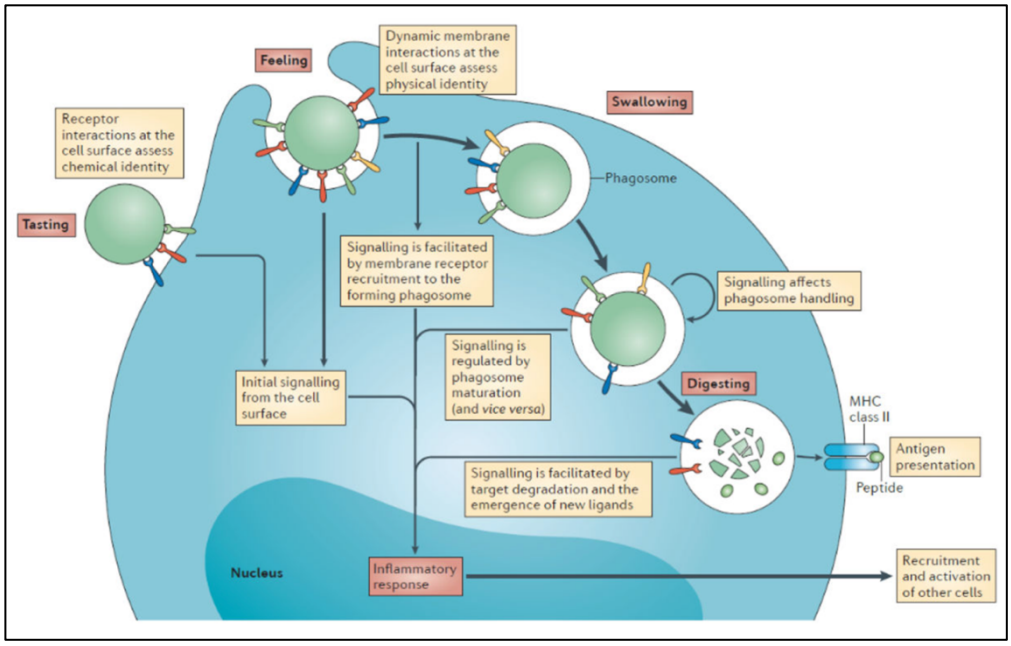


Figure 25. *Étapes clefs de la phagocytose. (D'après Underhill et Goobridge 2012).*

Les macrophages se caractérisent par leur capacité phagocytaire. Au cours de l'inflammation, les monocytes circulants, dérivés de la moelle osseuse, sont localement recrutés sur site, ils pénètrent dans les tissus endommagés à travers l'endothélium d'un vaisseau sanguin par extravasation leucocytaire, et subissent une série de changements pour devenir des macrophages. Les monocytes sont attirés vers le site endommagés *via* des signaux chimiques (chimiotaxie), déclenchée par une série de stimuli comprenant des cellules endommagées, des agents pathogènes et des cytokines libérées par les macrophages déjà présents sur le site (Figure 26).

Les macrophages tissulaires, dérivés de précurseurs myéloïdes, représentent une population disséminée dans l'ensemble de l'organisme. Les monocytes circulants, migrent vers les tissus où ils acquièrent leurs phénotypes de macrophages résidents. Ces macrophages tissulaires partagent des marqueurs identitaires communs mais sont également caractérisés par une diversité et une plasticité

considérable, en fonction des signaux environnementaux ils acquièrent des phénotypes fonctionnels distincts appropriés à leurs fonctions tissulaires particulières. Ils sont appelés macrophages médullaires dans les ganglions lymphatiques, macrophages stromaux de la moelle osseuse, les cellules de Langerhans dans l'épiderme, les macrophages de la lamina propria dans l'intestin, cellules de Kupffer dans le foie, macrophages marginaux/ MZN dans la rate, macrophages interstitiels (MI) et alvéolaires (MA) dans les poumons, microglie dans le système nerveux central, ostéoclastes dans les os. Ces macrophages sont une composante essentielle de l'immunité innée, ils jouent un rôle central dans l'inflammation et la défense de l'hôte. De plus, ces cellules remplissent des fonctions dans l'homéostasie, le remodelage et la réparation tissulaire, dans l'ontogenèse et l'orchestration des fonctions métaboliques (Bosque *et al.* 1997 ; Davies *et al.* 2013) (Figure 26).

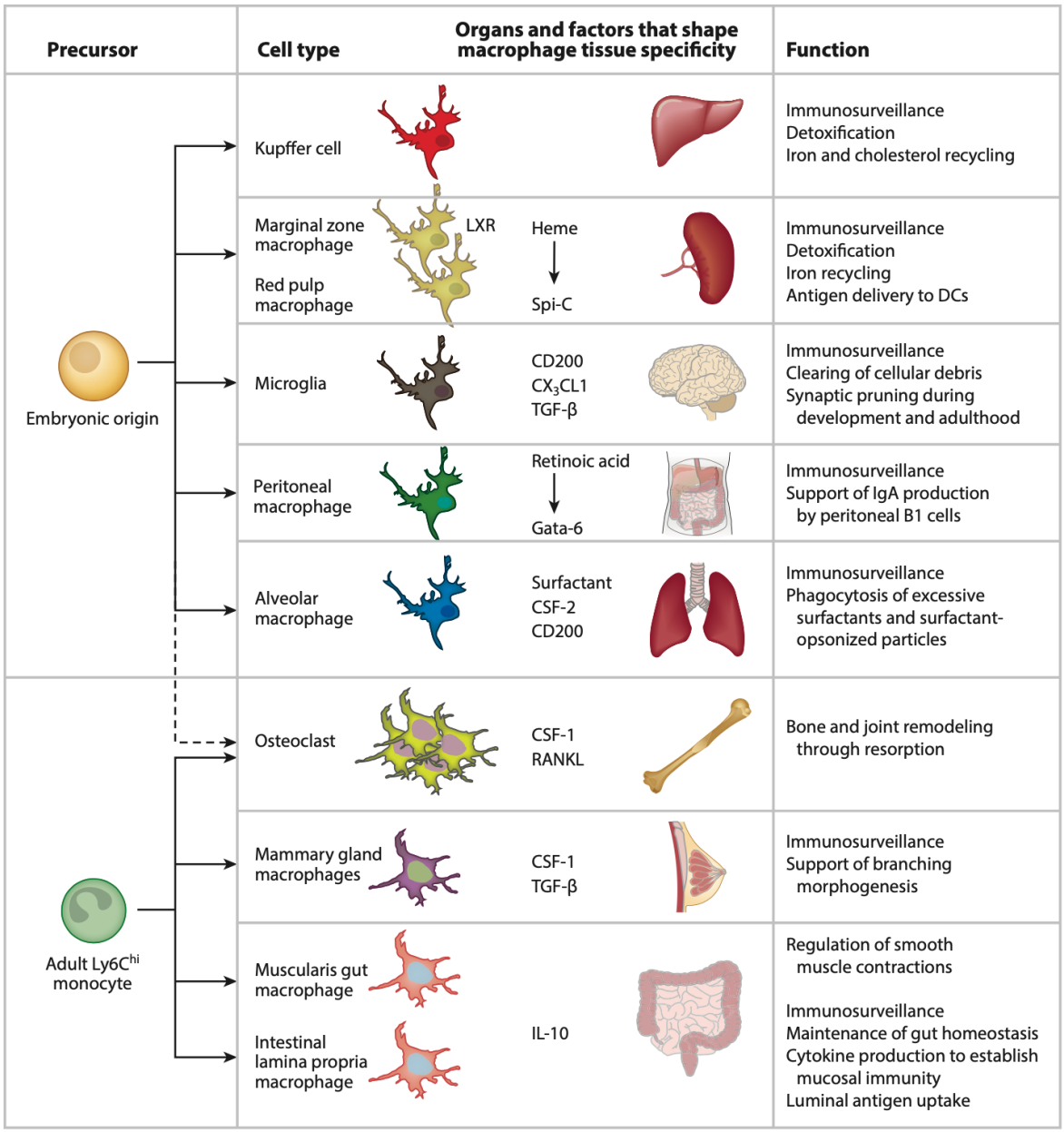


Figure 26. *Distribution corporelle et propriétés fonctionnelles respectives des sous- populations de macrophages tissulaires (D'après Varol et al. 2015).*

b. Explosion oxydative

L'explosion oxydative est une stratégie de défense antimicrobienne clé, elle correspond à une production rapide et transitoire d'énormes quantités de ROS, incluant radical superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle. La maturation du phagolysosome, dans les phagocytes professionnels, et les leucocytes, conduit à une augmentation de leur consommation d'oxygène et à l'activation d'une voie NADPH-oxydase, une enzyme appartenant à la famille des Nox, qui produit des anions superoxydes (O_2^-) qui seront rapidement convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase, ainsi que d'autres espèces réactives, dont $ONOO^-$ (Brandes *et al.* 2014). Ces ROS sont des agents oxydants très réactifs, qui combinés à l'action d'autres éléments sont capables d'induire la perméabilisation de l'enveloppe du microbe ainsi qu'à l'oxydation notamment de l'ADN, processus qui aboutissent à la létalité de la plupart des microbes (Lambeth 2004) (figure 27). Ils peuvent également oxyder des clusters 4Fe-4S, endommager une variété de biomolécules et d'enzymes, qui en libérant du fer déclenchent la réaction de Fenton.

Les modifications de la teneur totale en fer des leucocytes altèrent l'activité de la NADPH oxydase, la diminuant en cas de carence, ou l'augmentant en cas de surcharge en fer, ce qui compromet encore davantage l'efficacité des leucocytes dans la lutte contre les organismes envahisseurs (Ward *et al.* 2011).

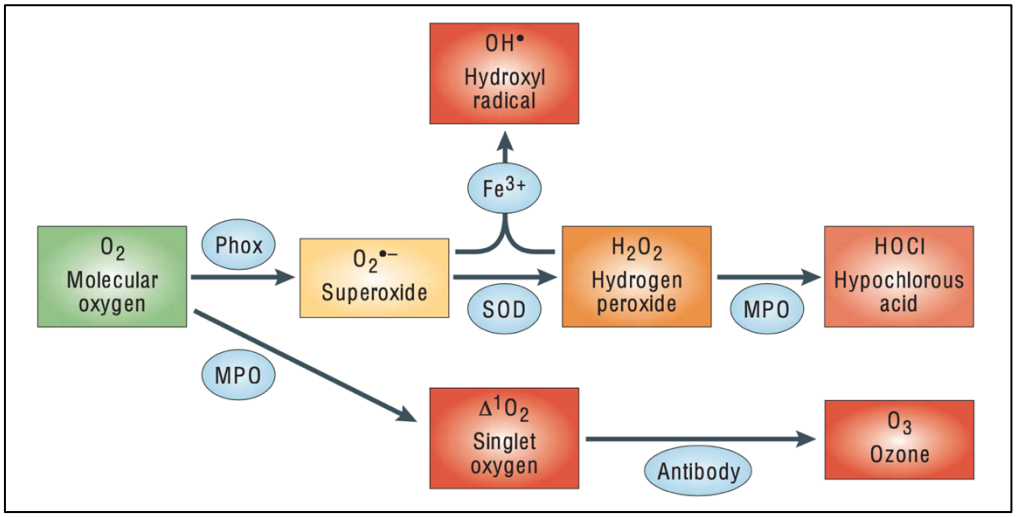
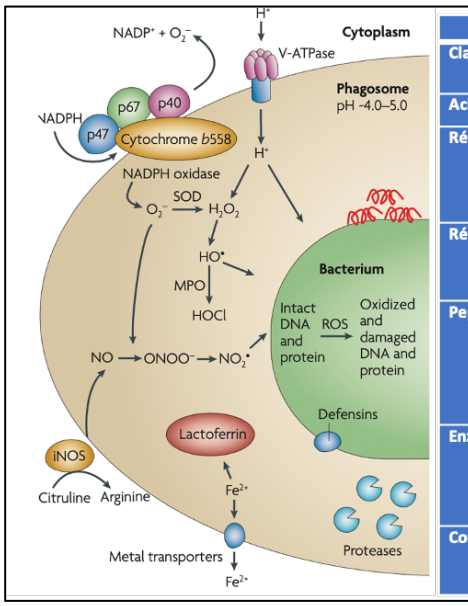


Figure 27. *Génération des espèces réactives de l'oxygène à partir de diverses sources, qui comprennent les enzymes NADPH oxydase. superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO), phagocyte oxidase (Phox) (D'après Brandes et al. 2014).*

c. Enzymes de dégradation (les bactéricides)

Les granulocytes neutrophiles, éosinophiles, basophiles, et mastocytes, renferment des granules cytoplasmiques hétérogènes contenant des enzymes intracellulaires (peroxydase, lysozyme, protéases telles que la cathepsine, phospholipase A2, collagénase), des récepteurs/médiateurs préformés, des protéines cationiques telles que les défensines, la lactoferrine, utilisé pour séquestrer le fer essentiel au

développement des bactéries et d'autres molécules de cellules spécifiques (chimiokines, facteurs de croissance, cytokines) (Flannagan *et al.* 2009) (figure 28).



Mécanismes antimicrobiens des phagocytes		
Classe de mécanisme	**Médiateurs libérés par les macrophages**	**Médiateurs libérés par les neutrophiles**
Acidification	pH = 3,5 – 4,0, bactériostatique ou bactéricide	
Réactifs toxiques de l'oxygène toxiques	Superoxyde O_2^-, peroxyde d'hydrogène H_2O_2, oxygène O_2, radical hydroxyle OH, hypochlorite OCl^-	
Réactifs toxiques d'azote	Oxyde nitrique NO	
Peptides antimicrobiens	Cathélicidine, élastase dérivé des macrophages	α-défensines (HNP1-4), β-défensine HBD4, cathélicidine, azurocidine, protéine induisant la perméabilité bactérienne (BPI), lactoferricine
Enzymes	lysozyme: digère les parois cellulaires de certaines bactéries à Gram positif hydrolases acides (élastase + autres protéases) : décomposition des microbes ingérés	
Concurrents		lactoferrine protéine de liaison au Fe^{2+} et à la vitamine B12

Figure 28. *Arsenal microbicide des phagocytes. Mécanismes défensifs du microorganisme et mécanismes microbicides de l'hôte (Adaptée de Flannagan* et al. *2009).*

Les granulocytes se distinguent sur la base de leurs fonctions immunitaires, des médiateurs qu'ils produisent et de leur accumulation sélective dans des conditions pathologiques (Figure 29).

Les neutrophiles s'accumulent en grandes quantités sur les sites d'infection bactérienne et de lésions tissulaires. Ils possèdent des capacités phagocytaires proéminentes qui leur permettent de séquestrer les microbes et les antigènes pour leur dégradation ultérieure. Ils produisent également de grandes quantités

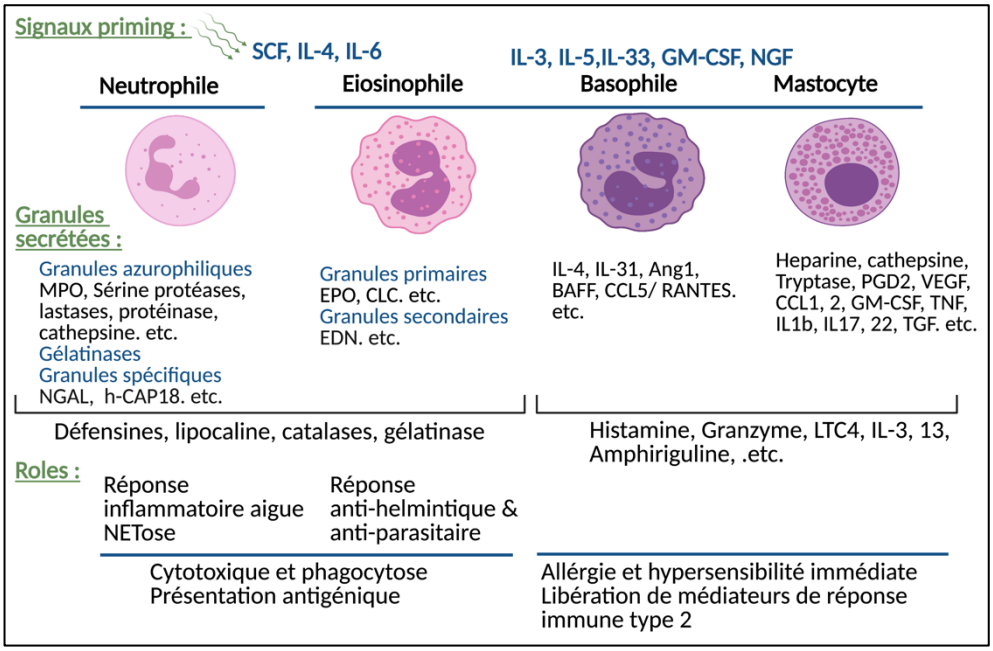


Figure 19. *Différentes populations granulocytaires, et mastocytes avec leurs médiateurs et rôles respectifs*

de ROS et des enzymes impliquées dans le remodelage et la réparation des tissulaire (Sadik *et al.* 2011 ; De Santo *et al.* 2010 ; Borregaard 2010).

Les éosinophiles se distinguent par leurs granules cytoplasmiques qui contiennent des molécules toxiques et des enzymes particulièrement actives contre les helminthes et autres parasites (Lee *et al.* 2012). Les basophiles et les mastocytes sont des cellules morphologiquement similaires. Ils expriment des récepteurs de haute affinité pour les IgE (FcεRI), et sont donc des initiateurs clés des réponses d'hypersensibilité immédiate et de la réponse de l'hôte aux parasites helminthiques *(Mukai et al. 2005 ; Voehringer 2013)* (Figure 29).

d. Présentation d'Ag

Les DC peuvent reconnaître et internaliser une pléthore d'antigènes différents, provenant de virus, de bactéries, de parasites, mais aussi de cellules de soi mourantes ou d'Ag protéique circulants (Durai et Murphy 2016). Elles sont considérées comme cellules présentatrices d'antigènes professionnelles par excellence, grâce à leurs capacités à stimuler les lymphocytes T naïfs en leurs présentant les antigènes sous forme de peptides fixés aux molécules du CMH-I ou du CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I ou de type II), et sont donc au cœur de l'initiation des réponses immunitaires adaptatives (Mellman et Steinman 2001; Steinman *et al.* 1993) (Figure 30).

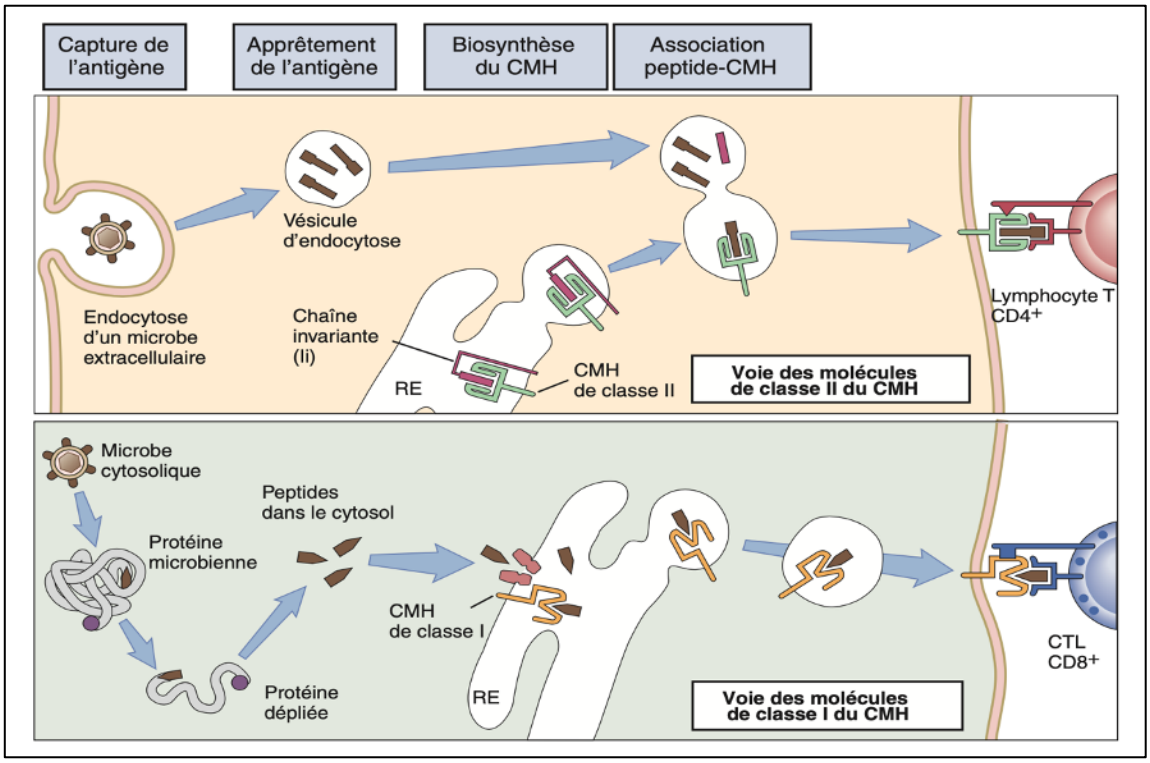


Figure 30. *Voies d'apprêtement intracellulaire des antigènes protéiques. La voie des molécules du CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigènes convertit les antigènes protéiques endocytés dans des vésicules en peptides qui se lient aux molécules de classe II du CMH pour être reconnus par les lymphocytes T CD4+. La voie des molécules du CMH de classe I convertit les protéines se trouvant dans le cytoplasme en peptides qui se lient aux molécules de classe I du CMH afin qu'ils soient reconnus par les lymphocytes T CD8⁺.(D'après Abbas et al. 2009).*

En situation non pathologique, les DCs sont impliquées dans la tolérance des lymphocytes T pour éviter des réponses auto-immunes inappropriées dans un contexte non inflammatoire ; ils induisent alors la délétion clonale ou l'anergie des lymphocytes T et favorisent le développement de lymphocytes T régulateurs. Au contraire, en présence d'agents pathogènes, les DCs induisent une réponse immunitaire appropriée. Ainsi en présence de signaux de danger ou de cytokines pro-inflammatoires, les DCs évolueront vers un phénotype mature caractérisé notamment par une modulation de l'expression de leurs récepteurs de chimiokines. En particulier, elles vont exprimer CCR7 afin de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. En parallèle les DCs augmentent l'expression des molécules de co-stimulation associées à la présentation des Ag aux lymphocytes T et intensifient la production des cytokines impliquées dans l'orientation de la réponse immunitaire. Les cytokines secrétées dépendent des stimuli rencontrés et de la sous population de DC activée (Fancke et O'Keeffe 2013 ; Banchereau *et al.* 2000).

1.1.2. Réponse immune adaptative

La réponse adaptative est une réponse ciblée spécifique impliquant deux populations cellulaires, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes B et T naïfs expriment chacun à leur surface un récepteur membranaire spécifique d'un produit par des mécanismes de recombinaison aléatoire de segments de gènes. L'activation d'un lymphocyte est sélectionnée après reconnaissance d'un antigène. Ces réactions de recombinaison site-spécifique permettent de créer une grande diversité de récepteurs de cellules T et d'immunoglobulines, nécessaires à la reconnaissance de l'immense variété d'antigènes étrangers, fournissant de la sorte une réponse adaptée à un antigène donné. Une petite fraction de lymphocytes activés se différencie et acquiert toutes les propriétés phénotypiques et fonctionnelles caractéristiques des lymphocytes mémoires, capables de conférer une immunité de protection contre une seconde infection chez l'hôte immunisé. Cette réponse immunitaire est polarisée vers une immunité à médiation cellulaire, qui comprend la destruction des cellules infectées par cytotoxicité, ou une immunité à médiation humorale, qui comprend la génération d'anticorps (Janeway 1989 ; Krammer *et al.* 2007 ; Chang *et al.* 2014).

a. Les cellules lymphocytaires

Les précurseurs des lymphocytes T proviennent de la moelle osseuse à partir du lignage lymphoïde (progéniteur lymphoïde commun). Les LTs migrent par la suite vers le thymus exprimant à la fois les récepteurs CD4 et CD8. Dans le thymus, ils subissent une sélection positive et négative pour finalement donner naissance à des cellules T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ simples positives. Les cellules T matures résident dans les organes lymphoïdes périphériques jusqu'à ce qu'elles rencontrent des signaux d'activation qui dirigent leur migration vers les sites d'inflammation (Bonilla et Oettgen 2010).

Les lymphocytes T expriment un récepteur TcR hétérodimérique de nature αβ pour 95% ou γδ pour 1 à 10 %. Les récepteurs TcR sont associés sur la membrane à un complexe moléculaire CD3, capables de traduire le signal. Il existe deux populations de lymphocytes T :

- Les lymphocytes T exprimant le CD4 qui sont dits auxilliaires (helper), leur rôle consiste principalement à favoriser les fonctions effectrices des lymphocytes B ou des lymphocytes T cytotoxiques. Après signal d'activation initiale, les cellules T CD4 naïves se différencient en différents lignages avec des phénotypes aux fonctions distincts, stables et spécialisés. Il s'agit d'un processus piloté par des facteurs de transcription, qui oriente le T CD4 vers des profils distincts, et caractérisés par des signatures cytokiniques spécifiques, induisant des changements épigénétiques discrets mais séquentiels dans la cellule T CD4. Le pool de T CD4 activé résultant forme un sous-ensemble diversifié et hétérogène de populations effectrices, en fonction des stimuli instructifs reçus par la cellule présentatrice d'Ag (APC) et de l'environnement inflammatoire. Les T CD4 jouent un rôle essentiel dans l'établissement d'une réponse immunitaire efficace. Cependant, ils peuvent aider la réponse immunitaire en dirigeant d'autres cellules effectrices pour qu'elles remplissent ces fonctions. Ceci est régi par leur mode d'activation. En effet l'interaction entre le TcR et le peptide antigénique fixé au CMH-II induit la différenciation des T CD4 naïfs en différentes sous-populations. Ces différentes sous-populations de cellules T CD4 peuvent être classées en fonction de leur signature cytokinique spécifique et de l'expression de leurs facteurs de transcription caractéristiques de la lignée. Sur la base de ces critères, sept sous-populations majeures de lymphocytes T CD4 ont été décrites : les lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2, Th17 et Th9, Th22), ainsi que les cellules T régulatrices (Treg) et, les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh) (Romagnani 1997 ; Akdis *et al.* 2012 ; Belkaid 2007) (Figure 31).

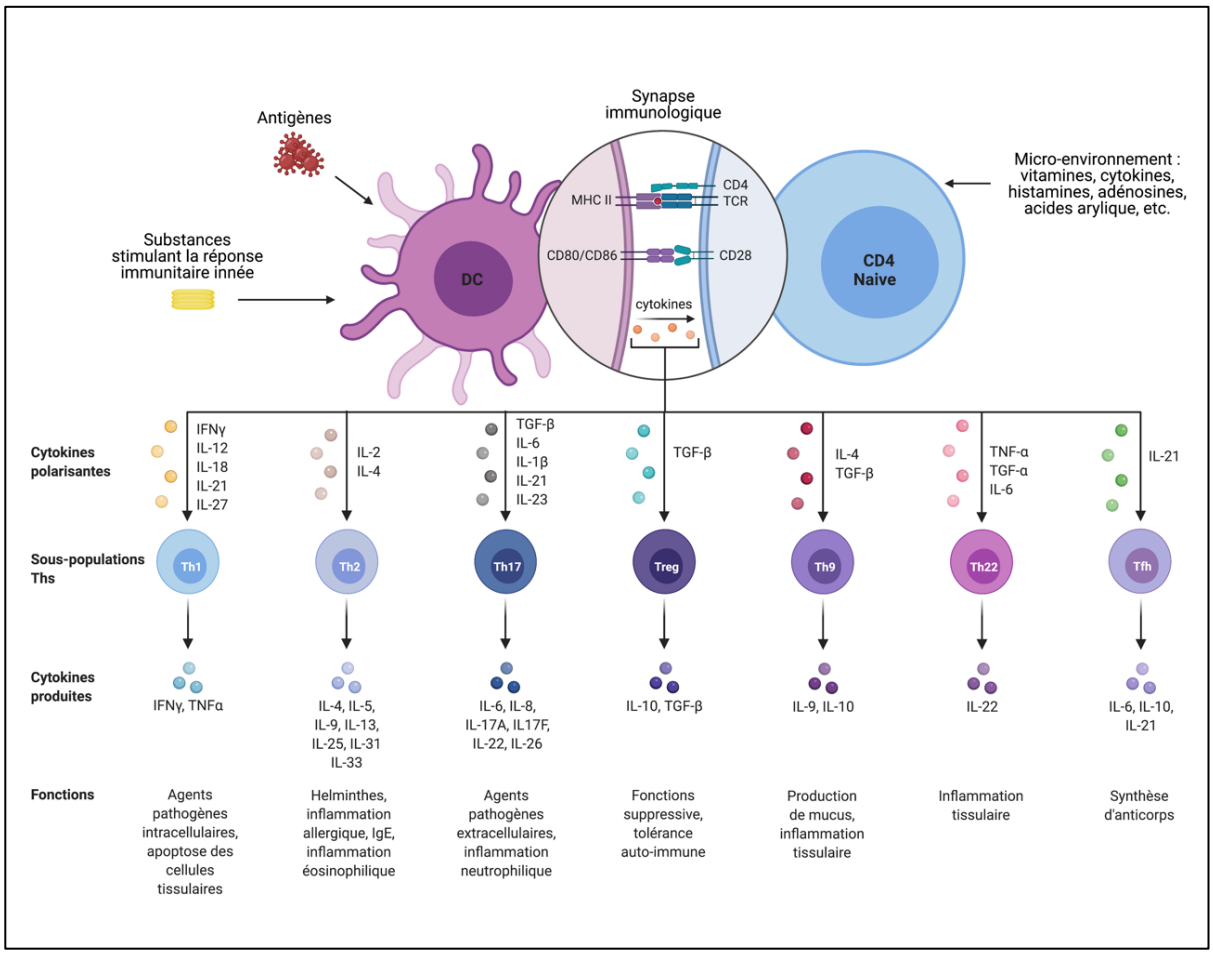


Figure 31. *Différenciation des LT CD4⁺ effecteurs. Après activation par un antigène, les cytokines sécrétées dans le microenvironnement conditionnent le sous-type de LT effecteurs. Les Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et Treg sont définis selon l'expression de différents facteurs de transcription, selon la production de cytokines et l'expression de récepteurs à certaines chimiokines.*

- Les lymphocytes T exprimant le CD8 qui sont dits cytotoxiques, capables de lyser les cellules reconnues grâce à leur TcR. Au cours des réponses de type 1, les cellules T CD8 naïves se différencient par expansion clonale en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) tueurs. Ces derniers produisent les granzymes et les perforines (protéines lysant les cellules infectées), ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ et le TNFα. Les cellules T CD8 sont activées par interaction du TcR avec des fragments antigéniques fixés aux molécules du CMH-I sur la cellule présentatrice d'Ag (APC), en combinaison avec des signaux de co-stimulation. L'IL-2, sécrétée par les cellules Th-1, stimule en outre l'expansion clonale des cellules T CD8. Dans certaines circonstances, les cellules T CD8 peuvent également être activées en l'absence de présentation d'antigène et de stimulation par le TcR. Cela entraîne une expansion polyclonale et peut se produire, par exemple, en présence de certaines combinaisons de cytokines inflammatoires (Kaech et Cui 2012) (Figure 32).

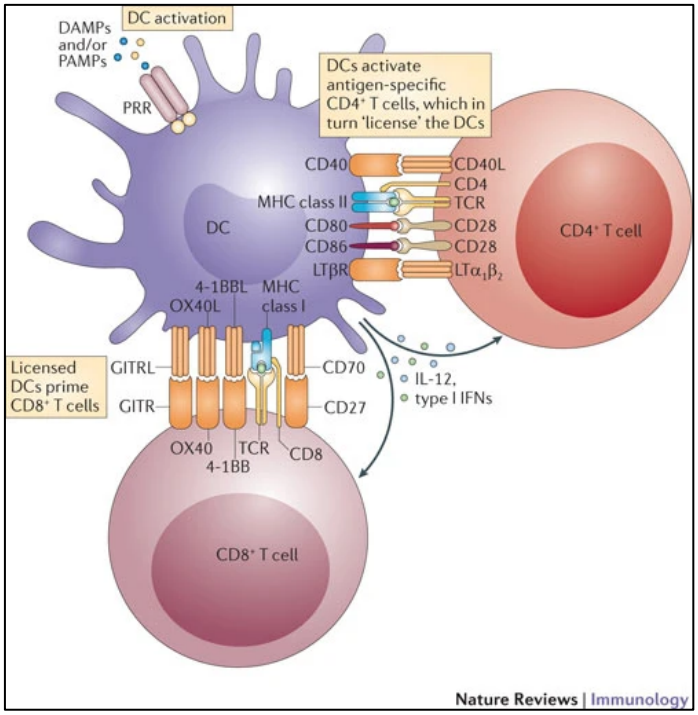


Figure 32. *Synapse immunologique entre cellule dendrétique DC et lyphocytes TCD4 et TCD8. L'activation des DCs par les PAMPs ou les DAMPs régulent à la hausse leur molécules CD40, MHC et des molécules co-stimulantes CD80 et CD86. La présentation d'antigènes peptidiques dans le contexte des molécules du CMH de classe II à des cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène associée à des signaux de co-stimulation (provenant de CD80 et/ou CD86), entraîne l'activation des cellules T CD4⁺ et la régulation positive de les facteurs CD40 ligand (CD40L) et lymphotoxin-α 1β 2 (LTα 1 β 2). L'expression de CD40L et LTα 1 β 2 sur les cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène activé induit la signalisation via CD40 et le récepteur LTβ (LTβR). L'amorçage du CD8⁺ par les peptides restreints au CMH de classe I entraînent une régulation positive de CD27, 4-1BB, OX40 et GITR. (D'après (deLuca & Gommerman, 2012).*

- Les lymphocytes B (LB) sont produits et différenciés dans la moelle osseuse à partir du progéniteur lymphoïde commun. Les LB naïfs sont activées après interaction entre leurs récepteurs BcR et l'antigène présenté par les molécules du CMH II par les APC, et le signal CD40/ CD40L. Après ces interactions, le LB activé se différencie en plasmocytes, cellules sécrétrices d'immunoglobulines, chaque LB produit des cytokines ainsi que des immunoglobulines dont la spécificité est unique (exclusion allélique) (Elgueta *et al.* 2009 ; De Silva et Klein 2015).

1.1.3. Expression de médiateurs de la réponse immune

L'interaction récepteurs/microbes sur les cellules permet le déclenchement de fonctions effectrices adaptées citées ci-dessous. En effet, en réponse à la présence d'agents étrangers, les leucocytes sécrètent des cytokines qui servent de médiateurs dans de nombreuses réactions cellulaires d'immunité innée, mais servent également à dicter le devenir de la réponse adaptative. Les cytokines sont des messagers physiologiques de la communication intercellulaire. Elles ont une action pléiotrope autocrine, paracrine ou endocrine, à la différence des hormones, les cytokines sont induites dans plusieurs types cellulaires, agissent sur de nombreuses cellules, et sont caractérisées par un large spectre d'action et une redondance. Les macrophages peuvent subir une activation et une polarisation différentes en fonction du signal environnant perçu. A l'origine deux sous-types majeurs de macrophages ont été définis : les macrophages de type I (M1) et les macrophages de type II (M2), ces profils sont analogues aux états de polarisation Th1-Th2 des cellules T décrits pour la première fois par Mosmann en 1986 (Figure 33).

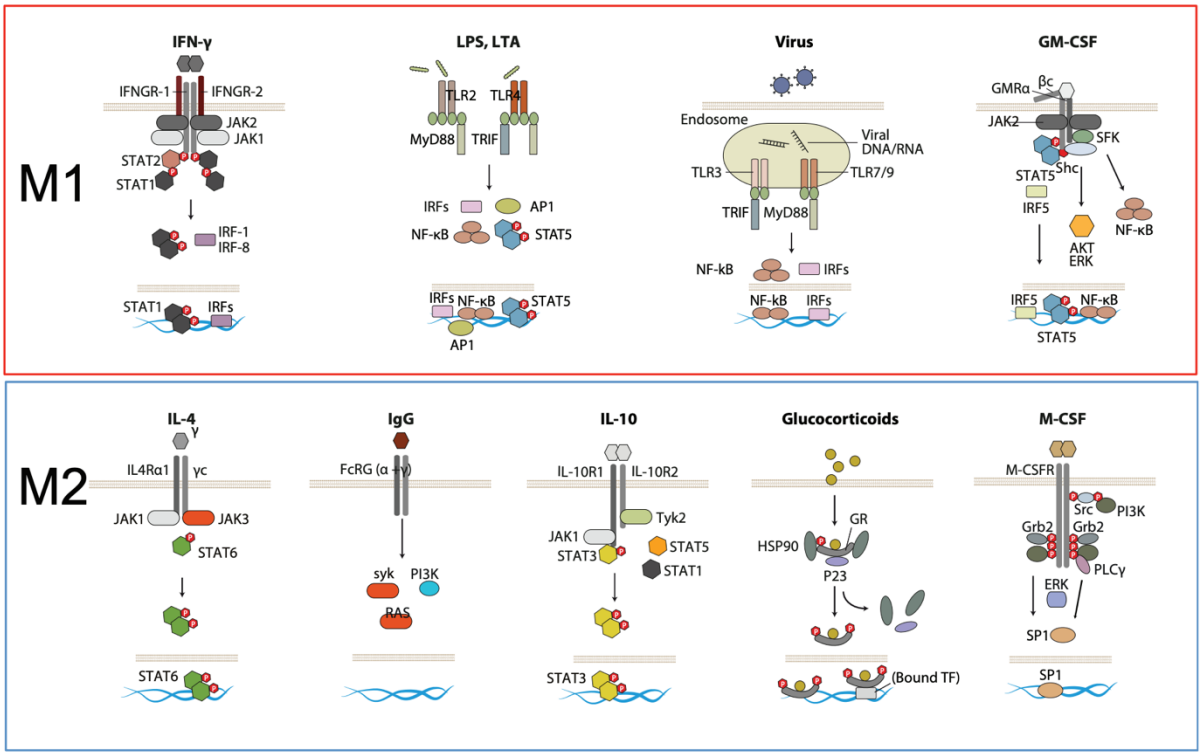


Figure 33. *Principaux stimuli impliqués dans les voies de signalisation intracellulaires de la polarisation des macrophages. Les macrophages M1 sont activés par l'IFNγ, le LPS ou le GM-CSF tandis que les macrophages M2 sont activés par l'IL-4, les IgG, l'IL-10, le M-CSF ou les glucocorticoïdes (D'après Martinez et Gordon 2014).*

Les macrophages s'activent et se polarisent en sous-type M1 en contact de l'endotoxin lipopolysaccharide (LPS) ou dans un environnement riche en IFNγ, TNFα ou GM- CSF, ce phénotype M1 est caractérisé par l'expression de niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, une production élevée d'intermédiaires réactifs d'azote et d'oxygène, la promotion de la réponse Th1 et une forte activité microbicide et tumoricide. A l'inverse, les M2 sont induits en réponse à l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, le M- CSF ou bien encore les glucocorticoides, ils sont impliqués dans la claustration des parasites, la promotion du remodelage tissulaire et de la progression tumorale et pour avoir des fonctions immuno-régulatrices. Ils sont caractérisés par une activité phagocytaire efficace, une expression élevée des molécules de piégeage, l'expression des récepteurs du mannose et du SR (Scavenger Receptor) ; une surexpression de la voie de l'arginase avec surexpression du gène Arg1 (Mantovani *et al.* 2004), et une forte expression d'IL-10 (Figure 33).

En plus de cette différence caractéristique de l'expression des cytokines, des chimiokines et des marqueurs de surface. Une signature moléculaire et une régulation transcriptionnelle différentes, ainsi que des variations métaboliques nettes sont observées entre les deux phénotypes M1 et M2.

Le métabolisme différentiel de l'arginine est à ce jour l'un des facteurs les plus fiables pour la discrimination des macrophages M1 et M2 dans les PBMC humains cultivés avec IFN-γ ou TNF-α. En

outre, les métabolismes des acides aminés, du glucose, de l'oxygène, des lipides, du fer sont affectés lors de la polarisation (Figure 34).

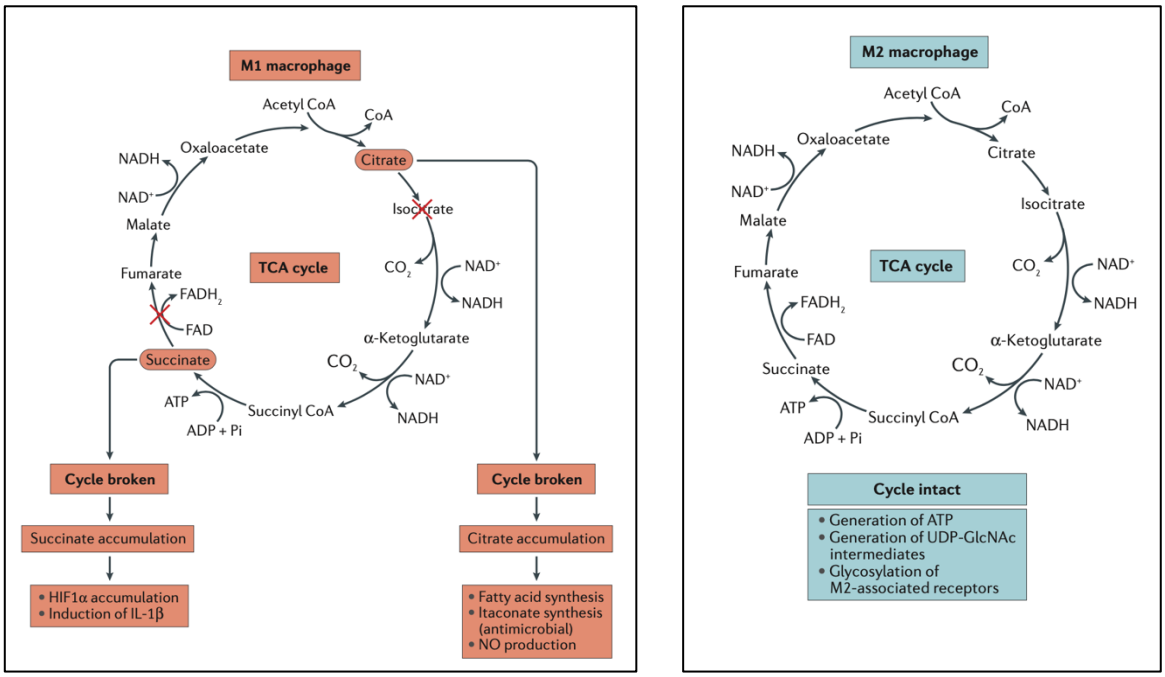


Figure 34. *Cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) dans les macrophages. Dans les macrophages M2, le cycle TCA est inactif et participe à la phosphorylation oxydative, fournissant de l'ATP pour l'énergie. Dans les macrophages M1, le cycle TCA est interrompu en deux endroits - après le citrate et après le succinate. Le citrate est utilisé pour générer des acides gras pour la biogenèse membranaire et également pour la production de prostaglandines. Il génère également de l'acide itaconique via l'enzyme IRG1 (Immune responsive gene 1). L'acide itaconique a une activité antimicrobienne directe contre Mycobacterium tuberculosis et Salmonella sp. HIF-1α, hypoxie - facteur inductible 1α (D'après O'Neill et al. 2016).*

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont une sous-population récemment décrite de lymphocytes qui résident dans les tissus périphériques et sont particulièrement abondants au niveau des barrières naturelles, contrairement aux lymphocytes adaptatifs qui sont eux plus nombreux dans les organes lymphoïdes (Spits et Di Santo 2011). Les ILCs se distinguent des deux autres lignées lymphoïdes T et B, par l'absence de réarrangements de récepteurs génomiques ou de sélection clonale et sont donc dépourvues de récepteurs spécifiques de l'antigène. Ils réagissent aux perturbations tissulaires indépendamment de la stimulation antigénique, et la polarisation de leurs fonctions effectrices est une caractéristique qui survient en grande partie au cours de leur développement, plutôt qu'au moment de leur stimulation et activation immunologique (Kotas et Locksley 2018). Malgré ces différences avec les lymphocytes adaptatifs, les ILCs sont très proches phénotypiquement et fonctionnellement des lymphocytes T. En plus des cellules tueuses naturelles conventionnelles (NK), qui peuvent être considérées comme des homologues innée des cellules T CD8 cytotoxiques, trois sous-population majeurs d'ILCs auxiliaires - appelés ILC1, ILC2 et ILC3 - ont été défini par leurs ressemblances phénotypiques respectives aux sous-populations de cellules T helper Th1, Th2 et Th17. Les ILCs, à l'inverse des lymphocytes T, n'expriment pas les récepteurs suivants : CD3, CD19, CD56,

CD68 et CD205. Tout ce panel est souvent désigné comme « cell lineage marker negative » (Lin^-) (Spits *et al.* 2013) (Figure 35).

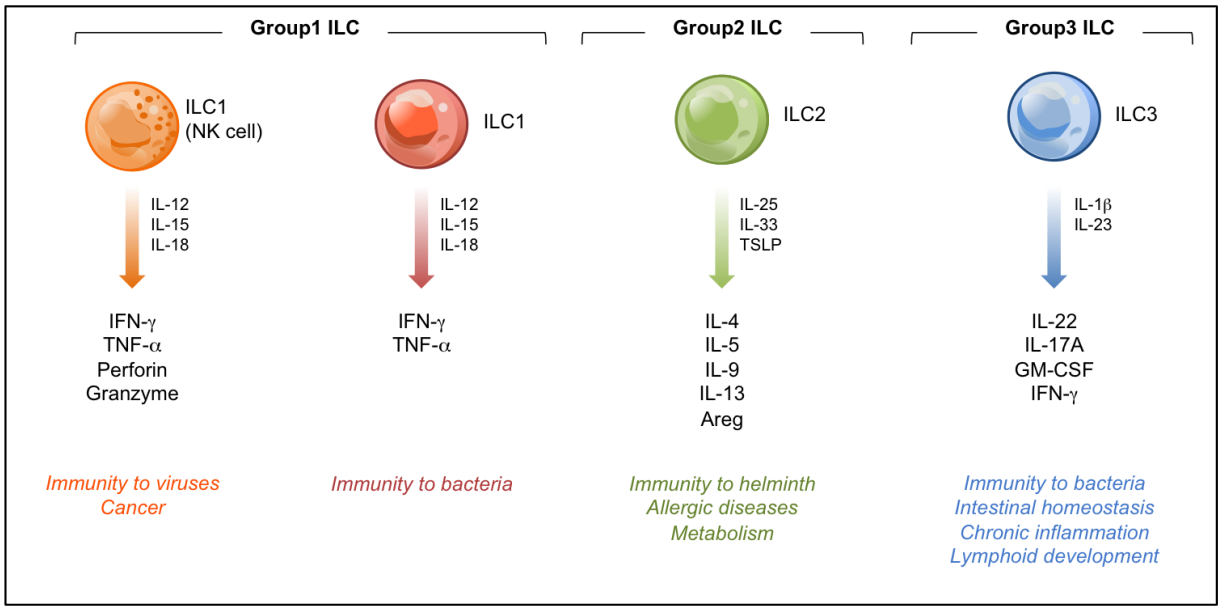


Figure 35. *Différents sous-types d'ILC matures (Zook and Kee, 2016).*

2. Fer et système immunitaire

2.1. Immunométabolisme et fer

2.1.1. Fer et macrophages M1/M2

a. Facteurs inflammatoires influençant le métabolisme du fer

Les signaux cellulaires intrinsèques et extrinsèques reçus par la cellule régulent l'activité de diverses machineries métaboliques qui conduisent à la génération de produits clés. Ceux-ci répondent aux besoins de la cellule, notamment pour maintenir sa survie, sa croissance ou sa différenciation. Dans le contexte immunitaire, les modifications des voies métaboliques sont associées à des fonctions immunitaires effectrices distinctes, qui répondent notamment par la production d'un ensemble différent de cytokines. La polarisation et la plasticité fonctionnelle des macrophages sont en effet orchestrées par divers aspects métaboliques. Selon leur microenvironnement, les macrophages subissent une reprogrammation complexe qui leur permet d'acquérir différents phénotypes fonctionnels. Comme mentionné précédemment, les sous-ensembles M1 et M2 sont caractérisés par l'expression différentielle de cytokines, chimiokines et marqueurs de surface caractéristiques. Cette signature moléculaire est clairement appréciée par la différence du métabolome entre les phénotypes M1 et M2, qui se traduit notamment par des modifications du métabolisme des acides aminés, du glucose, de l'oxygène, des lipides et du fer. (O'Neill *et al.* 2016).

Comme indiqué dans la première section, au niveau systémique, les macrophages sont les principales cellules de coordination dans le trafic du fer (Soares et Hamza 2016). Conformément à leurs

différentes fonctions biologiques, les macrophages polarisés montrent une expression distincte des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. Des études *in vitro* sur des macrophages murins et humains ont montré que la population de macrophages M1 a une teneur élevée en ferritine caractérisée par une forte capacité de stockage du fer qui est également cohérente avec leurs propriétés bactériostatiques, tandis que la population M2 a une teneur élevée en ferroportine caractérisée par une capacité d'exportation de fer. De plus, les macrophages M2 présentent un potentiel d'absorption élevé dépendant du CD163 et du catabolisme du fer associé à l'hème oxygénase (Corna *et al.* 2010; Gaetano *et al.* 2010) (Figure 36).

Ces différences dans l'expression des niveaux de médiateurs du métabolisme du fer peuvent également être associées à d'autres métabolites exprimés par les sous-populations respectives. Les macrophages pro-inflammatoires M1, par exemple, utilisent l'itaconate comme composé antimicrobien. Le substrat cis-aconitate est un intermédiaire qui peut soit *via* l'activité de l'enzyme Irg1 donner de l'acitonate, soit *via* l'activité de l'aconitase convertir le citrate en isocitrate. L'aconitase est une forme alternative de protéine régulatrice du fer IRP1, dont l'activité dépend de la disponibilité du fer pour passer à une holoforme active pour l'assemblage des cluster fer-soufre, tandis que l'apoforme se lie à l'ARN pour le contrôle des protéines impliquées dans l'utilisation intracellulaire, le stockage ou le transport du fer (Recalcati *et al.* 2019 ; Cairo *et al.* 2011) (figure 36).

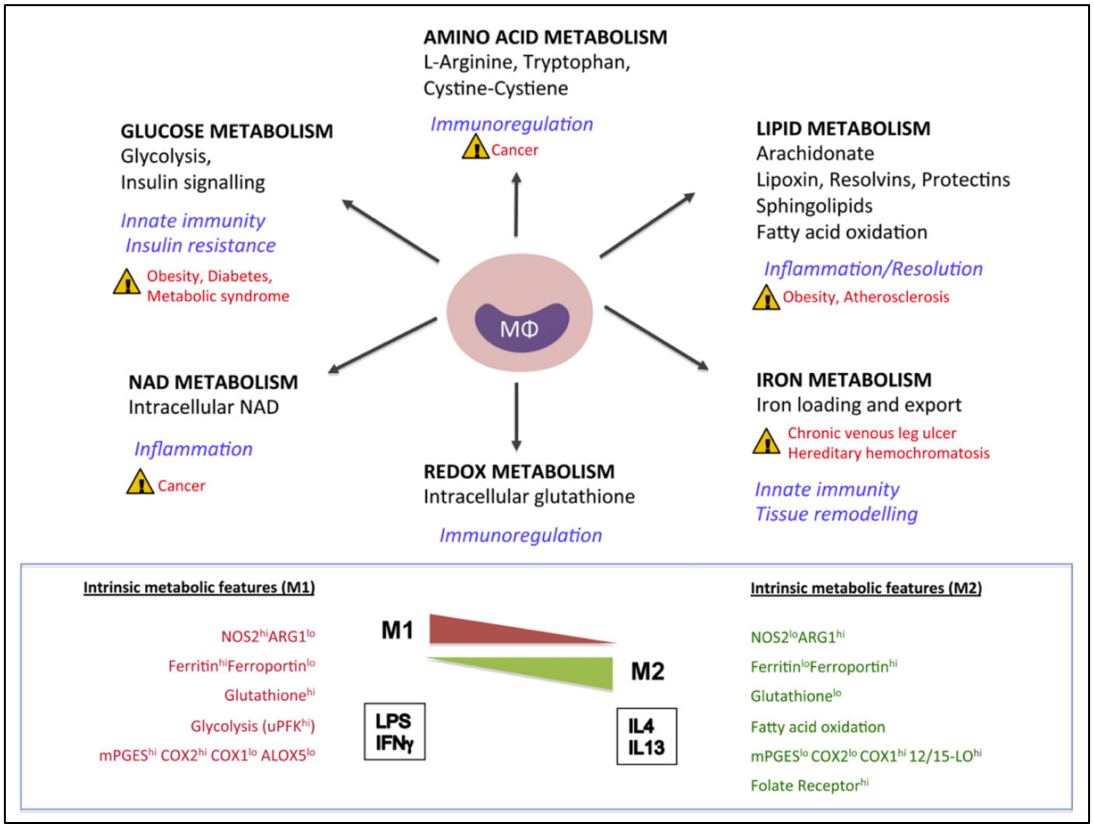


Figure 36. *Caractérisation phénotypique des macrophages M1 et M2 (D'après Biswas et Mantovani 2011).*

Un travail antérieur mené par notre équipe, *in vitro* sur des macrophages dérivés de la moelle osseuse a montré que l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine dans des conditions inflammatoires dépend du phénotype des macrophages. Les macrophages M1 polarisés *via* l'IFNγ et stimulé *via* les ligands TLRs notamment par LPS/ TLR4 présentent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6) parallèlement à une induction d'hepcidine (Agoro et Mura 2016). Inversement, les macrophages M2 polarisés par IL-4 sont associés à un faible taux de cytokines pro-inflammatoires, d'hepcidine, et à une absence de réponse à la ferroportine. De plus, l'analyse des voies moléculaires par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques indique que la voie PI3K est essentielle dans la régulation de l'hepcidine et de la ferroportine. L'inhibition PI3K abolit la régulation de la ferroprotine et amplifie la réponse de l'hepcidine à TLR4. De même pour l'inhibition de la voie ERK1/2, par contre, l'inhibiteur de p38-MAPK altère l'expression de l'hepcidine et exacerbe la régulation négative de la ferroportine dans les macrophages stimulés par le LPS. PI3K est une activité clé dans la polarisation des macrophages, elle permet la transition énergétique des cellules nécessaire à la programmation fonctionnelle. Cette voie stimule la polarisation M2 et constitue un mécanisme de sécurité pour éviter une réaction pro-inflammatoire excessive ou prolongée. Ainsi, TLR4 active la voie pro-inflammatoire M1, et recrute également l'activité PI3K qui repolarise les macrophages vers un profil M2 de résolution (Agoro et Mura 2016). De plus, les métabolites produits lors de l'activation des macrophages contribuent à leurs fonctionnalités pro ou anti-inflammatoire. Il est par exemple observé que l'accumulation du lactate produit par les macrophages M1 activés au cours du cycle de glycolyse tend à avoir une action immunosuppressive sur ces derniers en favorisant leurs repolarisations vers un profil de macrophages M2 de résolution. Ce mécanisme permet un rôle immunorégulateur afin de moduler l'ampleur et la durée de la réponse pro-inflammatoire impliquée (O'Neill *et al.* 2016) (Figure 36).

b. Influence du fer sur le phénotype des macrophages

Des observations divergentes sont rapportées dans la littérature sur l'effet du fer sur la polarisation des macrophages. Les données concernant les macrophages associés au tumeurs (TAMs) sont bien documentées. L'environnement tumoral consiste en une niche hétérogène de sous population cellulaires immunosuppressives, elle comporte parmi d'autres, des cellules T régulatrices (Treg), les T helper de type 2 (Th2), des LBs, ainsi qu'une sous population de macrophages associés au tumeurs (TAMs) (Alberto Mantovani et Sica 2010). Les TAMs subissent une reprogrammation notamment métabolique, génétique et épigénétiques qui les orientent vers un phénotype dit M2-like inadéquat au contrôle tumoral et a donc une influence majeure sur la progression et la résistance aux thérapies anticancéreuses (Noy et Pollard 2014 ; Taube *et al.* 2018). Certains travaux décrivent que l'utilisation de chélateurs de fer intracellulaires induit un switch des macrophages TAMs d'un profil d'exportation à un profil de stockage de fer, ceux-ci étant décrits comme des caractéristiques phénotypiques des macrophages M2 et M1, respectivement (Zhou et al. 2013). Par ailleurs, d'autres rapports soutiennent que de fortes doses

de fer fournies par du ferrique citrate déplaceraient plutôt le phénotype de type M2 des TAM vers un phénotype anti-tumoral M1 (Zhou et al. 2018 ; Alkhateeb *et al.* 2013). Plus intéressant encore, selon une observation faite fortuitement lors de l'étude du potentiel des nanoparticules de fer «ferumoxytol» comme source potentielle de délivrance de molécules chimiothérapeutiques de manière ciblée sur les cellules cancéreuses, les auteurs ont remarqué que leurs groupes témoins ayant reçu le placebo ferumoxytol non chargé avec le principe actif thérapeutique montre un meilleur contrôle de la croissance tumorale (Zanganeh *et al.* 2016). L'étude détaillée du mécanisme impliqué dans la résolution tumorale *via* le ferumoxytol a montré que l'effet protecteur observé était le résultat de la reprogrammation des macrophages TAMs vers un profil pro-tumoral M1 après internalisation des nanoparticules de fer. Les auteurs de ce travail concluent que les nanoparticules d'oxyde de fer ont un rôle intrinsèque dans la polarisation des macrophages tumoraux en un phénotype M1 pro-inflammatoire. Puisque le ferumoxytol est un médicament approuvé par la FDA, ces résultats ont conduit à des essais cliniques sur patients cancéreux *(Daldrup-Link 2017).*

c. Fer et lymphocytes T (LTs)

Les premières preuves d'un lien potentiel entre le métabolisme du fer et celui des lymphocytes provient d'études menées sur des patients atteints d'hémochromatose héréditaire. Ces derniers présentent moins de lymphocytes T $CD8^+$ circulants. Le degré de gravité de l'hémochromatose est évalué par la charge en fer et les lésions hépatiques. Les patients présentant des taux de fer élevés ainsi que des lésions hépatiques sévères ont un faible nombre de lymphocytes T $CD8^+$ (Cardoso *et al.* 2001 ; Cruz *et al.* 2006). Ces associations cliniques ont soulevé la question de savoir si la baisse du nombre de lymphocytes T CD8 est précoce, et serait donc directement liée au défaut génétique ou si elle était plutôt le résultat de l'évolution de la pathologie, et serait donc la conséquence de la surcharge martiale (Cruz *et al.* 2004 ; Cruz *et al.* 2006). Plusieurs observations soutiennent l'hypothèse que cette diminution des lymphocytes T $CD8^+$ est transmise génétiquement avec la mutation de l'haplotype CMH, et suggèrent une association étroite entre les gènes de la région CMH I et celles des lymphocytes T CD8 (Almeida *et al.* 2005). De plus, les cellules myéloïdes de patients hémochromatosiques porteurs de la mutation C282Y montrent moins d'expression du CMH I à leur surface, en raison d'un défaut de repliement protéique et de leur rétention au niveau du réticulum endoplasmique (Almeida *et al.* 2007). Par ailleurs plusieurs études ont documenté le fait que les patients hémochromatosiques présentent une maturation défectueuse des cellules effectrices TCD8, où ces dernières perdent l'expression à la fois des corécepteurs CD27 et CD28, molécules co-stimulatrices qui jouent un rôle dans le deuxième signal d'activation du LT CD8 après activation *via* le premier signal de reconnaissance CMH I-TCR et transduction du signal CD3 (Reuben *et al.* 2017). De plus, les patients hémochromatosiques présentent une prédominance de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et l'IL-4 qui peuvent fournir un

environnement plus favorable pour une polarisation Th2 dans certains contextes inflammatoires (Fabio *et al.* 2002).

L'activation et l'expansion des lymphocytes T (LTs) dépendent de l'expression de TfR1, qui intervient, entre autres, dans la synthèse et la division cellulaires, ces cellules synthétisent également de la ferritine à leur état actif ou non (Neckers et Cossman 1983 ; Vezzoni *et al.* 1986). De manière plus intéressante, une étude *in vitro* a montré que les LTs expriment un niveau basal d'hepcidine, celui-ci augmente lors de l'activation du LT en réponse à l'holo-TF et au citrate ferrique. Cette étude introduit l'axe de régulation hepcidine - ferroportine en tant que nouvel acteur de l'homéostasie des lymphocytes T, mais cet aspect reste à être caractérisé (Pinto *et al.* 2010). De manière plus surprenante, certains patients atteints d'immunodéficience combinée sévère (CID) présentaient une mutation rare du récepteur TfR1. Ces patients sont généralement connus pour être sensibles aux infections en raison d'une mauvaise réponse du système immunitaire adaptatif. La substitution d'un seul acide aminé dans TfR1 (Y20H) affecte l'absorption du fer dans les cellules T et B, entraînant une faible prolifération des lymphocytes ainsi qu'une commutation istotypique des classes d'anticorps. Le modèle murin *Tfrc* $^{Y20H/Y20H}$ a confirmé le phénotype observé chez l'homme (Jabara *et al.* 2016).

2.2. Inflammation et fer

a. Interactions entre réponse inflammatoire et métabolisme du fer

Les événements inflammatoires, incluant infections, néoplasie, ainsi que les inflammations stériles induites expérimentalement par certains PAMPs tels que l'endotoxine bactérienne LPS, ou *via* les signaux de dangers associés aux dégâts cellulaires (DAMPs), par administration de térébenthine ou de carraghénine par exemple, entraînent de profondes modifications du métabolisme du fer. En effet, les états inflammatoires se traduisent aussi par des modifications des paramètres du métabolisme du fer, dont le plus important est la rétention du fer tissulaire conduisant à l'hypoferrémie. Cette réduction de la disponibilité du fer bloque la croissance bactérienne, mais conduit également à un manque de biodisponibilité de fer nécessaire pour l'hématopoïèse aboutissant à l'apparition de l'anémie des maladies inflammatoires chroniques (Dallman 1987).

La réponse de phase inflammatoire aiguë est caractérisée par la sécrétion hépatocytaire d'un grand nombre de protéines sériques, dits protéines de la phase aiguë. L'inflammation comprend l'intervention précoce de l'ensemble des cellules de l'immunité innée incluant cellules endothéliales, cellules polymorphonucléaires, et phagocytes, ces derniers répondent notamment par la sécrétion rapide de cytokines telles que le TNF, l'IFN, l'IL-1, et l'IL-6. Il a été démontré que de tels facteurs ont un impact direct ou indirect sur le métabolisme du fer en affectant la synthèse des protéines impliquées dans la liaison, le stockage ou le transport du fer. De plus, les cellules polynucléaires sont connues pour libérer

plusieurs protéines lors de la dégranulation, parmi lesquelles des protéines de liaison au fer telles que la lactoferrine et la lipocaline, ces protéines participent à l'hypoferrémie associée à l'inflammation. L'inflammation conduit à une diminution marquée du pool de fer labile et un stockage favorisé du fer dans la ferritine (Ward *et al.* 2011).

Ainsi, les maladies chroniques, sont caractérisées par une proportion accrue de fer intracellulaire sous forme d'hémosidérine, forme moins facilement mobilisable pour passer sous forme libre que la ferritine (Tableau 4). La ferritine sérique est augmentée chez les patients souffrant de troubles inflammatoires indépendamment du fer. Contrairement à la ferritine tissulaire intracellulaire, une grande partie de la ferritine sérique circulante est glycosylée, la glycosylation étant une caractéristique des protéines plasmatiques sécrétoires (Clegg *et al.* 1981 ; Covell *et al.* 1984). Cependant, les sérums de patients contiennent généralement les deux formes de ferritine, glycosylée et non glycosylée, ce qui implique que les lésions tissulaires massives entraînent également la libération de la ferritine tissulaire

Tableau 4. *Paramètres du métabolisme du fer chez les patients atteints de maladies inflammatoires vs carence en fer*

Paramètres du Métabolisme de fer	***Inflammation***	***Anémie ferriprive***
Libération du fer tissulaire	Diminution	Augmentation
Stock tissulaire de fer	Augmentation	Diminution
Absorption de fer	Diminution	Augmentation
Fer sérique	Diminution	Diminution
Capacité de liaison totale de la Tf (TIBC)	Diminution	Augmentation
Ferritine sérique	Augmentation	Diminution
Récepteur soluble de Tf (sTfR1)	Diminution ou inchangé	Augmentation
Lactoferine sérique	Diminution	Inchangé
Hémoglobine	Diminution	Diminution
Volume corpusculaire moyen	Diminution ou inchangé	Diminution

Les macrophages sont activement impliqués dans presque tous les aspects de la réponse inflammatoire et probablement aussi dans le métabolisme modifié du fer dans l'inflammation, ces cellules accumulent des niveaux élevés de ferritine lorsqu'elles sont activées. En outre, de plus en plus de rapports soutiennent le concept selon lequel l'hepcidine n'est pas sécrétée uniquement par les hépatocytes et indiquent un rôle des macrophages dans la synthèse de cette hormone notamment lors des épisodes inflammatoires. L'hepcidine est une protéine de la réponse de phase aiguë. Dans les hépatocytes, l'hepcidine est principalement induite par la voie de l'IL-6-STAT3 pendant l'inflammation (Lee *et al.* 2017 ; Sakamori *et al.* 2010), cependant, cette induction peut aussi être médiée par l'IL-1β

(Lee *et al.* 2005) et l'IL-22 (Smith *et al.* 2013). L'effet principal de l'hepcidine est de diminuer le taux de fer circulant, en se liant à son partenaire ferrportine, réduisant de la sorte les niveaux de fer circulants et favorisant la séquestration cellulaire du fer (Nemeth *et al.* 2004). En effet, l'une des stratégies déployées par le système immunitaire inné contre les agents pathogènes invasifs est de les priver des ressources nutritionnelles indispensables à leur développement, dont le fer. D'une part cela aide à contenir l'intrus invasif et à ralentir sa croissance. D'autre part cela laisse à l'hôte le temps d'activer une réponse immunitaire appropriée. Cet aspect de la réponse immunitaire est connu sous la terminologie « immunité nutritionnelle » (Weinberg 1975).

Bien que l'hepcidine ait été initialement identifiée pour sa propriété antimicrobienne, cette fonction reste encore débattue. Cependant son rôle dans le métabolisme du fer et dans les infections a été largement documenté chez l'homme, mais aussi dans divers modèles infectieux murins qui ont fourni des données solides quant à ses implications dans les processus immunitaires.

Toutefois, l'impact réel de la synthèse de l'hepcidine et son rôle hypoferrémique dans la résistance aux infections n'a été documenté que récemment, et les modèles expérimentaux tendent à montrer que son effet dépend étroitement du contexte inflammatoire global, et que son rôle protecteur est limité à certains types d'agents pathogènes.

Par exemple le modèle expérimental au LPS chez la souris montre une induction de la transcription de l'hepcidine hépatique. Cette induction de l'expression de l'hepcidine s'accompagne d'une diminution de la quantité de fer sérique. Par ailleurs, il a été démontré qu'en plus de l'hepcidine hépatique, l'activation des cellules myéloïdes notamment *via* la voie TLR4-LPS induit ces cellules à une production intrinsèque et localisée de l'hepcidine. Ce mécanisme joue un rôle majeur dans la diminution de l'absorption intestinale du fer et sa rétention principalement dans les macrophages (Peyssonnaux *et al.* 2006). De plus, une étude récente sur modèle murin d'inflammation intestinale a révélé que les cellules dendritiques de la lamina propria sont une source importante d'hepcidine. Les analyses de biopsies intestinales de patients atteints de maladie inflammatoires de l'intestin, les IBDs, comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse ont également révélé une expression accrue d'hepcidine, ces niveaux d'hepcidine étant corrélés avec des gènes associés au phénotypes des cellules dendritiques, les auteurs suggèrent que les cDC sont les principales cellules productrices d'hepcidine dans l'inflammation intestinale de type IBD (Bessman *et al.* 2020).

En somme, les modifications des protéines du fer permettent d'une part, *via* les mécanismes de rétention du fer de suivre les taux de fer cellulaire et circulant, notamment pour le contrôle de certains agents infectieux, d'autre part ils jouent indirectement sur de multiples fonctions enzymatiques, sur la prolifération ou différenciation cellulaire.

Ces stratégies basées sur l'immunité nutritionnelle sont particulièrement intéressantes à une époque où la résistance aux microbes augmente, en particulier contre les antibiotiques conventionnels. Ce qui implique donc un besoin d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour lutter contre les menaces microbiennes. Les propriétés de séquestration des métaux (zinc, manganèse, etc.) et en particulier du

fer, ainsi que la manipulation des acteurs de son métabolisme offrent des pistes attractives pour de nouvelles thérapies ou pour soutenir les thérapies conventionnelles afin de proposer de nouvelles méthodes complémentaires pour réussir à traiter avec succès les infections compliquées ou chroniques.

b. Agents pathogènes et leurs besoins en fer

Les agents pathogènes, ou agents infectieux, peuvent être classés en cinq groupes : les virus, les bactéries, les champignons et les parasites, qui regroupent les protozoaires, qui sont des organismes unicellulaires, et les vers parasites, qui quant-à-eux, sont des organismes multicellulaires. Les agents pathogènes peuvent se multiplier et se développer dans l'hôte de manière extra ou intracellulaire, et la réponse immunitaire de l'hôte infecté qui se mettra en jeu contre ces derniers varie justement en fonction du type d'infection. D'une manière générale, les agents pathogènes intracellulaires nécessitent la destruction de cellules infectées par des cellules NK ou des cellules T cytotoxiques, comme mentionné précédemment, cette réponse immunitaire est décrite comme une réponse immunitaire de type 1. Quant aux pathogènes extracellulaires, ils sont éliminés par phagocytose, avec ou sans intervention des anticorps ou des éléments du complément, la réponse immunitaire impliquée contre de tels agents est la réponse immunitaire dite de type 2. En effet, certains pathogènes ont développé une multitude de mécanismes d'évasion au système immunitaire afin d'assurer leur survie, et de maintenir une infection chronique chez l'hôte infecté. Ces mécanismes leur permettent, entre autres, la transmission à d'autres hôtes afin de propager leur espèce.

La survie des microorganismes pathogènes dépend de manière critique de leur capacité à rediriger le fer de l'hôte à leur profit dans leurs propres voies métaboliques. Les agents pathogènes ont développé des stratagèmes pour capter le fer de l'hôte et contourner ces moyens de rétention, et ce, afin d'assurer leur approvisionnement en fer et donc leur survie (Agoro et Mura 2019). Il convient également de mentionner que plusieurs gènes de virulence pathogènes jouent un rôle direct dans l'obtention du fer ou dans la manipulation du transport du fer de l'hôte, reflétant l'importance du fer pour la pérennité microbienne. Ainsi, lors d'une infection, une rivalité mutuelle pour le fer se met en place entre l'agent pathogène essayant d'obtenir du fer de l'hôte et l'hôte infecté essayant de le retenir. Cette dernière stratégie de lutte pour le fer est possible grâce à plusieurs mécanismes moléculaires mis en œuvre par l'hôte qui permettent de contourner ses ressources en fer et ainsi empêcher l'acquisition de fer par le pathogène (Ganz 2009). Les stratégies d'acquisition de fer par les pathogènes, se manifestent principalement par la production de molécules chélatantes du fer appelées sidérophores. Ces derniers ont une forte affinité pour le fer et rentrent donc en compétition avec la transferrine pour l'absorption du fer plasmatique. Certaines autres bactéries présentent des systèmes d'absorption basés sur la liaison aux protéines de captation du fer, notamment à la transferrine (Tf) et à la lactoferrine (Lf) leur permettant une acquisition directe du fer de l'hôte (Figure 37). De plus, certaines bactéries particulièrement gram-

positives utilisent l'hème comme source de fer par le biais de systèmes de séquestration de l'hème (Agoro et Mura 2019 ; Hantke *et al. 2003)* (Figure 37).

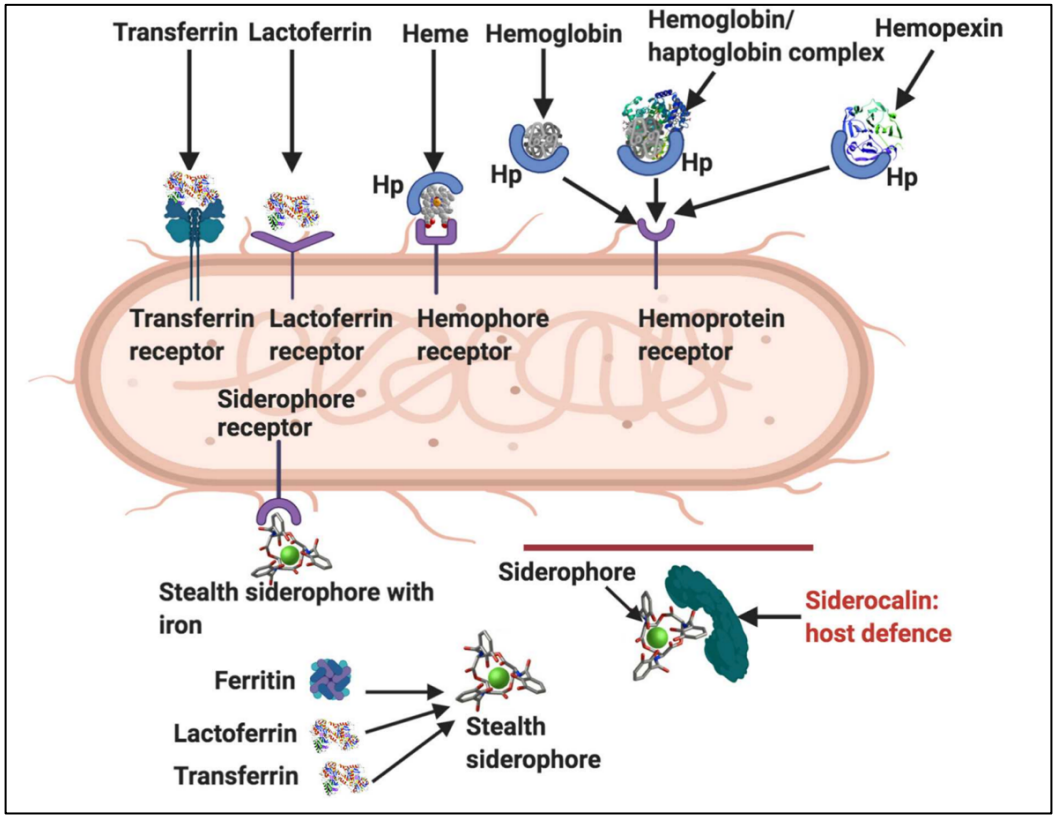


Figure 37. *Méthodes par lesquelles les bactéries acquièrent du fer. Récepteur de la transferrine, récepteur de la lactoferrine, hémophore (Hp), récepteur de l'hémophore et hémopexine. Les sidérophores capte le fer de la lactoferrine, de la ferritine et de la transferrine, ainsi que de l'environnement. Les sidérophores furtifs sont modifiés de manière à empêcher la liaison de la sidérocaline. Une défense bactérienne primaire contre la sidérocaline implique la production de sidérophores furtifs (D'après Kell et al. 2020).*

Certains microbes ont adopté différentes niches préférentielles de résidence intra-cellulaire, comme par exemple les macrophages (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*) ou les globules rouges. De manière générale, la rétention cellulaire du fer et l'hypoferrémie contribuent au contrôle des bactéries extracellulaires. En revanche, ces stratégies sembleraient contre-productives pour les microbes intracellulaires où la régulation à la baisse de l'absorption du fer et son exportation accrue donneraient plus d'avantage pour la défense de l'hôte contre ces agents pathogènes intracellulaires (Figure 39).

2.3. Contrôle immunitaire inné de la disponibilité du fer vis-à-vis des pathogènes intracellulaires

Les pathogènes intracellulaires résident à l'intérieur de la cellule hôte pendant la majeure partie de leur vie. Ils perdent généralement leur toxicité pour se maintenir en permettant à la cellule infectée de survivre. En effet, les pathogènes intracellulaires ont développé diverses stratégies pour persister et permettre cette coexistence au sein de la cellule infectée ; ces stratégies ont en effet un impact direct sur

la réponse immunitaire de l'hôte face à une infection intracellulaire. La stratégie générale pour limiter la disponibilité de fer aux agents pathogènes intracellulaires consisterait à réduire la concentration intracellulaire du Fe^{2+} soit en : a) inhibant l'absorption extracellulaire du Fe^{2+} ; b) favorisant le stockage du Fe^{3+} dans la ferritine ; c) augmentant l'efflux cellulaire du Fe^{2+}.

De nombreuses bactéries intracellulaires, y compris *M. tuberculosis*, *L. pneumophila* et *S. enterica*, se logent dans le phagosome précoce, où l'abondance de la transferrine chargée de fer garantit une haute disponibilité en fer (Silva-Gomes *et al.* 2013).

Les bactéries ont également une grande variété de protéines de liaison au fer pour concurrencer le fer de l'hôte. L'expression de ces gènes impliqués dans l'absorption du fer est contrôlée par des mécanismes conservés impliquant les protéines Fur et DtxR. De plus, ces bactéries, ainsi que *Chlamydia* et *F. tularensis* par exemple, induisent l'expression du transporteur DMT1, qui exporte le fer de l'endosome, pour soutenir leur réplication. Cependant, en retour, l'hôte répond également en produisant des protéines qui se lient aux sidérophores des mycobacteries et des salmonelles comme les lipocalines, limitant ainsi l'utilisation du fer par les microbes. L'induction de l'hepcidine dans de tels contextes infectieux limiterait l'efflux de fer et favoriserait son accumulation intracellulaire, un tel mécanisme serait donc plus bénéfique pour la croissance d'agents pathogènes intracellulaires (Sousa *et al.* 2020).

Plusieurs anciennes données de la littérature suggèrent que le fer soutien la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* dans les macrophages. Cependant, les modèles expérimentaux récents visant à étudier les interactions entre les infections mycobactériennes et le fer restent controversés et ne reflètent pas les observations cliniques.

Une précédente étude réalisée par notre laboratoire sur un modèle murin d'infection mycobactérienne par *M. bovis-GFP* associée à un enrichissement alimentaire modéré en fer montre un meilleur contrôle de l'infection dans le groupe ayant reçu un régime modéré en fer par rapport aux animaux infectées sous le régime standard. En effet, le suivi simultané de la GFP associée à *M. bovis* et du marqueur de cellules myéloïdes CD11b par cytométrie en flux a montré un signal double positif plus faible, reflétant ainsi une présence réduite de bactéries intracellulaires, et ce après 7, 28 et 63 jours d'infection mycobactérienne. De plus, l'analyse de la charge bactérienne dans les poumons, la rate et le foie confirme cette diminution bactérienne dans des conditions de surcharge en fer modérée. Ce modèle a également montré une régulation à la hausse des transcrits de l'hepcidine, de la ferroportine, de l'inhibine-β, de la lipocaline 2 et de la Bmp6 dans le foie. Il a également été démontré que l'infection par *M. bovis BCG* modifie considérablement la composition cellulaire des granulomes dans le foie. Ces derniers montrent une plus grande présence de cellules destructrices $TCD8^+$ après 28 jours d'infection, ce qui pourrait expliquer en partie l'amélioration du phénotype infectieux chez ces animaux soumises au régime modérément enrichi en fer. L'étude de l'axe hepcidine-ferroportine a également montré une régulation à la hausse de l'hepcidine jusqu'au jour 28 post-infection *in vivo*, de même que l'étude *in vitro* sur macrophages dérivés de la moelle osseuse traités par *M bovis BCG* qui a montré cette augmentation à partir de 5 heures de traitement maintenu jusqu'à 24 heures de traitement. En outre, le

transcrit de la ferroportine reste inchangé, ce qui suggère un mécanisme de défense de l'hôte pour moduler l'exportation du fer du milieu intra- au milieu extracellulaire (Agoro *et al.* 2017). Une étude comparant des souris de type sauvage à des souris chargées de fer-dextran par injection *i.p*, ou à des souris déficientes en hepcidine, connues pour avoir une surcharge totale en fer parenchymateux mais une carence en fer dans les macrophages ne montre aucune différence de charge bactérienne de *M. tuberculosis* dans les poumons et la rate des groupes testés (Stefanova *et al.* 2017). De plus, un autre rapport de modèle expérimental de tuberculose (TB) avec carence alimentaire sévère en fer n'a montré aucun effet sur la charge des mycobactéries (Harrington-Kandt *et al.* 2018). Ces dernières observations suggèrent que la teneur en hepcidine et en fer des macrophages ne modifie pas de manière significative les infections à *M. tuberculosis* (Stefanova *et al.* 2017). Cependant, les deux études se sont concentrées sur l'évaluation des médiateurs du fer sans évaluer la réponse immunitaire et les marqueurs inflammatoires impliqués.

Les salmonelles prolifèrent dans les phagolysosomes des macrophages (Nairz *et al.* 2018). Une étude comparant l'infection *S. Typhimurium* chez des souris Hfe déficientes a montré un meilleur contrôle de la réplication bactérienne, ce qui a été attribué à une diminution de la teneur en fer de la rate, et donc à une disponibilité réduite du fer pour *S. Typhimurium* avec aussi une production accrue de lipocaline 2 dans les macrophages (Nairz *et al.* 2017).

Les parasites du paludisme envahissent les globules rouges (GR), provoquent l'hémolyse des érythrocytes et la suppression de l'érythropoïèse, causant de lourdes perturbations du métabolisme du fer et conduisant le plus souvent à une anémie. De plus, les thérapies de supplémentation en fer aggravent inexplicablement les infections paludéennes, à l'inverse, les carences en fer peuvent être protectrice dans certains cas (Moya-Alvarez *et al.* 2016).
Une explication relative à l'activité de la ferroportine dans ces interactions paludisme-cellule hôte a récemment été proposée. Les auteurs ont montré que la charge parasitaire était plus élevée chez les souris dépourvues de ferroportine fonctionnelle dans les cellules érythroïdes par rapport aux témoins exprimant la ferroportine fonctionnelle. L'étude a également révélé que dans le cadre d'un régime enrichi en fer connu pour induire l'hepcidine, la ferroportine était réduite et donc le fer restait séquestré dans les globules rouges ; ce qui est plus bénéfique pour le parasite qui utilise le fer comme source nutritionnelle. En outre, l'étude a révélé que certaines populations endémiques du paludisme présentaient une mutation Q248H de la ferroportine qui confère une résistance à la liaison de l'hepcidine, ces observations suggèrent que la mutation Q248H offre une protection contre le paludisme (Zhang *et al.* 2018).

Malgré le manque de preuves cliniques directes du lien entre la leishmaniose et le statut en fer, on pourrait s'attendre à ce que le fer favorise la croissance de la leishmanie, de la même manière que ce

que l'on trouve pour d'autres pathogènes (Weinberg 2009). Le fait que ces parasites soient équipés de divers mécanismes d'acquisition du fer et soient capables d'utiliser diverses sources de fer a suggéré que l'acquisition du fer est essentielle à la pathogénicité et que la privation de fer pourrait être une stratégie efficace pour contrôler les infections leishmaniennes (Niu *et al.* 2016 ; Taylor et Kelly 2010). Cette hypothèse est étayée par la découverte que les chélateurs du fer desferrioxamine (DFO) et hydroxypyridin-4-ones inhibent modérément la multiplication des promastigotes de *L. major* et *L. infantum in vitro* dans les milieux de culture (Soteriadou *et al.* 1995). Cependant, des études *in vivo* ont montré que le traitement des souris avec la deferoxamine (DFO) n'affecte pas le développement des lésions cutanées causées par *L. major* (Bisti *et al.* 2000), mais réduit la croissance hépatique et splénique de *L. infantum* (Malafaia *et al.* 2011). Les données obtenues concernant l'impact de la supplémentation en fer dans les modèles de leishmaniose ne sont pas non plus consensuelles mais tendent à montrer un effet protecteur du fer. L'effet anti-leishmanial du fer est attribué à ses interactions synergiques avec les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites par les phagocytes hôtes professionnels (Bisti *et al.* 2006 ; Vale-Costa *et al.* 2013), en plus de la réponse immunitaire de type Th1 (Bisti *et al.* 2000). En particulier, il a été rapporté que les souris surchargées de fer sont également résistantes à la réinfection par *L. major* (Bisti et Soteriadou 2006). Le sursaut oxydatif induit par le fer suscité dans les infections primaires et secondaires à *L. major* est lié à l'activation du facteur de transcription NF-κB et à une prolifération accrue des cellules T $CD4^+$ sécrétrices d'IFNγ dans les ganglions lymphatiques (Bisti et Soteriadou 2006).

Les virus ont besoin de cellules vivantes pour se répliquer et prospérer. En effet, les virus annexent la capacité des cellules à synthétiser des macromolécules en reprogrammant la machinerie des cellules infectées pour leur propre bénéfice. Étant donné que de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN et de l'ATP nécessitent du fer, il est concevable que la privation de fer puisse perturber ces processus de réplication cruciaux pour la survie virale. Des études *in vitro* suggèrent que la chélation du fer peut inhiber la croissance de certains virus comme celui de l'hépatite B (VHB), du cytomégalovirus humain (HCMV), du virus de l'herpès simplex 1, virus de la vaccine et le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) (Drakesmith et Prentice 2008).

La maladie COVID-19 ou coronavirus, causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2), a été déclaré comme pandémie mondial le 11 mars 2020. Ces infections sévères au COVID-19 sont caractérisées par un état hyper-inflammatoire associé à des concentrations accrues de marqueurs de l'inflammation tels que la protéine C-réactive (CRP), l'interleukine-6 (IL-6) mais aussi à des niveaux élevés de ferritine (Shah *et al.* 2020), et un niveau inférieur de saturation de la transferrine. Les observations chez les patients, après ajustement en fonction du sexe, de l'âge et des comorbidités, montrent que les changements des paramètres du fer accompagnées d'une anémie inflammatoire comme étant liées à un diagnostic sévère de la maladie et au développement du syndrome de détresse respiratoire

aiguë (SDRA). En ce sens, plusieurs rapports ont émergé au cours des deux dernières années pour tenter de démêler les interactions et le lien entre le statut en fer et l'infection par le SRAS-CoV-2, et les études sont toujours en cours pour étudier les effets probables de l'altération de l'homéostasie du fer sur la pathogenèse et la gravité des infections au SRAS-CoV-2, ainsi que le potentiel d'interventions thérapeutiques en modulant la disponibilité du fer (Shah *et al.* 2020 ; Lv *et al.* 2020 ; James *et al.* 2020 ; Bellmann-Weiler *et al.* 2020 ; Lawaczeck 2020).

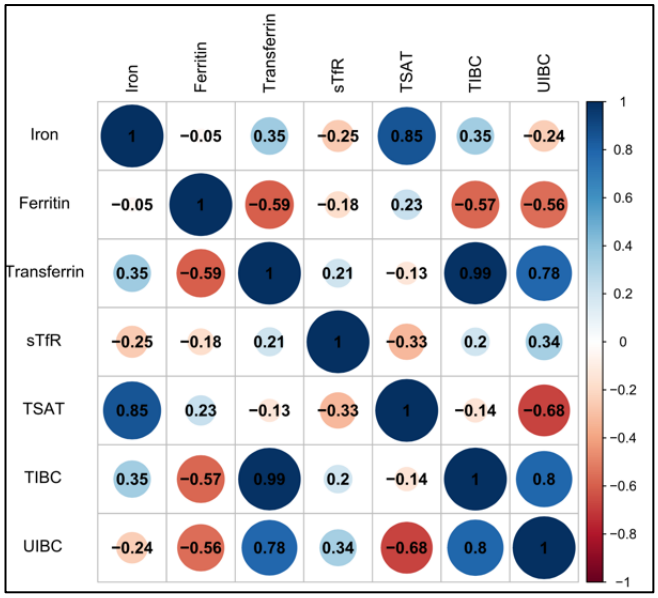


Figure 38. *Corrélation entre les indices du métabolisme du fer chez les patients COVID-19. Abréviations : récepteur de transferrine soluble sTfR, TIBC : capacité totale de liaison du fer, TSAT : Saturation de la transferrine, UIBC : Capacité de liaison du fer insaturé (Adapté de Lv et al. 2020).*

2.4. Contrôle immunitaire inné de la disponibilité du fer vis-à-vis des pathogènes extracellulaires

Les bactéries responsables des infections extracellulaires sont de puissants agents pathogènes car elles peuvent se développer rapidement et survivre en évitant l'engloutissement par des cellules phagocytaires professionnelles telles que les neutrophiles et les macrophages. Ceci est en partie possible grâce à leurs surfaces qui minimisent les effets opsoniques et lytiques des anticorps, du complément et d'autres opsonines. Bien que les bactéries extracellulaires aient la capacité de rentrer et de passer à travers les cellules pour passer d'un environnement *in vivo* à un autre, elles sont rapidement tuées une fois capturées par les phagocytes. En conséquence, la défense de l'hôte contre les bactéries extracellulaires dépend de manière critique de l'immunité humorale, de l'activité du complément et de la production d'anticorps spécifiques. Pour les pathogènes extracellulaires, la stratégie générale est de retenir le fer dans les compartiments intracellulaires, cela prive les bactéries de fer et aide donc à résister

à ce type d'infection d'une part, mais d'autre part cela conduit à une hypoferrémie chez l'hôte (Figure 39).

Les patients présentant des surcharges en fer notamment d'origine hémochromatosique sont connue pour être plus susceptibles à certains types d'infections bactériennes. Chez la souris, l'infection par *Vibrio vulnifivus* (Arezes et al. 2015 ; Starks et al. 2000), *Yersinia enterocolitica* (Stefanova *et al.* 2017), *Yersinia pseudotuberculosis* (Miller *et al.* 2016), *Yersinia pestis* (Quenee *et al.* 2012), *Escherichia coli* (Stefanova *et al.* 2018) montre une plus grande sensibilité lors d'une surcharge en fer, qu'elle soit génétique dans les modèles *Hamp, Hfe ou Hjv* déficients par rapport aux types sauvages ou apportée par des voies d'injection externes de fer. L'hypoferrémie induite par l'hepcidine est considéré comme la principale ligne de défense antibactérienne contre les agents pathogènes extracellulaire.

Les parasites extracellulaires sont un groupe très diversifié d'agents pathogènes qui comprennent les nématodes (vers ronds) et les plathelminthes (vers plats trématodes et cestodes) ainsi que certains protozoaires extracellulaires tels que *Giardia spp*. et les trypanosomes africains. Contrairement aux bactéries, virus et protozoaires qui se répliquent dans leurs hôtes, la plupart des parasites helminthes nécessitent un hôte intermédiaire ou une période en dehors de l'hôte mammifère pour se répliquer et compléter leur cycle de vie. Les parasites extracellulaires présentent une variabilité de taille, de tropisme tissulaire et de mécanisme d'échappement tissulaire ; les helminthes, en particulier, vivent souvent dans leur hôte définitif pendant plusieurs années, se cachant dans l'intestin, le sang, les tissus lymphatiques ou d'autres organes. Un ensemble de mécanismes effecteurs d'immunité innés et adaptatifs spécialisés sont déclenchés pendant l'infection, incluant intervention d'éosinophiles, de basophiles, de mastocytes, de macrophages, d'anticorps, d'ILC, et de lymphocytes T. La résistance est obtenue grâce à une variété de mécanismes qui incluent la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, la sécrétion du mucus, les altérations de la physiologie intestinale et l'exposition à des médiateurs toxiques produits par les cellules épithéliales, les éosinophiles et les macrophages de type M2. La plupart des parasites helminthes extracellulaires induisent des réponses cellulaires polarisées de type CD4-Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13) qui favorisent les réponses cellulaires muqueuses et anticorps dépendants. Il existe peu de données dans la littérature établissant un lien entre la réponse immune anti helminthique et le métabolisme du fer.

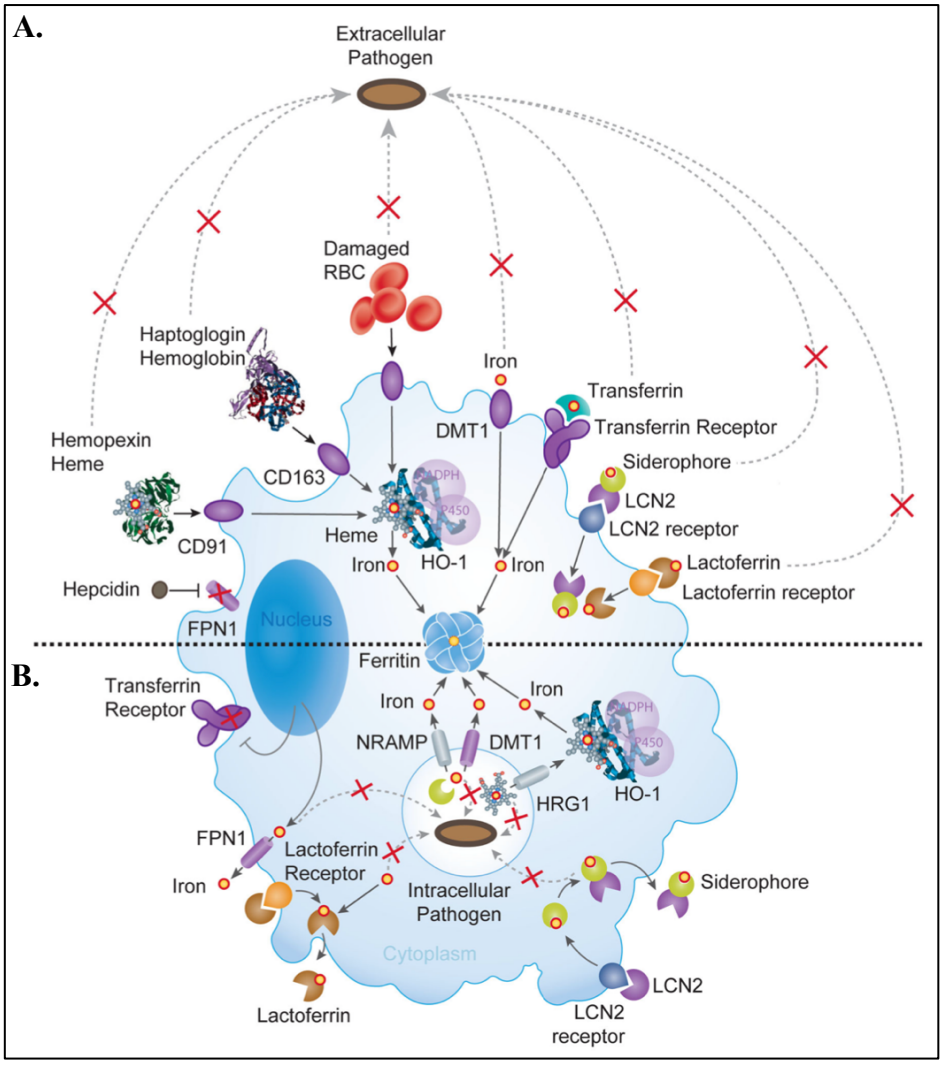


Figure 39. *Stratégies basées sur la modulation du métabolisme du fer comme mécanismes de résistance aux infections. (A) Les infections par des agents pathogènes extracellulaires sont associées à l'induction de l'importation et de la rétention de fer cellulaire dans les macrophages grâce à la reconnaissance et à l'internalisation des protéines plasmatiques de liaison au fer par des récepteurs macrophages spécifiques. (B) Les infections par des agents pathogènes intracellulaires sont associées à une teneur réduite en hème et en fer intracellulaire dans les macrophages. Cette stratégie de défense repose sur des mécanismes qui suppriment l'importation de l'hème et du fer vers les macrophages et favorisent l'exportation de l'hème-fer, d'abord à partir des phagolysosomes puis du cytoplasme des macrophages (D'après Soares et Iqbal 2016).*

OBJECTIFS

Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement, et les mots pour le dire arrivent aisément. Nicolas Boileau-Despréaux

Objectifs

Ce projet de thèse avait comme premier objectif de documenter les liens entre métabolisme du fer dans les macrophages, principal site de trafic de fer, et homéostasie systémique du fer. Cet axe de recherche a été conduit à partir d'un modèle murin porteur d'une invalidation conditionnelle pour l'autophagie dans la lignée des macrophages, développé au laboratoire, modèle *Atg5 Lys-M Cre*. Ce modèle de souris permet de réaliser des analyses tissulaires afin de révéler des troubles du métabolisme du fer au niveau systémique. Pour cela la distribution du fer et l'expression des principaux médiateurs de l'homéostasie du fer dans les différents tissus d'intérêt ont été analysées. De plus, l'utilisation des macrophages dérivés de ces souris permet l'étude *in vitro* en condition d'apport de fer naturel par érythrophagocytose et d'identifier les altérations du métabolisme du fer dans ces cellules. Ainsi, l'entrée, le stockage et la distribution intracellulaire du fer et l'expression des différents intervenants du métabolisme du fer ont été étudiés au cours du processus d'érythrophagocytose. Ces deux approches, *in vivo* et *in vitro*, apportent des informations complémentaires et indicatives sur la régulation du couple hepcidine - ferroportine et le rôle des macrophages dans l'homéostasie du fer.

Le second objectif était de déterminer les interactions entre le métabolisme du fer de l'hôte et la réponse immunitaire innée. D'une part, le rôle du fer sur les marqueurs inflammatoires et l'immunomodulation phénotypique des macrophages en réponse au fer et à l'inflammation ont été étudiés. D'autre part, le modèle d'étude d'infection parasitaire par ankylostome chez la souris soumise à des régimes standard, faible, modérément ou fortement enrichis en fer a été analysé. Les paramètres liés au métabolisme du fer et ceux liés à la réponse immune parasitaire ont été étudiés. Les nouvelles informations apportées par ces études devraient améliorer les connaissances sur les interactions hôte/pathogènes et pourraient être mises à profit dans le cadre des infections parasitaires, problème de santé public majeur.

RÉSULTATS

Ce n'est pas une vérité tout à fait immédiate que deux et deux sont quatre, supposé que quatre signifie trois et un. Leibniz

I. Étude du rôle de l'autophagie dans le métabolisme du fer dans les macrophages

Les niveaux de fer sont régulés grâce à l'action cordonnée d'une myriade de protéines, transporteurs membranaires, cytosoliques ou plasmatiques, ainsi que des exportateurs, canaux, enzymes, hormones, cytokines. etc. qui agit en synergie et à différents niveaux pour réguler le flux de circulation du fer en fonction des besoins, et de la demande de la cellule et de l'organisme dans son ensemble. En effet, l'homéostasie du fer dépend à la fois d'un mécanisme intracellulaire de sensing du fer *via* le système IRP/IRE, et d'une régulation à l'échelle systémique *via* l'axe d'action hepcidine - ferroportine. Le défaut de types hémochromatose (hepcidine, hémojuveline, HFE, TfR2 et BMP), ainsi que le mutant ferroportine insensible à l'hepcidine, conduisent à une expression incontrôlée et permanente de la ferroportine au niveau des membranes plasmiques, entraînant de faibles niveaux de fer dans les macrophages et les entérocytes, avec une augmentation des indices de fer sérique et une surcharge en fer généralisée. Par ailleurs, une série de défauts génétiques de protéines du métabolisme du fer, comprenant DMT1$^{-/-}$, STEAP3$^{-/-}$, NCO4$^{-/-}$, IRP2$^{-/-}$, l'acéruloplasminémie, ainsi que l'hypo-transferrinémie et la maladie de la ferroportine dominante sont caractérisés par une diminution de la mobilisation du fer qui compromet l'hématopoïèse, tout en conduisant à une surcharge tissulaire martiale par absorption compensatoire du fer par les entérocytes. Ces phénotypes bien qu'ils induisent une augmentation d'hepcidine hépatique, compatible avec les réserves de fer élevées ne parviennent pas à limiter l'exportation de fer médiée par la ferroportine à partir des macrophages et des entérocytes, ce qui suggère l'implication d'un mécanisme supplémentaire indépendant de la signalisation hépatique de l'hepcidine.

Les monocytes/macrophages jouent un rôle central dans le métabolisme du fer. En effet, ces cellules, siège de l'érythrophagocytose sont sensibles aux niveaux de fer intracellulaire et systémique, et représentent donc la principale source d'approvisionnement en fer nécessaire à l'organisme pour la synthèse *de novo* de l'hémoglobine. De plus, les macrophages nourriciers résidants de la moelle osseuse forment des îlots érythroblastiques qui soutiennent l'érythropoïèse et participent aussi à la digestion du noyau des érythroblastes lors de la maturation du globule rouge. Ainsi le trafic du fer des macrophages pourrait jouer un rôle spécifique dans les processus d'homéostasie cellulaire et/ou systémique du fer.

L'autophagie, processus essentiel au maintien de l'équilibre cellulaire, notamment *via* le recyclage des organites par voies lysosomales affecte divers aspects cellulaires et sa dérégulation a été associée à plusieurs maladies de troubles métaboliques. Un nombre croissant de rapports suggèrent une relation entre l'autophagie et le métabolisme du fer. Ainsi, le mécanisme sélectif de la ferritinophagie a

été mis en évidence. Cependant, l'autophagie joue de multiples rôles et son implication dans l'homéostasie systémique du fer reste à caractériser davantage.

L'objet de cette étude vise à étudier le rôle de l'autophagie dans les macrophages et son lien avec le métabolisme du fer. Pour cela le modèle d'invalidation conditionnelle *Atg5 LysM Cre* chez la souris avec une délétion spécifique du gène *Atg5* dans la lignée myéloïde a été développé.

Au niveau cellulaire nos résultats montrent que la déficience en autophagie empêche la dégradation de la ferroportine apportée lors de l'érythrophagocytose. De plus, les données évoquent un défaut de formation d'hémosidérine, structure nécessitant une double membrane, et suggèrent que le fer présent dans la ferritine, forme de fer facilement mobilisable, ne pouvant pas se complexer en hémosidérine est facilement mobilisé. Nos résultats montrent aussi que le déficit de l'autophagie dans la lignée myéloïde conduit à un phénotype de surcharge en fer, attribué à une forte expression de la ferroportine au niveau des membranes plasmique des macrophages et des entérocytes et accompagnée d'une faible expression d'hepcidine dans les macrophages. Ainsi, ces résultats mettent en évidence le rôle de la macroautophagie des macrophages comme nouveau mécanisme de sensing de l'homéostasie systémique du fer

Targeted autophagy disruption reveals the central role of macrophage iron metabolism in systemic iron homeostasis

Meriem Taleb [1,2] Isabelle Maillet[1], Marc Le Bert[1], and Catherine Mura[*,1,2]

[1]Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, Orléans, France; [2]University of Orléans, Orléans, France

Short title: Macrophages and systemic iron homeostasis

Key points

● Autophagy deficiency in macrophages results in systemic parenchymal iron overload

● Erythropoietic macrophages with autophagy deficiency accumulate the iron exporter ferrorportin and have low hepcidin expression.

Corresponding author:
Catherine Mura
UMR7355, 3B rue de la Ferollerie
45071 Orléans, France
email : catherine.mura@cnrs-orleans.fr
phone: +33 238 25 79 75
fax: +33 238 25 79 79

Abstract word counts: 235

Text word counts: 3999

Figure/table count: 5 figures, 1 table

Reference count: 68

ABSTRACT

Iron homeostasis depends on both intracellular control through iron-responsive proteins and systemic downregulation of the cellular iron exporter ferroportin through the hormone hepcidin to control iron recycling from macrophages and iron uptake from enterocytes. Here, we focused on the role of macrophage iron metabolism in systemic iron homeostasis. Conditional *Atg5* knockout for autophagy deficiency in macrophages (*LysM-Atg5*$^{-/-}$) in mice mimicked a primary iron overload phenotype, resulting in high ferroportin expression in both macrophages and enterocytes that correlated with marked parenchymal iron overload, highlighting the critical role of macrophages in iron sensing and systemic iron homeostasis. Furthermore, *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice exhibited extramedullary hematopoiesis without signs of anemia or blood iron deficiency. The relatively high hepatic hepcidin expression could not account for the elevated ferroportin membrane expression in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice, although the splenic hepcidin level was markedly decreased, correlating with low hemosiderin iron storage. Compared to the corresponding cells from wild-type mice, bone marrow-derived macrophages from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice had significantly increased ferroportin expression and a decreased labile iron content, consistent with high iron export. In erythrophagocytic macrophages, autophagy regulates the degradation of ferroportin and subsequently its plasma membrane localization and iron export. Autophagy likely also regulates hemosiderin storage mechanisms. Furthermore, erythrophagocytic macrophages produce lower levels of hepcidin than wild-type cells. Therefore, unrestricted iron export resulting in low labile iron and low hepcidin expression in autophagy-deficient macrophages likely has an autocrine-paracrine effect to regulate ferroportin expression in duodenal enterocytes.

KEY WORDS

Autophagy • Macrophages • Ferroportin • Iron homeostasis.

INTRODUCTION

In mammals, iron metabolism is achieved through a complex network of specialized proteins responsible for iron uptake, transport and storage. Most body iron (~75%) is mobilized in the form of heme in erythrocytes,[1] and it is recycled by macrophages after phagocytosis of senescent or damaged red blood cells.[2] Under normal conditions, splenic and reticuloendothelial macrophages constitute the major iron storage compartment and act as nursing cells to support erythropoiesis, but when iron is present in excess, hepatocytes preferentially accumulate iron.[1-4] Dietary iron uptake through duodenal enterocytes plays an essential role building the postnatal iron stock and satisfying iron demand. The ferroportin (FPN) iron exporter is mainly found in macrophages and duodenal enterocytes and releases ferrous iron into the blood.[5,6] There, after oxidation of ferrous iron via ceruloplasmin (CP) and hephaestin (HEPH), transferrin traffics ferric iron, which is subsequently acquired by cells through TfR1-mediated endocytosis.[7,8]

It is generally accepted that the hepatic peptide hormone hepcidin (HAMP1) is the key regulator of systemic iron trafficking through negative control of ferroportin by inducing its degradation.[9-11] Hepcidin, which is also expressed at low levels in macrophages and in other cells (heart, brain, kidney cells, *etc*), may exert local tissue-specific functions. Hepcidin transcription is upregulated in response to elevated transferrin saturation, iron stores, and inflammation and is suppressed by hypoxia and erythropoiesis.[12-16] Ferroportin is also transcriptionally regulated independent of hepcidin in response to iron, erythrophagocytosis, hypoxia and inflammation.[17-22]

After TfR1-mediated endocytosis, iron is released from transferrin with the help of the STEAP3 metalloreductase and DMT1 metal transporter.[23-26] In cells, only small amounts of cytosolic reactive ferrous labile iron are readily available for immediate use or export. Alternatively, iron is stored in a nontoxic and bioavailable ferric form in ferritin heteropolymer (H and L subunits) shells,[27] and high cellular iron levels in erythrophagocytic macrophages and hepatocytes promote the accumulation of hemosiderin, a lysosomal degradation complex localized within endomembrane structures (siderosomes).[3] The release of iron from ferritin primarily relies on ferritinophagy, a selective autophagic process, in which a specifc cargo molecule (nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) delivers ferritin to lysosomes.[28,29] In the cytosol, ferrous ions are trafficked by binding to iron chaperones of the nuclear ribonucleoprotein family, the poly r(C) binding proteins (PCBPs).[30-34] The intracellular iron balance is maintained by the

coordinated posttranscriptional regulation of a series of key proteins through cytoplasmic sensors of labile iron, namely the iron regulatory proteins IRP1 and IRP2, which notably inversely regulate TfR1—*i.e.,* iron absorption— and ferritin— *i.e.,* iron storage.[35]

Defects in the hepcidin gene itself or in genes encoding positive regulators of hepcidin (hemojuvelin, HFE, TfR2, and BMPs),[9,11,36] as well as a ferroportin mutant unresponsive to hepcidin,[37] lead to unrestricted expression of ferroportin, resulting in low iron levels in macrophages and enterocytes, increased serum iron indices and systemic parenchymal iron overload. A series of gene defects that include DMT1$^{-/-}$, STEAP3$^{-/-}$, NCO4$^{-/-}$, IRP2$^{-/-}$, and the mutations causing aceruloplasminemia, hypo-transferrinemia and dominant ferroportin disease are characterized by decreased iron mobilization that compromises hematopoiesis but leads to tissue iron overload via compensatory enterocyte iron uptake.[38-48] Under these conditions, the increased liver hepcidin level consistent with elevated iron stores observed in these mouse models fails to limit ferroportin-mediated iron export from macrophages and enterocytes, suggesting the involvement of an additional mechanism independent of liver hepcidin signaling. We hypothesized that macrophage iron trafficking may play a specific role in this process. Here, we showed that mice with targeted autophagy-related 5 gene deletion in monocyte/granulocyte progenitors (*LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice) had dysregulated iron trafficking, ferroportin mislocalization and low hepcidin expression in macrophages. *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice also had high iron export from enterocytes associated with a systemic iron overload phenotype and elevated liver hepcidin levels. We demonstrated that autophagy in macrophage orchestrates iron distribution and plays a critical role in intracellular ferroportin turnover and hepcidin regulation, which exerts an autocrine-paracrine effect to control ferroportin expression in enterocytes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

LysM-Atg5$^{-/-}$ mice were generated by crossing the *Atg5* (autophagy gene 5) floxed (*Atg5*$^{fl/fl}$) mice[49] with *lysozyme M cre* (*LysM cre*) transgenic strain.[50] Details about animal breeding, care and management are provided in the supplemental Methods, and genotyping primers are listed in supplemental Table 1.

Hematology, serum and iron parameters

Hematological parameters, serum and iron parameters, nonheme tissue iron content were analyzed as described previously[51,52] and detailed in the supplemental Methods.

Histology, immunofluorescence, and protein analysis

Histochemistry, immunofluorescence, preparation of cytosolic lysates and total protein extracts, and western blotting were performed according to conventional procedures; more details are described in the supplemental Methods, and antibodies are listed in supplemental Table 2.

Flow cytometric analysis

Single-cell suspensions of femoral bone marrow cells and blood cells were obtained as described previously[51] and detailed in the supplemental Methods. Cell immunostaining and flow cytometric analysis were carried out in accordance with standard procedures (supplemental Methods), and erythroid precursors staining was as previously described.[53] For the calcein assay, cells were collected in PBS and incubated for 15 min with 0.2 µM calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM, Sigma Chemicals) probe. Calcein fluorescence was detected in the FITC channel.

RNA extraction and quantitative PCR analysis

RNA extraction, reverse-transcription and qPCR were performed with conventional methods as described in the supplemental Methods; primer sequences are listed in supplemental Table 1. Steady-state gene transcript levels in organs and fold change values were calculated with the -Δct and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methods ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\ treated} - \Delta C_{t\ control}$), respectively.

Bone marrow-derived macrophages and treatments

Bone marrow-derived macrophage (BMDM) preparation and treatments are described in the supplemental Methods. Opsonized red blood cells were prepared as described in Kovtunovych *et al*.[54]

Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for statistical analyses. An unpaired Mann-Whitney test was used for comparisons between two independent groups. Correlations were evaluated using Spearman correlation analysis. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test for pairwise comparisons was used for comparisons among more than two groups.

RESULTS

Autophagy deficiency (*Atg5*$^{-/-}$) in myeloid cells results in high erythropoietic activity and mild liver fibrosis

We sought to detremine the role of autophagy in iron metabolism—and more specifically, in macrophages—by using conditional knockout mice deficient for *Atg5* in myeloid granulocyte/macrophage lineage cells *(LysM-Atg5*$^{-/-}$). The genotype of our newly generated floxed mice was confirmed by PCR (supplemental Figure 1A). The birth of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice at the expected Mendelian ratio indicated that Atg5 in macrophages was not essential for mouse embryonic development. Although *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice maintained on a standard diet developed normally to adulthood without overt abnormalities (until 12 months) and were fertile, they had a reduced body weight compared with that of age- and sex-matched littermate wild-type (WT) controls (-5.59 g ±1.58 for both male and female mice, supplemental Figure 1B). *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice had normal counts of peripheral myeloid blood cells, including monocyte, granulocyte neutrophil and eosinophil subsets (supplemental Figure 1C).

The livers of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice weighed less at 6-8 months than those of WT mice and showed a noticeably lighter color (Figure 1A-B). H&E staining and F4/80^{+} immunofluorescence analysis revealed normal liver histology with a similar distribution of Kupffer cells in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice (Figure 1B). Furthermore, low-grade liver fibrosis was visible by Sirius red collagen staining in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice (Figure 1B). Oil red O staining revealed, in some cases, the presence of widely distributed lipid droplets, characteristic of mild steatosis, in the hepatic parenchyma of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice compared to WT mice (supplemental Figure 2A). No overt signs of liver injury were detected in terms of the serum transaminases AST (Figure 1C) and ALT (not shown) as markers for hepatocellular damage or inflammation as assessed by inflammatory cell infiltration (Figure 1A, H&E), TNFα and IL-6 cytokine expression and myeloperoxidase levels (supplemental Figure 2B).

The spleens of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice were darker and larger than those of WT mice (Figure 2A). Immunofluorescence staining and FACS analysis of spleen cell subpopulations indicated similar distributions of red pulp macrophages (F4/80^{+}) and marginal zone spleen macrophages (F4/80^{-} CD11b^{+}) in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice (Figure 2B, supplemental Figure 3A). Further histological examination by H&E staining revealed that the red pulp reservoir of erythrophagocytic macrophages in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice appeared lighter and contained significantly less visible hemosiderin pigment than that in WT mice (Figure 2Ci). Moreover, increased numbers of erythroblastic islands, where erythroid precursors develop, and red blood

cells, as evidenced by the increased cellularity in the subcapsular red pulp, were clearly identified in the spleen of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice. Flow cytometric analysis of the erythroid populations confirmed extramedullary erythropoietic activity with a marked increase in splenic CD71^{+} Ter-119^{+} immature erythroid precursors in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice (Figure 2Ci, supplemental Figure 3B).

Compared with that of WT mice, the bone marrow of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice also revealed high erythropoietic activity with an increased cell density in histological H&E staining and an increased early erythroid precursor population by flow cytometric analysis (Figure 2Cii). The peripheral red blood cell indices, blood smears and flow cytometric analysis results documented the absence of red blood cell abnormalities in terms of number, shape and size in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice but increases in hemoglobin and immature red blood cells in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice compared to those in WT controls, which usually results from premature cell release from tissues accompanying high erythropoietic activity (Figure 2Ciii, Table 1). *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice had similar levels of circulating Epo (Table 1). A higher level of serum iron and a moderately higher transferrin saturation (TS) were observed in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice than in WT mice, whereas the total iron binding capacity (TIBC) and serum ferritin (SF) level were similar in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice (Table 1). Thus, Atg5 deficiency in myeloid cells tended to increase iron release into blood and its utilization for erythropoiesis without signs of anemia.

Increased ferroportin plasma membrane expression in macrophages and enterocytes of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice with systemic iron overload

A large amount of Perl's stainable nonheme iron naturally present in macrophages was observed in the spleens of WT mice, whereas *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice had a severely reduced amount of Perl's stainable nonheme ferric iron in macrophages of the splenic red pulp (Figure 3A). However, the total splenic iron content was rather similar in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice and WT mice (Figure 3Bi), whereas the splenic ferric ferritin content, as evaluated by native protein extraction followed by Perl's/DAB staining, was significantly higher in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice than in WT mice, although ferritin expression was rather similar (Figure 3Biv). The cytosolic pool of chelatable iron, *i.e.,* the labile iron pool (LIP) was assessed using the fluorogenic probe calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) and flow cytometry to identify specific myeloid cell subpopulations. Splenic macrophages (F4/80^{+}CD11b^{-}) and monocytes (F4/80^{-} CD11b^{+}) (Figure 3C), as well as bone marrow myeloid CD11b^{+}Ly6C/G^{+} (supplemental Figure 4Ai) cell subsets, in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice showed quenching of fluorescence, indicating higher intracellular labile iron levels than those in the WT littermates. Immunofluorescence analysis revealed a marked

increase in the ferroportin signal in splenic macrophages from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice, and accumulation at the plasma membrane was observed in isolated splenic macrophages (Figure 3D) and nucleated bone marrow cells (supplemental Figure 4Aii) of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice. In contrast, splenic macrophages of WT mice showed a predominantly ponctuated intracellular localization of ferroportin and little plasma membrane staining (Figure 3D). Therefore, these results indicated high iron mobilization from macrophages in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice, consistent with extramedullary erythropoiesis.

Since the duodenum and liver are critical for iron homeostasis, we analyzed these tissues in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice. The duodenum of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice was longer than that of WT mice (37 cm versus 35 cm for male mice, p-value= 0.0012). Unexpectedly, *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice showed marked duodenal iron absorption evidenced by a drastic deficiency of nonheme iron deposition in enterocytes of the superior part of the duodenum (Figure 3A). Furthermore, in parts of the duodenum where food was still in transit, nonheme iron was stained in the apical and basal compartments of enterocytes from *LysM-Atg5*$^{-/-}$mice, while enterocytes from WT mice showed iron mostly within the apical compartment (Figure 3A). The iron depletion in the duodena in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice correlated with low duodenal level of ferric iron-loaded ferritin and ferritin H (Ft-H) expression (Figure 3Bv). Western blot and immunofluorescence analyses revealed higher ferroportin protein expression levels in the duodena of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice than in the duodena of WT animals; ferroportin accumulated along the basolateral plasma membrane of enterocytes and along the intestinal villi of the proximal duodenum in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice (Figure 3Bii, D) but was barely detectable at the plasma membrane (Figure 3D).

In the livers of WT mice, the level of nonheme Perl's/DAB staining was high in Kupffer cells, *i.e.,* resident hepatic sinusoidal macrophages, and limited in the hepatocytes of the portal area of the liver lobules (Figure 3A). In contrast, *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice had markedly increased nonheme stainable iron deposition in hepatocytes, with a gradient extending from the portal area to the centrilobular area along the blood flow, but sparse staining in Kupffer cells (Figure 3A, supplemental Figure 4Bii). The nonheme iron level in the liver correlated with the ferric ferritin iron content and ferritin H expression levels and the elevated total tissue iron content, as measured by a ferrozine assay, in the liver (Figure 3Biii, vi). In both *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mouse livers, ferroportin was scarcely detected in hepatocytes and was not detected in Kupffer cells, *i.e.*, hepatic macrophages (supplemental Figure 4Bii). A full investigation of the iron distribution in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice showed a systemic parenchymal iron accumulation within acinar cells of the exocrine pancreas, convoluted tubules in the renal medulla, cardiac muscle

cells and testicular arteriolar cells, with significantly increased iron content in the kidney and pancreas (supplemental Figure 4C, D). Thus, Atg5-mediated autophagy deficiency in myeloid cells results in redistribution of iron stores with increased ferric ferritin, plasma membrane ferroportin expression in macrophages and enterocytes and elevated iron deposition in parenchymal tissues, indicating high iron uptake, in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice compared to WT mice.

Dysregulation of iron homeostasis in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice is consistent with low hepcidin expression in macrophages

Accumulation of ferroportin on the cell surface membrane of macrophages and the basolateral membrane of enterocytes in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice might depend on the expression of hepcidin, the major known component of the pathway controlling the iron exporter ferroportin. Indeed, we showed that the hepatic mRNA level of *Hamp1*, encoding hepcidin, was increased in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice, although the ratio of the hepcidin mRNA level to the hepatic iron content was low (Figure 4Ai, ii). The expression levels of *Id1* and *Fga*, two well-established markers of activation of Smad and Stat, which control the major signaling pathways positively regulating hepcidin expression, showed that *Id1* mRNA expression was increased in the livers of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice compared to WT mice (Figure 4Ai) and correlated with *Hamp1* expression (Figure 4Aiii), while *Fga* expression was unaffected (Figure 4Ai). Therefore, hepatic hepcidin expression was increased by hepatic iron overload and could not explain the unrestricted ferroportin membrane localization in macrophages and enterocytes in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice.

We hypothesized that the marked dysregulation of iron metabolism and ferroportin expression *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mouse enterocytes might result from macrophage hepcidin signaling. Indeed, the *Hamp1* and *Id1* mRNA expression levels were significantly lower in the spleens of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice than those in WT mice (Figure 4B). Therefore, the low level of hepcidin produced by splenocytes correlated with the high plasma membrane ferroportin level in macrophages and enterocytes.

Atg5 deficiency in macrophages resulted in mislocalization of ferroportin and high iron efflux

We next focused on the role of autophagy in macrophage iron uptake, distribution and sensing. After differentiation, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were treated with ferric ammonium citrate (FAC), holo-transferrin (holo-TF), or opsonized red blood cells (oRBCs). We verified that *Atg5*$^{-/-}$ and wild-type BMDMs incubated under all conditions had similar

viability, as determined by Hoechst 33342 DNA labelling; membrane integrity, as assayed by lactate dehydrogenase (LDH) release; and cellular activity, as determined by glucose uptake and MTT assays for mitochondrial dehydrogenase activity (supplemental Figure 5A).

Compared with WT BMDMs, untreated *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs had higher ferroportin levels (Figure 5Ai), which correlated with their higher basal calcein fluorescence, *i.e.,* a decrease in the cellular labile iron pool; higher ROS levels; and higher membrane TfR1 levels, indicating lower iron-sensing activity (Figure 5B, supplemental Figure 5B). *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs lack Atg5 expression, and p62/sequestosome 1 (SQSTM) accumulation is a widely used autophagy marker under all conditions (Figure 5Ai), consistent with the lack of its degradation in autolysosomes with autophagy deficiency.

Incubation with FAC (16 h) led to marked calcein quenching, *i.e*., an increase in the labile iron pool, in both *Atg5*$^{-/-}$ and WT BMDMs, whereas the intracellular labile iron pool was barely affected in either cell type after incubation with holo-TF or oRBCs compared to control treatment (Figure 5Bi). Both WT and *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs incubated with FAC and oRBCs exhibited high ferric ferritin (Fe-Ft-H) accumulation (Figure 5Aii), concomitant with increased ferritin H and HO-1 expression (Figure 5Ai); incubation with holo-TF resulted in a modest increase in ferric ferritin levels. Therefore, autophagy deficiency did not impair iron uptake or ferritin iron storage.

The kinetics of WT BMDMs treated with oRBCs revealed an increase of Atg5 and p62 protein levels and increased conversion of cytosolic LC3BI into the lipidated BII form, indicating autophagy activation, at 8-16 h (Figure 5C). At 30 min-1 h, a high level of ferroportin was visible on erythrophagosome membranes in both WT and *Atg5*$^{-/-}$ cells derived from red blood cells (Figure 5Di, supplemental Figure 5Ci). Furthermore, at 2-4 h Ft-H, Hif2α and *Hmox1* appeared to be strongly expressed, indicating heme catabolism concomitant with nonheme iron accumulation, in both WT and *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs (figure 5Dii, supplemental Figure 5Cii). Then, after 16h, ferroportin was localized in perinuclear aggregates, which looked like aggresomes (Figure 5Di, supplemental Figure 5Ci). Then, in WT BMDMs after 24h, the level of ferroportin drastically decreased, and ferroportin was localized in punctate cytoplasmic vesicles (Figure 5Di, supplemental Figure 5Ci). In contrast, in *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs at 16h and extending to 24 h incubation, ferroportin remained at a high level (Figure 5Di, supplemental Figure 5Ci), and higher levels of nonheme iron were present in *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs than in WT cells at 24 h (Figure 5Dii, supplemental Figure 5Cii).

Hepcidin mRNA expression increased in WT BMDMs treated with oRBCs at 2-8 h and then decreased, although it was not significantly affected in *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs (Figure 5E). Ferroportin mRNA expression markedly increased in both WT and *Atg5*$^{-/-}$ BMDMs at 16h, correlating with the high intracellular iron content (Figure 5Dii). Therefore, *Atg5*$^{-/-}$ macrophages lacking functional autophagy exhibited impaired ferroportin degradation after erythrophagocytosis accompanied by increased plasma membrane-localized ferroportin expression.

DISCUSSION

Here, we focused on the role of autophagy in macrophage iron metabolism. Erythrophagocytosis imports ferroportin from enriched red blood cell membrane, then ferroportin accumulates in perinuclear aggregates or aggresome, the holding stations of proteins for autophagy process, before being degraded in WT macrophages. Autophagy-deficiency in *Atg5*$^{-/-}$ macrophages compromises intracellular ferroportin degradation, resulting in a high level of ferroportin protein localized on the plasma membrane, correlates with cellular iron depletion, a low labile iron content and low hepcidin mRNA level. Autophagy is a mammalian system for delivering intracellular components to lysosomes for degradation or recycling. Under starvation conditions, autophagy is induced to generate nutrients and energy through degradation of macromolecules and organelles, but under nutrient-rich conditions, constitutive autophagy has a protective quality control function to degrade protein aggregates, organelles and pathogens.[55,56] Cells use two main routes for degrading intracellular proteins, the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways, which are coordinated.[57] Our results revealed that erythrophagocytic macrophages use autophagy as the main process for ferroportin protein degradation and-turnover, whereas proteasomal protein degradation may be sufficient in non-iron-rich cells. It has been previously shown that turnover of DMT1, the transporter for iron uptake into enterocytes and iron egress from endosomes during the transferrin cycle, is controlled through proteasomal and lysosomal degradation, and deficiency of degradation impairs iron homeostasis.[58] Therefore, a lack of ferroportin degradation increases membrane ferroportin relocalization and iron release. Subsequently, the decreased intracellular iron level is sensed as iron deficiency, increasing TfR1 and decreasing *Hamp1* expression.

The spleens of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice had drastically reduced levels of Perl's stainable ferric iron but a relatively high ferric ferritin content. In cells, nonheme iron is stored in ferritin complexes in a manner primarily related to the iron concentration. However, over a high iron concentration range, iron-loaded ferritin complexes are converted into hemosiderin complexes, membrane vesicles produced after lysosomal degradation that predominate in macrophages.[3, 59, 60] The high level of iron-loaded ferritin despite the low Perl's stain intensity, high level of chelatable labile iron and increased level of heme iron observed in spleenic erythrophagocytic macrophages from *LysMAtg5*$^{-/-}$ mice indicated that autophagy deficiency in macrophages also impairs the shift from fully loaded ferritin to the membrane hemosiderin compartment.

Human disorders and knockout mouse models related to iron-modulating proteins have provided important insights into the maintenance of iron homeostasis. Dominant ferroportin

disease results in iron accumulation in macrophages, mild anemia with low transferrin saturation but hyperferritinemia, and increased liver iron and hepcidin levels.[48,61] In this disease, it has been shown that ferroportin accumulates in intracellular vesicles from erythrophagocytic macrophages and thus has less efficient relocalization. Furthermore, inhibition of endocytosis leads to complete redistribution of ferroportin on the plasma membrane in WT macrophages.[61] Therefore, ferroportin likely traffics between the plasma membrane and endomembrane in WT macrophages, and it has been suggested that ferroportin can localize in hemosiderin structures.[62-64] Furthermore, both iron treatment and erythrophagocytosis increase ferroportin transcription and induce ferroportin relocalization to the plasma membrane in WT macrophages.[18,64] Here, in mice, we showed that conditional *Atg5* knockout in macrophages impairs proper ferroportin degradation after erythrophagocytosis and increases its relocalization to the plasma membrane. The autophagic process facilitates ferroportin trafficking and turnover, which affect iron distribution.

Deletion of one of the genes encoding a core autophagy-related protein (ATG) results in ineffective autophagy and causes either embryonic or neonatal lethality due to defects in nutrient supply, recycling or waste disposal.[65] Transgenic expression of *Atg5* in the brain rescues the lethal phenotype of *Atg5* deficiency in mice despite normal organ histology, results in iron acquisition and growth impairments with anemia, and abolishes proper regulation of iron-related gene expression.[66] Here, conditional deletion of the essential autophagy gene *Atg5* in macrophage-granulocyte lineage cells led to the accumulation of the ferroportin at the plasma membrane in macrophages and, unexpectedly, at the basolateral membrane in absorptive enterocytes where it plays a major role in iron export to blood. These observations are consistent with the relatively low level of Perl's stainable iron in splenic macrophages. The rather high blood iron indices and increased erythropoietic activity in the bone marrow and spleen without signs of anemic stress corroborated the uncontrolled iron efflux and iron mobilization for erythropoiesis in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice. Furthermore, high iron efflux correlated with systemic parenchymal iron overload, primarily in hepatocytes, and increased hepatic expression of hepcidin. However, the increased hepatic level of hepcidin in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice failed to limit ferroportin-mediated iron export from macrophages and enterocytes. It has been shown that elevated liver iron levels modulate hepcidin expression even in mice overexpressing Epo, thus limiting the maximum hepcidin expression level.[67] In *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice, the absence of erythropoietic demand indicates that another signal may be implicated in systemic ferroportin

control. We observed that *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mouse spleens have lower levels of hepcidin than WT mouse spleens, possibly contributing to systemic iron regulation.

A large amount of iron traffics to macrophages and accumulating data suggest that tissue macrophages are ferrostats that sense and respond to local tissue iron needs, thereby regulating iron availability in the local microenvironment and contributing to systemic iron homeostasis.[68] Here in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice the lack of ferroportin observed in hepatic Kupffer cells correlated with the increase in hepcidin in proximal hepatocytes and proteasomal activity, whereas the increase in the membrane ferroportin level in enterocytes and splenic macrophages was consistent with the low hepcidin level in macrophages. Taken together, our results in mice with autophagy-deficient macrophages provide new insight into the major role of the macrophages in iron sensing and systemic iron homeostasis. Lack of ferroportin degradation led to a low labile iron content in macrophages and decreased hepcidin expression, and with the unrestricted ferroportin expression observed in enterocytes, was consistent with autocrine and paracrine regulation of ferroportin by hepcidin expression in widely distributed resident macrophages.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is submitted in partial fulfillment of the requirement for the PhD of M.T. The authors thank Valérie Quesniaux (CNRS UMR7355, Oléans, France) for proofreading the manuscript. The authors greatly acknowledge David Gosset of the P@CYFIC platform for fluorescent Zeiss microscopy imaging (Center for Molecular Biophysics, CNRS UPR4301, Orléans, 45071 France). This study was supported by the CNRS, the University of Orléans, and the Région Centre Val de Loire, France.

AUTHOSHIP

Contribution: M.T. performed most experiments, analyzed data, made the figures and contributed to write the manuscript; I.M. performed experiments; M.L.B. carried out breeding and gene testing to produce the conditional *LysMAtg5-/-* mice; C.M. designed the research, analyzed data and wrote the paper.

CONFLICT-OF-INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no competing financial interests.

CORRESPONDENCE

Catherine Mura, UMR7355, 3B rue de la Ferollerie, 45071 Orléans, France ; e-mail : catherine.mura@cnrs-orleans.fr.

REFERENCES

1- Korolnek T, Hamza I. Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood*. 2015;125(19):2893-2897.

2- May A, Forrester LM. The erythroblastic island niche: modeling in health, stress, and disease. *Exp Hematol*. 2020;91:10-21.

3- Iancu TC. Ferritin and hemosiderin in pathological tissues. *Electron Microsc Rev*. 1992;5:209-229.

4- Nairz M, Theurl I, Swirski FK, Weiss G. ‘‘Pumping iron’’ how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch.* 2017;469(3):397-418.

5- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005;1(3):191-200.

6- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, *et al*. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 2000;5:299-309.

7- Yoshida K, Furihata K, Takeda S. *et al*. A mutation in the ceruloplasmin genes is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet.* 1995;9(3):267-272.

8- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, *et al*. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*. 1999;21(2):195–199.

9- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, *et al*. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (*USF2*) knockout mice. *Proc Natl Acad Sc USA* 2001;98(15):8780-8785.

10- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, *et al*. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306 (5704):2090-2093.

11- Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A red carpet for iron metabolism. *Cell.* 2017;168(3):344-361.

12- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, *et al*. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276(11):7811-7819.

13- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, *et al*. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002;110(7):1037-1044.

14- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 2003;101(7):2461-2463.

15- Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4635-4644.

16- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* 2014;46(7):678–684.

17- Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood.* 2005;106(106):3979-3984.

18- Knutson MK, Vafa MR, Haile DJ, Wessling-Resnick M. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood.* 2003;102(12):4191-4197.

19- Yang F, Liu XB, Quinones M, Melby PC, Ghio A, Haile DJ. Regulation of reticulendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J. Biol. Chem*. 2002;277(42):39786-39791.

20- Mastrogiannaki M, Matak P, Delga S, Deschemin JC, Vaulont S, Peyssonnaux C. Deletion of HIF-2α in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood.* 2012;119(2):587-590.

21- Taylor M, Qu A, Anderson ER, *et al*. Hypoxia-inducible factor-2α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology.* 2011;140(7):2044-2055.

22- Marro S, Chiabrando D, Messana E., *et al*. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and MARE/ARE sesquence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Hematologica.* 2010;95(8):1261-1268.

23- Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet.* 1999;21(4):396-399.

24- Ohgami RS, Campagna DR, Antiochos B, *et al*. *nm1054*: a spontaneous, recessive, hypochromic, microcytic anemia mutation in the mouse. *Blood*. 2005;106(10):3625-3631.

25- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, *et al*. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388(6641):482-488.

26- Tabuchi M, Yanatori I, Kawai Y, Kishi F. Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1. *J Cell Science*. 2009;123(5):756-766.

27- Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, *et al*. Early embryonic letality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3021-3024.

28- Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, *et al*. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis *in vivo. Nat Cell Biol.* 2014 ;16:1069-1079.

29- Bellelli R, Federico G, Matte A, *et al*. NCOA4 deficiency impairs systemic iron homeostasis. *Cell Reports* 2016;14(3):411–421.

30- Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*. 2008;320(5580):1207–1210.

31- Yanatori I, Yasui Y, Tabuchi M, Kishi F. Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochem J.* 2014;462(1):25-37.

32- Lane DJR, Richardson DR. Chaperone turns gatekeeper : PCBP2 and DMT1 form an iron-transport pipeline. *Biochem J*. 2014;462(1):e1-e3.

33- Yanatori I, Richardson DR, Imada K, Kishi F. Iron export through the transporter ferroportin 1 is modulated by the chaperone PCBP2. *J Biol Chem.* 2016;291(33):17303-18.

34- Yanatori I, Richardson DR, Toyokuni S, Kishi F. How iron is handled in the course of heme catabolism: Integration of heme oxygenase with intracellular iron transport mechanisms mediated by poly (rC)-binding protein-2. *Arch Biochem Biophys*. 2019;672:108071.

35- Muckenthaler MU, Galy B, Hentze M. Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:197-213.

36- Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(7):690–699.

37-Altamura S, Kessler R, Gröne HJ, *et al*. Resistance of ferroportin to hepcidin binding causes exocrine pancreatic failure and fatal iron overload. *Cell Metabolism*. 2014;20(2):359-367.

38- Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, DiRenzo C, Robine S, Andrews NC. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1258-1266.

39- Ohgami RS, Campagna1 DR, Greer EL, *et al*. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genetics.* 2005;37:1264-1269.

40- Bellelli R, Federico G, Matte A, *et al*. NCOA4 deficiency impairs systemic iron homeostasis. *Cell Report.* 2016;14(3):411-421.

41- Galy B, Ferring D, Minana B, *et al*. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood.* 2005;106(7):2580-2589.

42- LaVaute T, Smith S, Cooperman S, *et al*. Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat Genet.* 2001;27(2):209–214.

43- Harris Z L, Durley AP, Man, TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Pro Natl Acd Sc. USA* 1999;96(19):10812-10817.

44- Kenawi M, Rouger E, Island ML, *et al.* Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload: lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia. *FASEB J. 2019;*33(12):13492–13502.

45- Hayashi A, Wada Y, Suzuki T, Shimizu A. Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet.* 1993;53(1):201-213.

46- Athiyarath R, Arora N, Fuster F, *et al*. Two novel missense mutations in iron transport protein transferrin causing hypochromic microcytic anaemia and haemosiderosis: molecular characterization and structural implications. *Br J Haematol.* 2013;163(3):404–420.

47- Fuqua BK, Lu Y, Fraze DM, *et al*. Severe iron metabolism defects in mice with double knockout of the multicopper ferroxidases hephaestin and ceruloplasmin. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018;6(4):405-427.

48- Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32(1):31–138.

49- Hara T, Nakamura K, Matsui M, *et al*. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006 ;441(7095):885-889.

50- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*.1999; 8(4) :265-277.

51- Agoro R, Benmerzoug S, Rose S, *et al*. An iron-rich diet decreases the mycobacterial burden and correlates with hepcidin upregulation, lower levels of proinflammatory mediators, and increased T-cell recruitment in a model of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection. *J Infect Diseases*. 2017;216(7):907–918,

52- Agoro R, Taleb M, Quesniaux VFJ, Mura C. Cell iron status influences macrophage polarization. *Plos One*. 2018;13(5):e0196921.

53- Koulnis M, Pop R, Porpiglia Er, Shearstone J R , Hidalgo D, Socolovsky M. Identification and analysis of mouse erythroid progenitors using the CD71/TER119 Flow-cytometric Assay. *J Vis Exp.* 2011;54:e2809.

54- Kovtunovych G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1–deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood.* 2010;116(26):6054-6062.

55- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biol.* 2013 ;15(7):713-720.

56- Galluzzi L, Green DR. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery. *Cell*. 2019;177(7):1682-1699.

57- Liebl MP and Hoppe T. It's all about talking: two-way communication between proteasomal and lysosomal degradation pathways via ubiquitin. *Am J Physiol Cell Physiol. 2016;*311(2):C166–C178.

58- Garrick MD, Zhao L, Roth JA, Jiang H, Feng J, Foot NJ, Dalton H, Kumar S, Garrick LM. Isoform specific regulation of divalent metal (ion) transporter (dmt1) by proteasomal degradation. *Biometals*. 2012;25(4):787–793.

59- Zuyderhoudt F.J., Sindram, J.W., Marx, J.M., Jorning, G.A. & Goo J. The amount of ferritin and hernosiderin in the livers of patients with iron-loading diseases. *Hepatol.* 1983;3(2): 232-235.

60- Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., & Iwai, K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and ion-replete cells. *Mol Cell Biol.* 2011;31(10):2040–2052.

61- Sabelli M, Montosi G, Garuti C, Caleffi A, Oliveto S, Biffo S, Pietrangelo A. Human macrophage ferroportin biology and the basis for the ferroportin disease. *Hepatol.* 2017;65(5):1512-1525.

62- Aboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 2000;275(26):19906–19912.

63- D'Anna MC, Veuthey TV, Roque ME. Immunolocalization of ferroportin in healthy and anemic mice. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(1):9-16.

64- Delaby C, Pilard N, Puy H, Canonne-Hergaux F. Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *Biochem J.* 2008;411(1):123–13.

65- Kuma A, Hatano M, Matsui M, *et al*. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004;432(7020):1032–1036.

66- Yoshii SR, Kuma A, Akashi T, *et al*. Systemic analysis of Atg5-null mice rescued from neonatal lethality by transgenic ATG5 expression in neurons. *Dev Cell* 2016;39(1):116–130.

67- Diaz V, Gammella E, Racalcatti S, Santambroglio P, Naldi AM, Vogel J, Gassmann M, Cairo G. Liver iron modulates hepcidin expression during chronically elevated erythropoiesis in mice. *Hepatology*. 2013;58(6):2122-2132.

68- Winn K, Volk KM, Hasty AH. Regulation of tissue iron homeostasis: the macrophage "ferrostat ". *J Clin Invest*. 2020;5(2)e132964.

TABLE Table 1. Peripheral red blood cell indices and iron parameters. Red blood cell (RBC) counts, hemoglobin (Hb) levels, hematocrit (HCT) levels, mean corpuscular volume (MCV), Epo, serum iron, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation (TS), and serum ferritin (SF) in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice.

Genotype	RBC $10^6/mm^3$	Hb g/dL	HCT %	MCV fL	Serum iron µg/dL	EPO pg/mL	TIBC µg/dL	TS %	SF pg/mL
wt/wt	8.55±0.97	13.62±0.65	43.65±2.84	46.46±1.10	275.9±90.62	733.71±256	345±92	49.59±8.8	119.2±28.5
LysMAtg5$^{-/-}$	9.09±0.61	13.90±0.74	42.05±2.76	46.31±1.09	321.4±115.31	726±372	322±48	57.28±16.8	123.6±38.4
p	0.66	0.58	0.44	0.91	0.0004	0.97	0.34	0.0064	0.96

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice had normal hepatic histology but mild fibrosis.

A. Histogram of the mean and standard error values with dot plots of liver weight normalized to body weight; n = 14 to 15 in each group.

B. Representative liver anatomy of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. Immunofluorescence of liver sections stained with a PE-conjugated anti-F4/80 antibody (red) and DAPI (blue) for nuclear staining showing a similar Kupffer cell distribution (Leica fluorescence microcopy imaging, original magnification 20x; Scale bars, 20 µm). Liver sections stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Sirius red with Fast green counterstaining (NanoZoomer scan imaging, original magnification 20x; Scale bars, 50 µm); Sirius red-positive areas of collagen (red) are indicative of mild liver fibrosis in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mouse livers. Histological staining panels are representative of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice (n= 8 per group). **C.** Histogram of the mean and standard error values with dot plots of serum AST levels; n=13 in each group. *$p < 0.05$

Figure 2. Increased erythropoiesis in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice.

A. Representative example of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mouse spleens and spleen weight-to-body weight (%) ratios. Data are presented as histograms of the mean and standard error values, with individual measurements; n= 14-15 in each group.

B. Macrophage localization and cell count. Immunofluorescence with a PE-conjugated anti-F4/80 antibody for macrophage staining (red) and DAPI (blue) for nuclear staining; and flow cytometric analysis results depicted as dot plot-type histograms (mean values and standard errors, n=5) showing the F4/80^{+}/CD11b^{-} macrophage and CD11b^{+}/F4/80^{-} monocyte populations in the spleens of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. Leica fluorescence microcopy imaging, original magnification 20x; Scale bars, 20 µm; The gating strategy is shown in supplemental Figure 3A.

C. Spleen (**i**) and bone marrow (**ii**) histology and blood cell analysis (**iii**) with flow cytometry plots showing erythroid lineage cells from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. **i**, H&E-stained sections of spleen tissue WP, white pulp; RP, red pulp. NanoZoomer scan imaging, original magnification 5x; Scale bars 200 µm. The insets in the spleen panels show enlarged images of the boxed regions (original images 40x ; Scale bars, 20 µm) showing brown hemosiderin deposits in WT mice and erythroblastic islands consisting of a central nurse macrophage surrounded by a ring of developing red blood cell precursors in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice. **ii**, H&E-stained bone sections. Leica microcopy imaging, original magnification 20x; Scale bars 20 µm.

iii, Peripheral blood smears stained with May-Grunwald-Giemsa stain ; the arrows indicate hematoxylin blue-stained reticulocytes (NanoZoomer scan imaging, original magnification 20x; Scale bars, 20 µm). Representative flow cytometry plots for spleen, bone marrow and blood showing erythroid precursors based on CD71 and Ter-119 markers used to separate the erythroid progenitors. The gating strategy is shown in supplemental Figure 3A. The relative percentages of cells in stages I-IV of erythropoiesis with stage I single-positive $CD71^{+}$ $Ter\text{-}119^{-}$ early-stage proerythroblasts (region I), stage II double-positive $CD71^{+}$ $Ter\text{-}119^{+}$ late-stage basophilic erythroblasts (region II), $CD71^{low}$ $Ter\text{-}119^{+}$ polychromatic and orthochromatic erythroblasts (regions III and IV) and single-positive $CD71^{-}$ $Ter\text{-}119^{+}$ $CD11b^{+}$ (region IV) in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice are indicated. Representative histograms of flow cytometry data are shown in supplemental Figure 3B.

Figure 3. *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice have splenic and enterocytic iron depletion, ferroportin membrane localization and body iron overload.

A. Histological examination of nonheme iron deposits in the spleen, duodenum and liver in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. Nonheme iron deposition was visualized by Perl's staining (blue) of spleen and duodenum sections and after DAB enhancement (brown) for liver sections. Representative images are shown. NanoZoomer scan imaging, original magnification 10x for spleen and liver, 20x for duodenum; scale bars, 100 µm for spleen and liver, and 40 µm for duodenum. Enlarged inset images 40x; scale bars, 20 µm. The duodenum images show the proximal (top) part where food was no longer in transit and the more distal (down) part where food was in transit. Iron was localized in the apical compartment of WT enterocytes in both parts of the duodenum, whereas in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ enterocytes no iron was seen in the proximal duodenum but iron was localized in both the apical and basal compartments of in the distal duodenum. Enlarged liver images show Kupffer cells stained for iron in WT mice and hepatocyte staining in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice.

B. Tissue iron content in the spleen (**i**) and liver (**iii**) in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and wild-type mice (n = 10 per group), as determined by a ferrozine assay and reported as ng of iron per mg of dried tissue. The data are presented as histograms of the mean and standard error values with dot plots; n= 6 in each group; ****$p=10^{-4}$. Representative Fpn immunoblotting from duodenal lysates (**ii**) from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT male mice (n = 2 mice per genotype are shown).

Staining of ferric iron loaded in ferritin (Fe-Ft) and immunoblotting of ferritin H (Ft-H) in the spleen (**iv**), duodenal (**v**), and liver (**vi**) extracts. For ferric iron loaded ferritin (top), 25 ng of native proteins from cytosolic lysates was loaded in each lane of a nondenaturing PAGE gel,

and after electrophoresis, the gel was directly stained with Perl's staining solution and enhanced with DAB. The gel was then immunoblotted for Ft-H as a control for the band specificity. Representative images from 4 experiments are shown.

Representative western blot of cytoplasmic extracts loaded on a denaturing PAGE gel (down). Gapdh is shown as the loading control. Densitometric analysis was performed on the immunoblot shown as well as on immunoblots with lysates from 3 additional *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice; after normalization to Gapdh in each lane, *LysMAtg5*$^{-/-}$ results were normalized to the WT control group average. The data are presented as means ± standard errors.

C. Calcein-AM loading was analyzed by flow cytometry for measurement of the labile iron pool spleen cells from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. Immediately after recovery, cells dissociated from the spleen were stained simultaneously with calcein (CA-AM) and anti-mouse PerCP-conjugated CD11b and PE-Cy7-conjugated F4/80 antibodies and were then analyzed by flow cytometry. Gates were set on FSC, CD45 and TCRβ. Representative calcein fluorescence profiles of unstained cells (FMO-calcein) and calcein-AM-stained cells (WT and *LysM-Atg5*$^{-/-}$) with respect to cell markers are shown, and histograms with the mean and standard error values from 3 independent experiments are shown as dot-plots.

D. Detection of ferroportin by immunofluorescence in spleen tissus, isolated cells from the spleen, and proximal duodenal villi from male *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. Representative images are composites from ferroportin (red)- and DAPI-stained nuclei (blue) from at least 4 experiments. For spleen and spleen cell smear, Leica fluorescence microcopy imaging, original magnification 20x, scale bars 20 μm. Enlarged inset images, magnification 100x, scale bars 5 μm. For liver, Zeiss inverted microscopy imaging, original magnification 20x ; scale bars, 20 μm.

Figure 4. *Hamp1* expression in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice

A. i, Liver *Hamp1*, *Id1* and *Fga* mRNA levels (relative to *Gapdh*) expressed as -ΔCt values. **ii,** Ratio of liver *Hamp1* mRNA levels to hepatic iron content. **iii,** Correlation of *Hamp1* and *Id1* mRNA levels.

B. Spleen *Hamp1, Id1* and *Fga* mRNA levels (relative to *Gapdh*) expressed as -ΔCt values. The values are the mean of 6 experiments. The data are presented as means and standard errors; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.001.

Figure 5. Autophagy deficiency in BMDMs abrogated ferroportin degradation and led to iron release.

A. Protein expression (**i**) and ferric ferritin (**ii**) in nontreated or treated BMDMs with FAC, holo-TF, or oRBCs. BMDMs plated (10^5) onto 96-wells were treated for 16 h either with FAC (100 μM), holo-TF (30 μM) or oRBCs (5 oRBC:1 cells). **i.** Immunoblotting of Atg5 (Atg5/Atg12 complex is shown), p62, Fpn, Ft-H, HO-1 and β-actin as the loading controls. **ii.** Staining of ferric iron loaded in ferritin on native PAGE gels in BMDMs after the indicated treatments. Twenty-five nanograms of native proteins from cytosolic lysates was loaded in each lane of a nondenaturing PAGE gel, and after electrophoresis the gel was directly stained with Perl's staining solution and enhanced with DAB. Representative images from 3 experiments are shown.

B. Calcein quenching assay for labile iron pool (LIP) measurement, ROS levels, and membrane TfR1 expression. Cells were plated (10^5) in 96-wells plates and treated for 16 h with FAC (100 μM), holo-TF (30 μM) or oRBCs (5 oRBCs:1 cell). For intracellular labile iron pool (LIP) measurement based on calcein quenching and the ROS assay, after addition of calcein-AM (calcein quenching assay) or H_2DCFDA (ROS assay) the fluorescence intensity was measured. A representative analysis of 3 independent experiments is shown. For calcein, the mean fluorescence intensity (MFI) of treated cells was normalized to that of untreated control cells. ROS production is represented as the percentage relative to that in untreated control cells. For evaluation of TfR1 membrane expression, cells were incubated with BV510 anti-CD45, PE-Cy7 F4/80 and eFluor450 CD71 anti-mouse antibodies and analyzed by flow cytometry. **p < 0.01, ***p<0.001,****p<10^{-4}.

C. Expression kinetics in BMDMs treated with oRBCs. *Atg5*$^{-/-}$ and WT BMDMs were incubated with oRBCs (5 oRBCs:1 cell) for the indicated times. Western blot analysis of p62, Fpn, Hif2α, LC3B, and β-actin as control in BMDMs from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice incubated with oRBCs (5 oRBC:1 cell) for the indicated times. After treatment with oRBCs, protein was extracted from BMDMs for western blot analysis.

D. Ferroportin localization and iron loading in BMDMs from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice treated with oRBCs. **i,** Detection of ferroportin by immunofluorescence in BMDMs from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. The representative images shown are composites of ferroportin (red) and DAPI-stained nuclei (blue); Leica fluorescence microcopy imaging, original magnification 100x. **ii,** Representative images of Perl's/DAB iron stained BMDMs. NanoZoom scan imaging ; original magnification 40x. BMDMs cultured on slides incubated for the indicated times after treatment

with oRBCs (5 oRBC:1 cell) were fixed with PFA for immunostaining or with methanol for Perl's staining followed by DAB enhancement.

E. Kinetics of *Hmox1*, *Hamp1* and *Fpn* mRNA expression in BMDMs treated with oRBCs. Representative mRNA fold changes (relative to *Gapdh*) expressed as -ΔΔCt values from 3 replicates. The data are presented as means and standard errors. *p < 0.05, **p <0.01,***p<0.001, ****p<10^{-4}.

SUPPLEMENTAL METHODS

Animals

Conditional mutant mice on a C57BL/6J background lacking the autophagy-related 5 gene (*Atg*5) in myeloid lineage cells, including monocytes, mature macrophages and granulocytes, were generated by crossing the Atg5 (autophagy gene 5) floxed ($Atg5^{fl/fl}$) mice [Hara *et al*. 2006] with *lysozyme M cre* (*LysM cre*) transgenic strain [Clausen *et al*. 1999] and then breeding $Atg5^{fl/+}$ *LysM Cre*. The mice referred to herein as *LysM-*$Atg5^{-/-}$ mice carried floxed alleles of *Atg5* and one copy of the *lysozyme M Cre* transgene. Cre-negative floxed ($Atg5^{fl/fl}$) littermate mice were used as wild-type controls. Mice were routinely typed by PCR from DNA extracted from tails (supplement Table 1 for primers). Mice were housed under specific pathogen-free conditions in our animal facility at the Transgenose Institute (UAR44 TAAM CNRS, Orléans, France) and had access to chow and water ad libitum. Mice were fed a standard commercial diet (R03 from Scientific Animal Food & Engineering; Augy, France) with a normal iron content of 250 mg iron/kg and were analyzed at 5 to 9 months old. All animal experiments complied with the French Government's animal experiment regulations and were approved by the National Ethics Committee for Animal Experimentation (CLE CCO 2020-23557).

Hematology, serum and iron analysis

Hematological parameters, serum and iron parameters, nonheme tissue iron content were analyzed as described previously [Agoro *et al*. 2017; Agoro *et al*. 2018]. Mice were anesthetized with isoflurane and blood was collected by retroorbital venipuncture in EDTA-containing tubes for plasma or in serum separator tubes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Hematological parameters were determined by using a SCIL Vet abc Plus^{+} hematometer (SCIL Animal Care Company, Altorf, France). The morphology of red blood cells was evaluated by blood smear staining with a Fast Quick May-Grunwald Giemsa kit (DiaPath kit, Martinengo, Italy). The serum iron concentration, unsaturated iron-binding capacity (UIBC), and transferrin saturation were determined by the standard ferrozine colorimetric method. Serum ferritin and serum erythropoietin (Epo) levels were quantified by enzyme immunoassay kits (Abnova, Taipei, Taïwan; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were determined by a colorimetric method (Biolabo SAS, Maizy, France).

The nonheme tissue iron content was quantified by the ferrozine colorimetric method, and the results are reported as ng of iron per mg of dry tissue. Briefly, tissue samples were dried at 120°C for 16 h and were then weighed and dissolved in 1:1 sulfuric acid : nitric acid for 30 min

at 90°C. After 1 mL of H_2O was added to the samples, 25 µL of extracted iron solution was reacted with ferrozine detection solution (10 mM ferrozine/32.6 mM L-ascorbic acid/50 mM Tris HCl (pH 4)) at room temperature for 30 min, and the absorbance was then measured at 562 nm. A standard $FeCl_3$ curve was used to calculate the iron concentration.

Histology

Tissue samples fixed in 4% phosphate buffered formalin, were processed for paraffin embedding and cross sectioning (5 µm). Bones were decalcified in 10% EDTA and 2.5% formalin in PBS (pH 7.4) for 20 days before paraffin embedding. Deparaffinized tissue sections were stained with hematoxylin/eosin (H&E), 0.1% sirius red solution/0.1% Fast Green in aqueous saturated picric acid. For assessment of ferric iron deposits, Perl's solution (3.7% hydrochloric acid and 5% potassium ferrocyanide/nuclear Fast Red) was used, with further enhancement with 3,3′-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Chemicals, St Louis, MO, USA) solution (0.025% DAB/0.12% H_2O_2 in PBS (pH7.4)) when indicated. Treatment with 0.5 mM H_2O_2 in PBS (pH7.4) for 1 hour was used before Perl's staining for iron oxidation when indicated. Snap frozen tissue cryosections were stained with Oil Red O (0.6% (w/v) in H_2O) and counterstained with hematoxylin. Histological images were acquired with a NanoZoomer NDP scan 1.0.9 scanner and imported into NDP view 2.0 software (Hamamatsu Photonics K.K., Japan).

Immunofluorescence microscopy

For immunofluorescence staining of deparaffinized tissue sections, cells isolated from spleen or bone marrow (as described above) and BMDMs (2.10^5 cells) immobilized on slides, were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and were then treated with 50 mM glycine/50 mM NH_4Cl for 15 min and blocked with 10% horse serum/2% BSA/1 mM $CaCl_2$/1 mM $MgCl_2$ in PBS (pH7.4). Slides were incubated with primary rabbit anti-ferroportin antibody overnight at 4°C, and then with a secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody for 2 h at room temperature. Then, slides were treated with TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotium, Fremont, CA, USA), nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and slides were washed and mounted (Fluoromount®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Parallel slides incubated without a primary antibody were used as negative controls. Immunofluorescence images were acquired by a Leica CTR6000 confocal microscope (Leica, Heidelberg, Germany) and imported into MetaMorph software (Molecular Devices, Downingtown, PA). For duodenum and liver, fluorescent microscopy images were acquired by a Zeiss Observer Z7 inverted microscope coupled with a

Zeiss LSM 980 Airy Scan 2 device (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany). Images were acquired using Zeiss ZEN blue 3.1 software (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany).

Cytosolic lysate preparations, protein extraction and analysis

For in-gel detection of ferric iron-loaded ferritin, fresh cytosolic native protein extracts (25 µg) of snap frozen tissues or BMDMs were prepared by homogenization in a 10 mM Tris (pH 7)/1 mM $MgCl_2$/1x protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) solution and incubated on ice for 10 min. After centrifugation at 25,000 x g, the supernatant was recovered as the cytosolic native protein fraction. The protein concentration was measured in a NanoDrop spectrophotometer at 280 nm. Native protein extracts were separated on nondenaturing 5% PAGE gels (30 mA for 1 h 30) at 4°C. The gels were stained in freshly prepared Perl's staining solution for 1 h at room temperature and further enhanced with DAB solution. After electroblotting, membranes were probed with a primary rabbit anti-ferritin antibody and secondary anti rabbit IgG as described below, to confirm that the bands were stained for ferric ferritin. In all experiments, only one band of high molecular weight (approximately 440 kDa) stained with Perl's stain/DAB was positive for anti-ferritin antibody. For normalization, Gapdh in its denatured (western blot) form was used.

For western blotting, proteins were extracted from snap frozen tissues or BMDMs homogenized in lysis buffer (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, and 5% β-mercaptoethanol), incubated for 1 h at room temperature and sonicated. The protein concentration was measured in a NanoDrop spectrophotometer at 280 nm. Samples were separated by SDS/PAGE; after electroblotting, membranes were blocked with a solution of Tris-buffered saline, 0.5% (v/v) Tween-20 (TBS-T) and 10% (w/v) skim milk for 2 h. Primary antibodies were diluted in TBS-T with 5% (w/v) skim milk and incubated overnight. After washes with TBS-T, incubation with the horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit IgG antibody, further TBS-T washes, and incubation with a mouse anti-β-actin-HRP antibody for normalization, protein signals were detected using a chemiluminescence reagent (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and digitally imaged using Syngene Pxi4 System (Syngene, Cambridge, UK) Integrated Scientific Solutions). The band densitometric analysis results shown in this study are presented as the mean of three series of western blot analyses.

Flow cytometric analysis

A single-cell suspension of spleen cells was obtained by enzymatic digestion using liberase (125 µg/mL; Roche) and DNase I (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) in a final volume of 1 mL of RPMI at 37°C for 30 min under agitation. The cells were then filtered through a 100 µm cell strainer, red blood cells were lysed (PharmLyse, BD Biosciences) (for erythrocyte staining, the lysis step was omitted), the cells were counted, and the concentrations were adjusted to 2.10^6 cells/mL. For bone marrow analysis, cells were harvested from femurs by injection of PBS; for BMDMs, 10^5 cells per well were plated in 96-well plates and treated as indicated. Blood cells were collected in EDTA and washed with PBS. Cells collected in PBS/5% FCS/2 mM EDTA were then incubated for 30 min at 4°C with Fc blocker and stained with a combination of fluorochrome-conjugated anti-mouse antibodies (supplemental Table 2). Erythroid precursors staining was performed as previously described in Koulnis *et al*. 2011.

For the calcein-AM assay, cells were collected in PBS and incubated for 15 min with 0.2 µM calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM, Sigma Chemicals) probe. Calcein fluorescence was detected in the FITC channel. Fluorescence minus one controls were set up for all the antibodies used; 400.000 events were recorded for spleen, bone marrow, and red blood cell suspensions, and 150.000 events were recorded for BMDMs. Data were collected in a FACScan flow cytometer (BD FACS Canto^{TM}II, BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (FlowJo 7.6.5, Tree Star, Ashland, OR, USA).

RNA extraction and quantitative PCR analysis

Total RNA from tissue samples or cells was isolated by TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription of 1 µg of total RNA was performed with a SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) in total volume of 20 µL. The mRNA levels of selected genes were measured using a QuantiTect SYBR Green PCR system (Qiagen) and an Aria Mx real time PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). *Hmox* and *Gapdh* quantitect primers from Qiagen were used, for the sequences of the primers of *Hamp1*, *Fpn* and *Ft-H,* see supplemental Table 1. For spleen and BMDM hepcidin qPCR a 12-cycle preamplification step was carried out. qRT-PCR was performed in triplicate, and target mRNA levels were normalized to that of the housekeeping gene *Gapdh* in the same RT sample. The -ΔCt ($\Delta C_t = C_{t\ target} - C_{t\ reference}$) method was used to calculate the relative steady state gene transcript levels in organs, and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\ treated} - \Delta C_{t\ control}$) was used to determine the fold

changes in gene expression levels compared with untreated conditions for the *in vitro* BMDM experiments.

Bone marrow-derived macrophage generation and treatment

To obtain bone marrow derived macrophages (BMDMs), murine bone marrow cells harvested from femurs were differentiated into macrophages after culture for 6 days in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 20% heat-inactivated horse serum, 30% L929 cell supernatant containing macrophage-stimulating factor (M-CSF), and streptomycin/penicillin. Macrophages were then harvested in cold PBS, and plated at a density of 3 x 10^5 cells/cm^2 in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, streptomycin/penicillin and 2% horse serum overnight. When indicated, cells were incubated with 100 µM ferric ammonium citrate (FAC), 30 µM holo-transferrin (holo-TF) (Sigma Chemicals), or opsonized red blood cells. Opsonized red blood cells were prepared as described in Kovtunovych *et al*. 2010. Briefly, fresh mouse blood collected in EDTA tubes and washed twice in Alsever's solution was incubated for 30 min at 4 °C with 0.25 mg/mL of rabbit anti-mouse red blood cell antibody (Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, USA). Opsonization was checked by flow cytometry after labeling with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG H + L secondary antibody (Invitrogen), and subsequent incubation with marcophages were performed at a red blood cell:macrophage ratio of 5:1.

After cell treatments, the cell count was assessed after 30 min of incubation with 20 µg/mL Hoechst 3342 (Invitrogen) at excitation/emission wavelengths 360 nm/460 nm. Mitochondrial activity was assessed by an MTT assay. Cells were incubated for 2 h in culture medium containing 2.5 mg/ml 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and formazan was solubilized by the addition of 100 µL of 10% SDS in DMSO/0.6% acetic acid and incubation for 10 min. The absorbance of the formazan was measured at 610 nm. Lactate dehydrogenase (LDH) release was assessed with Cytotoxicity Assay Kit (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) and glucose consumption was assessed with a glucose uptake colorimetric assay kit (Glucose GOD PAP, Biolabo, Maizy, France) according to the manufacturers' instructions.

The intracellular labile iron pool (LIP) was measured based on a calcein quenching assay in which the ability of labile iron to bind and quench the fluorescence of the cell-permeable chelator calcein acetoxymethyl ester (CA-AM) in a stochiometric manner. For the iron calcein quenching and ROS assays, cells were plated (10^5) in 96-well black-bottom plates and treated

as indicated; after washing cells were incubated with 1 µM nonfluorescent calcein-AM for 15 min (calcein quenching assay) or 5 mM H_2DCFDA for 30 min (ROS assay) at 37°C and were then washed before measurment using 480 nm/530 nm and 490 nm/520 nm filter pairs, respectively, in a Fluoroskan Ascent microplate fluorometer (Thermo Scientific)

Statistical analysis

GraphPad Prism Software was used for statistical analyses. An unpaired Mann-Whitney test was used for comparisons between two independent groups. Correlations were evaluated using Spearman correlation analysis. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test for pairwise comparisons was used for comparisons among more than two groups. Significance levels are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****p$<10^{-4}$.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplemental Figure 1

A. Genotyping of *LysMAtg5*$^{-/-}$ mice. Atg5$^{fl/fl}$LysMcre floxed mice, which harbor exon 3 of the *Atg5* gene flanked by two loxP sites and are heterozygous for *lysozyme M cre* were genotyped by PCR. Gel electrophoresis shows the amplification of *Atg5* (upper gel) with WT *Atg5* allele (357 bp), *Atg5*^{fl} allele (700 bp), and *LysM* (lower gels) with the *LysM* allele (345 bp) and *LysM cre* allele (711 bp).

B. Body weight of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and wild-type mice. Dot plot histogram of the mean and standard error values of the body weights of male (M) and female (F) mice 5-8 months old; n= 4-7 in each group.

C. Myeloid cell counts in peripheral blood of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and wild-type mice. Dot plot histogram of the mean and standard error values of white blood cell (WBC) and monocyte (Mono), neutrophil (NP), eosinophil (EOS) counts in the peripheral blood of *LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice and WT animals; n= 12 in each group.

Supplemental Figure 2. Analysis of liver damage.

A. Oil Red O staining of liver cryosections *from LysM-Atg5*$^{-/-}$ mice showing lipid droplets (red). Leica micropcopy images, *original magnification 20x*; Scale bars, 20 μm.

B. **Analysis of liver inflammatory parameters in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice.** IL6 and TNFα cytokines and myeloperoxidase (MPO) expression are presented as pg per mg of protein. The data are presented as histograms of the means and standard errors in each group (n=3-5 per group).

Supplemental Figure 3.

A. Flow cytometry gating strategy. Gating was based on size and granularity, and CD45, TCRβ, F4/80, Ly6C/G, and CD11b staining was used to separate macrophage and monocyte populations from the spleen. Fluorescence minus one (FMO) controls are shown for each fluorochrome used.

B. Flow cytometric analysis of erythroid lineage and dot plot histogram data. The gating for erythroid progenitor populations in whole spleen, bone marrow or blood was based on the size and the expression of the differentiation marker CD71 (*i.e.*, TfR1) and the erythroid lineage marker Ter119. The relative percentages of cells in stages I-IV of erythropoiesis: stage I single-positive CD71^{+} Ter-119^{-} early-stage proerythroblasts (region I), stage II double-positive CD71^{+}

Ter-119^{+} late-stage basophilic erythroblasts (region II), CD71^{low} Ter-119^{+} polychromatic and orthochromatic erythroblasts (regions III and IV) and single-positive CD71^{-} Ter-119^{+} CD11b^{+} (region IV). The data are from the spleen (n=8), bone marrow (n=10) and blood (n=10) in *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. The data are presented as the mean and standard error values, with dots indicating individual measurements; *p < 0.05, **p=0.001, ***p=10^{-4}, ****p=10^{-5}.

Supplemental Figure 4.

A. i, Calcein-AM loading was analyzed by flow cytometry to measure the labile iron pool in bone marrow cells from *LysM-Atg5*$^{-/-}$ and WT mice. Immediately after recovery, cells dissociated from the bone marrow were stained simultaneously with calcein acetoxymethyl ester (CA-AM) and anti-mouse PerCP-conjugated CD11b and PE-Cy7-conjugated Ly6C/G antibodies and were then analyzed by flow cytometry. Gates were set on SSC-A and FSC. Representative calcein fluorescence profiles of unstained cells (FMO-calcein), and calcein-AM-stained cells (WT and *LysM-Atg5*$^{-/-}$) with respect to cell markers are shown, and histograms with the mean and standard error from 3 independent experiments are shown.

ii. *Detection of ferroportin by immuno*fl*uorescence in isolated cells from the bone marrow of LysM-Atg5*$^{-/-}$ and *WT mice.* Representative images are composites *of ferroportin (*red) *and DAPI-stained nuclei (*blue) *from at least 4 experiments. Leica fluorescence microcopy imaging; original magni*fi*cation 20x; Scale bars, 20 µm. Enlarged inset images magnification, 100 x ; Scale bars 5 µm.*

B. i, Histological examination of nonheme iron deposits after Perl's staining (blue) in liver sections and ferroportin immunofluorescence staining in *LysM*-Atg5$^{-/-}$ and *WT m*ice. Representative images from 10 animals per group are shown. *Leica fluorescence microcopy imaging;* original magnification *20x*.

ii. *Detection of ferroportin by immuno*fl*uorescence in livers from male LysM-Atg5*$^{-/-}$ and *WT mice. Images were* acquired in the green and red channels. Representative images are composite *from ferroportin (*green) *and DAPI stained nuclei (*blue) *from at least 3 experiments. Zeiss fluorescence inverted microcopy imaging,* original magnification *20x ; Scale bars 50 µm.*

C. Histological examination of nonheme iron in the kidney, heart, pancreas, and testis from *LysM*-Atg5$^{-/-}$ and *wild-type m*ice. Representative images of Perl's staining (blue) followed by DAB enhancement (brown) are shown. NanoZoomer scan imaging, original magnification 20x for kidney and heart, 20x for pancreas and testis.

D. i, Iron content in tissue from *LysM*-Atg5$^{-/-}$ and *wild-type* (n = 10 in each group) *m*ice, as determined by a ferrozine assay and reported as mg of dry tissue; **ii**, organ weight-to-body weight ratios; *p < 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<10^{-4}.

Supplemental Figure 5.

A. Hoechst 33342 DNA staining, lactate dehydrogenase (LDH) release assay, MTT assay and glucose uptake assay. BMDMs cultured in medium without M-CSF for 24 h were then treated with FAC (100 μM), holo-TF (30 μM), oRBCs (5 red cells per macrophage). The cell count was assessed by Hoechst 3342 (20 μg/mL) nuclear staining, membrane integrity was assessed by a lactate dehydrogenase assay, an MTT assay was employed to assess mitochondrial activity, and glucose uptake activity in cells was assessed. The data are presented as the relative percentages with respect to untreated control cells; *p<0.05.

B. Flow cytometric analysis of TfR1 (CD71^{+}) membrane expression on BMDMs. BMDMs cultured as previously indicated were incubated with BV510 anti-CD45, PE-Cy7 F4/80 and eFluor450 CD71 anti-mouse antibodies and analyzed by flow cytometry.

C. i, *Detection of ferroportin by immuno*f*luorescence. Leica fluorescent microscopy imaging;* original magnification*, 100x.* **ii,** Perl's/DAB iron staining in BMDMs *treated with oRBCs***.** NanoZoomer scan imaging; original magnification 20x. BMDMs *from LysM-Atg5*$^{-/-}$ and *WT mice* seeded on slides were incubated in medium or with opsonized red blood cells for 16 h and were fixed with PFA for immunostaining or with methanol for Perl's staining followed by DAB enhancement.

Supplemental Table 1. Primers used for PCR and qPCR.

Atg5 forward WT allele	5'-GAATATGAAGGCACACCCCTGAAATG-3'
Atg5 forward *floxed* allele	5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3'
Atg5 reverse common primer	5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3'
LysM forward common primer	5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'
LysM reverse WT allele	5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3'
LysM reverse *cre* allele	5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3'
Hamp1 forward	5'-CCTATCTCCATCAACAGATG-3'
Hamp1 reverse	5'-TGCAACAGATACCACACTG-3'
Fpn forward	5'-CTCTGTCAGCCTGCTGTTTG-3'
Fpn reverse	5'-TCAGGATTTGGGGCCAAGATG -3'
Ft-H forward	5'-GCCAGAACTACCACCAGGAC-3'
Ft-H reverse	5'- TGGTTCTGCAGCTTCATCAG-3

Supplemental Table 2. Antibodies used in the study.

APC anti-mouse Ter119, clone: Ter119	Biolegend, San Diego, CA
eFluor 450 anti-mouse CD71 (Transferrin Receptor), Clone: R17217 (R17 217.1.4)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PE rat anti-CD11b, clone: M1/70	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
PE-cy7 anti-mouse F4/80, clone: BM8	Biolegend,
PE-Cy7 Ly6C/G, clone H1/70	BD Biosciences
PercP Cy5.5 hamster anti-mouse TCRβ chain, Clone: H57-597	BD Biosciences
BV510 rat anti-mouse CD45, Clone: 30-F11	BD Biosciences
Purified rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc blocker), clone: 2.4G2	BD Biosciences
PE anti-mouse F4/80, clone 6F12 (IF 1:200)	BD Biosciences
Rabbit anti-ferroportin, MTP11A (IF 1:500, WB 1:1000)	Alpha Diagnostics, San Antonio, TX, USA
Rabbit anti-ferritin monoclonal, clone SC0620 (IF 1:500, WB 1:2000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG H+L (IF 1:200)	Thermo Fisher Scientific
Rabbit polyclonal anti-HIF2α (WB 1:1000)	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit anti-p62/SQSTM1 (WB 1:1000)	Sigma, St Louis, MO, USA
Rabbit anti-LC3 (WB 1:1000)	Sigma
APG5/ATG5 (0.37 mg/mL; WB 1:1000)	Abcam
Anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (WB 1:5000)	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Mouse anti-rabbit *β*-actin-HRP for normalization (WB 1:5000)	Sigma
Rabbit anti-mouse GAPDH (WB 1:4000)	Abcam

Figure 1

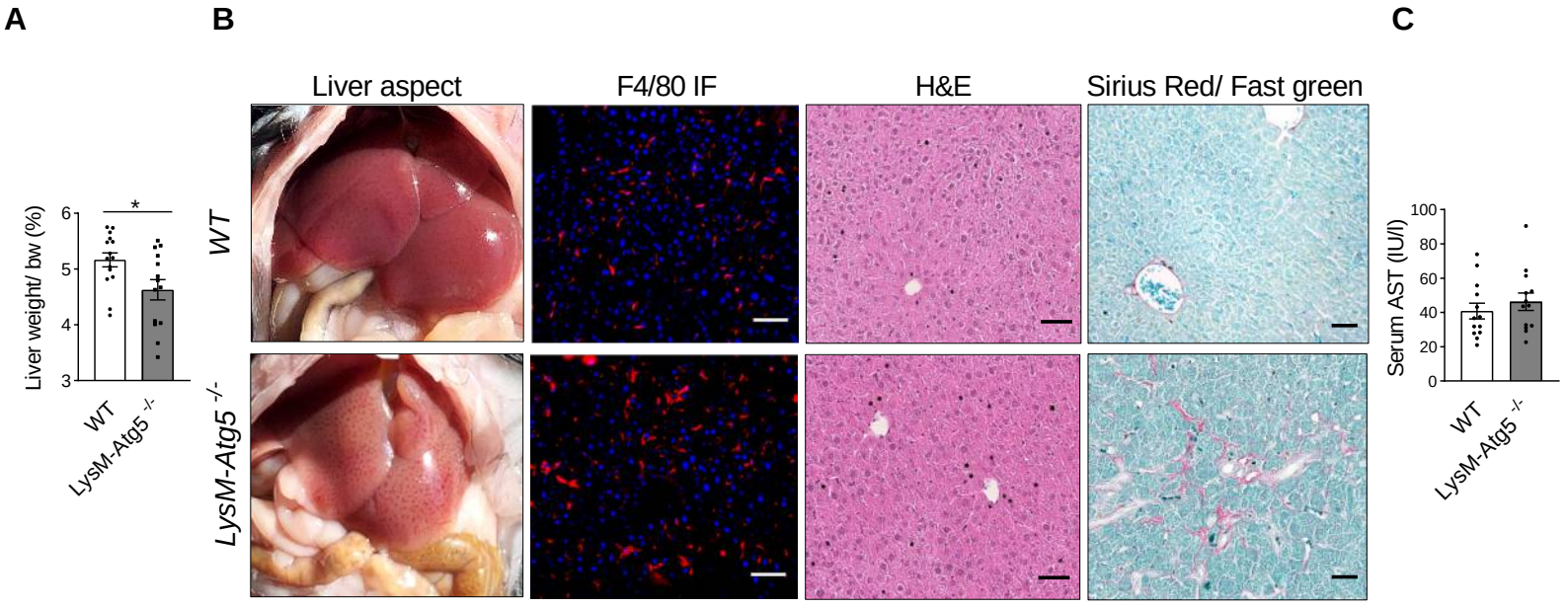

A
B
C
Liver aspect
F4/80 IF
H&E
Sirius Red/ Fast green
WT
LysM-Atg5 -/-
Liver weight/ bw (%)
6
5
4
3
*
WT
LysM-Atg5 -/-
Serum AST (IU/l)
100
80
60
40
20
0
WT
LysM-Atg5 -/-

Figure 2

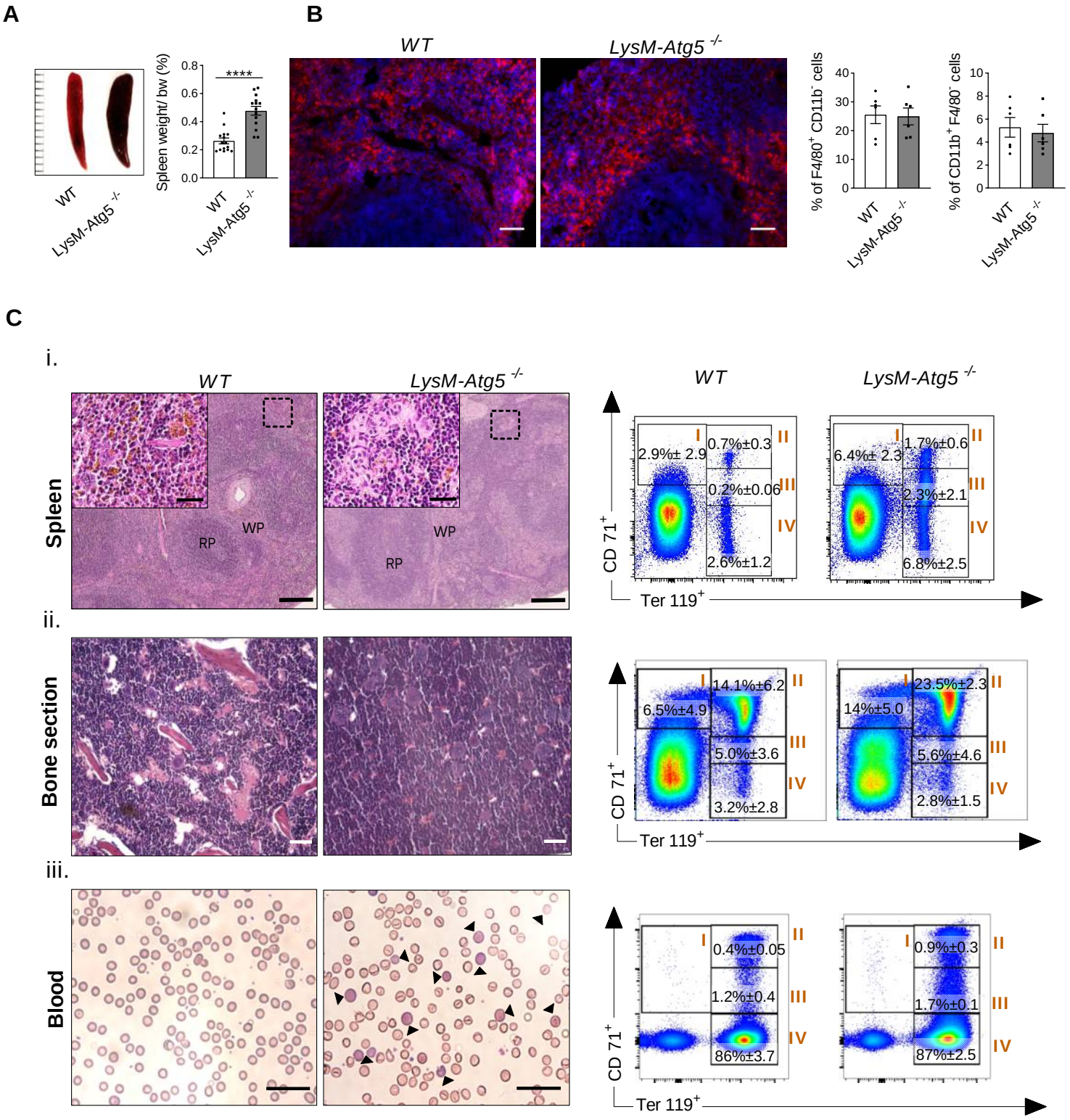

A
WT
LysM-Atg5 -/-
Spleen weight/ bw (%)
****
B
WT
LysM-Atg5 -/-
% of F4/80+ CD11b- cells
% of CD11b+ F4/80- cells
C
i.
Spleen
WP
RP
ii.
Bone section
iii.
Blood
CD 71+
Ter 119+
2.9%± 2.9
0.7%±0.3
0.2%±0.06
2.6%±1.2
6.4%± 2.3
1.7%±0.6
2.3%±2.1
6.8%±2.5
6.5%±4.9
14.1%±6.2
5.0%±3.6
3.2%±2.8
14%±5.0
23.5%±2.3
5.6%±4.6
2.8%±1.5
0.4%±0.05
1.2%±0.4
86%±3.7
0.9%±0.3
1.7%±0.1
87%±2.5

Figure 3

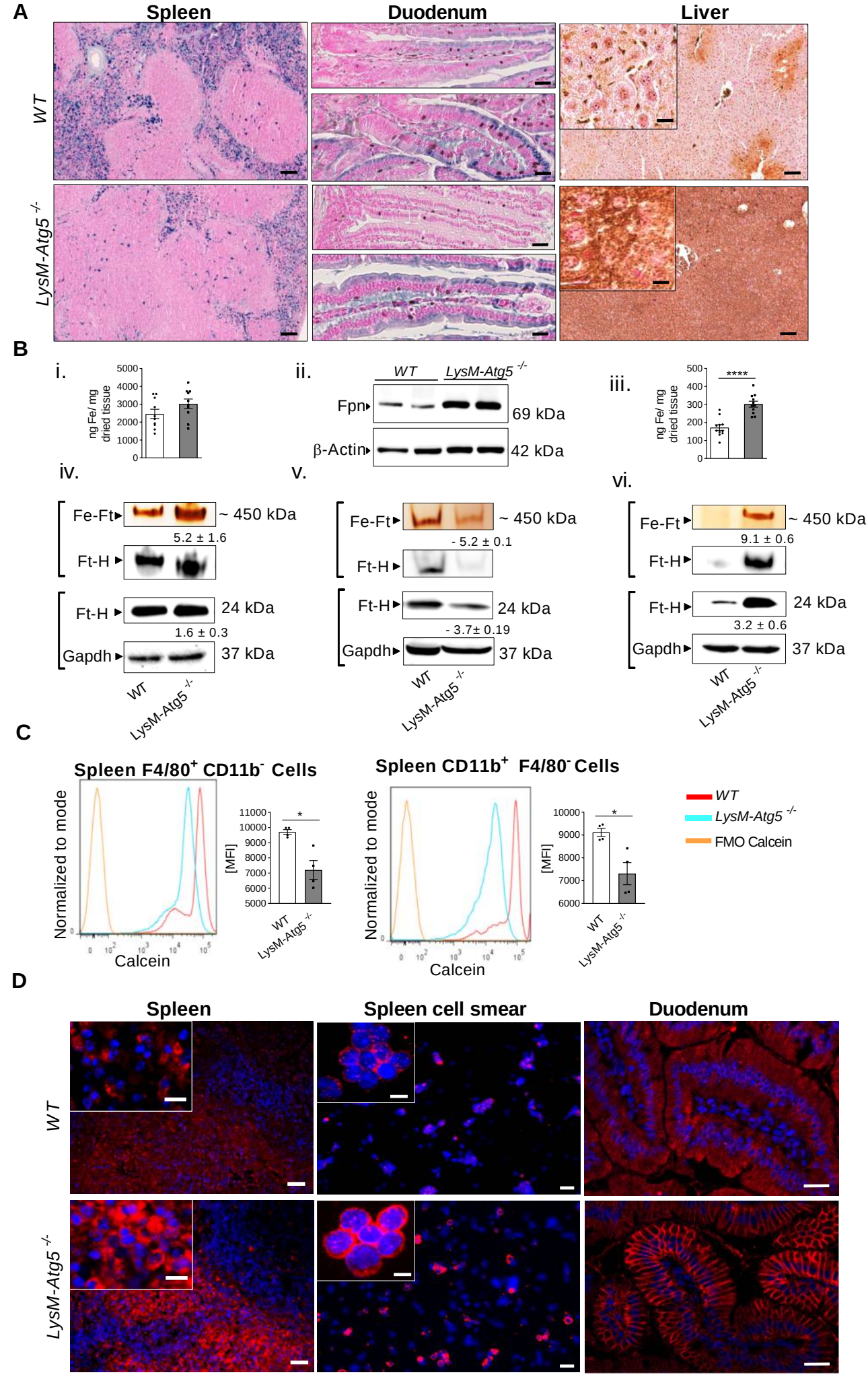

A
Spleen
Duodenum
Liver
WT
LysM-Atg5 -/-
B
i.
ng Fe/ mg dried tissue
5000
4000
3000
2000
1000
0
ii.
WT
LysM-Atg5 -/-
Fpn
69 kDa
β-Actin
42 kDa
iii.
****
ng Fe/ mg dried tissue
500
400
300
200
100
0
iv.
Fe-Ft
~ 450 kDa
5.2 ± 1.6
Ft-H
Ft-H
24 kDa
1.6 ± 0.3
Gapdh
37 kDa
WT
LysM-Atg5 -/-
v.
Fe-Ft
~ 450 kDa
- 5.2 ± 0.1
Ft-H
Ft-H
24 kDa
- 3.7± 0.19
Gapdh
37 kDa
WT
LysM-Atg5 -/-
vi.
Fe-Ft
~ 450 kDa
9.1 ± 0.6
Ft-H
Ft-H
24 kDa
3.2 ± 0.6
Gapdh
37 kDa
WT
LysM-Atg5 -/-
C
Spleen F4/80+ CD11b- Cells
Normalized to mode
Calcein
[MFI]
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
*
WT
LysM-Atg5 -/-
Spleen CD11b+ F4/80- Cells
Normalized to mode
Calcein
[MFI]
10000
9000
8000
7000
6000
*
WT
LysM-Atg5 -/-
WT
LysM-Atg5 -/-
FMO Calcein
D
Spleen
Spleen cell smear
Duodenum
WT
LysM-Atg5 -/-

Figure 4

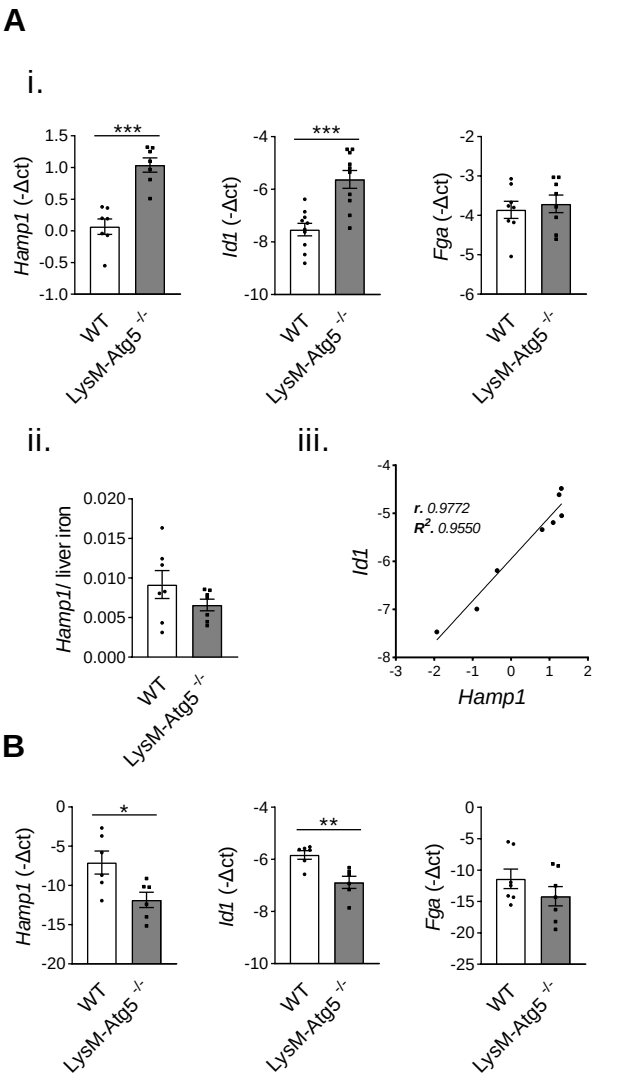
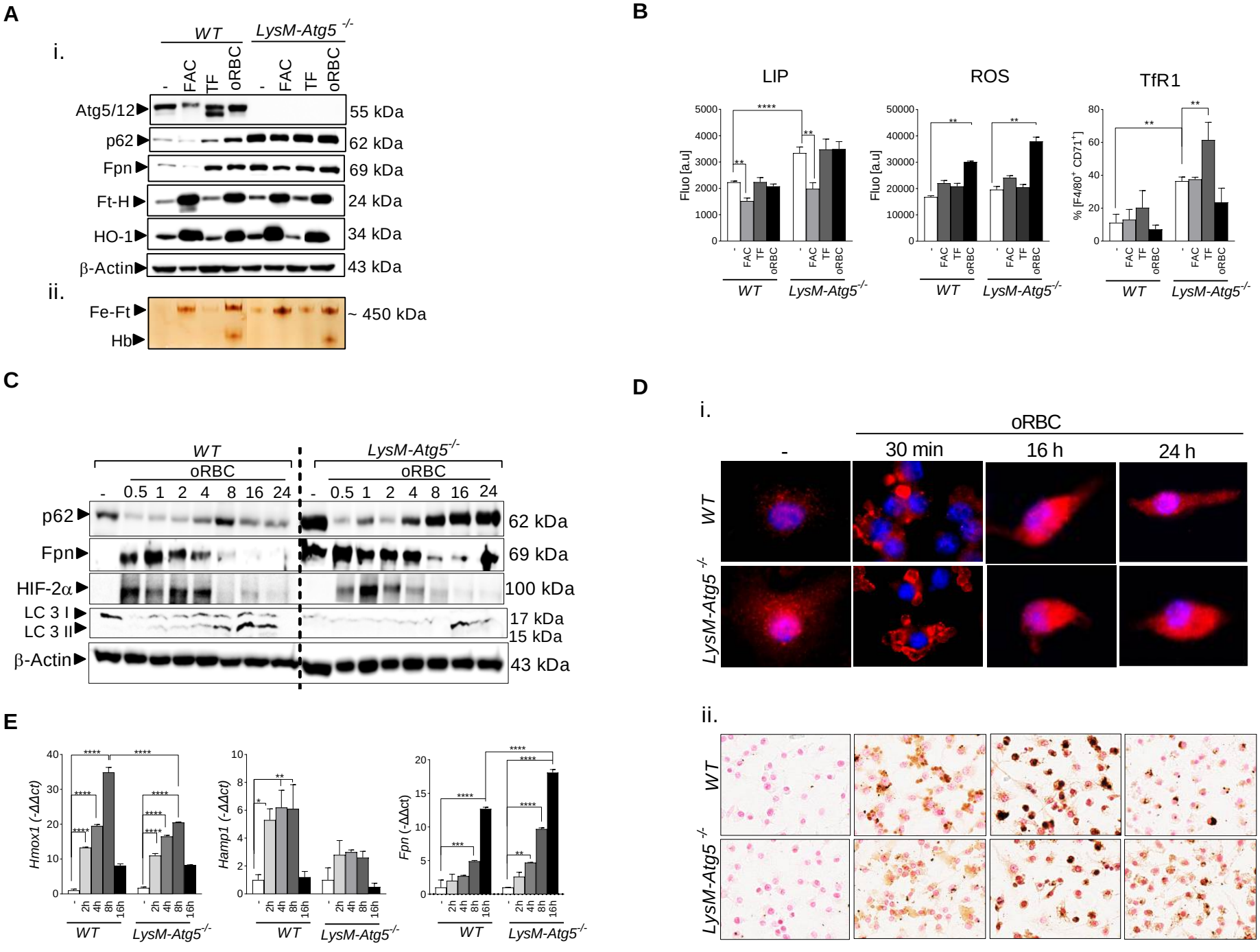
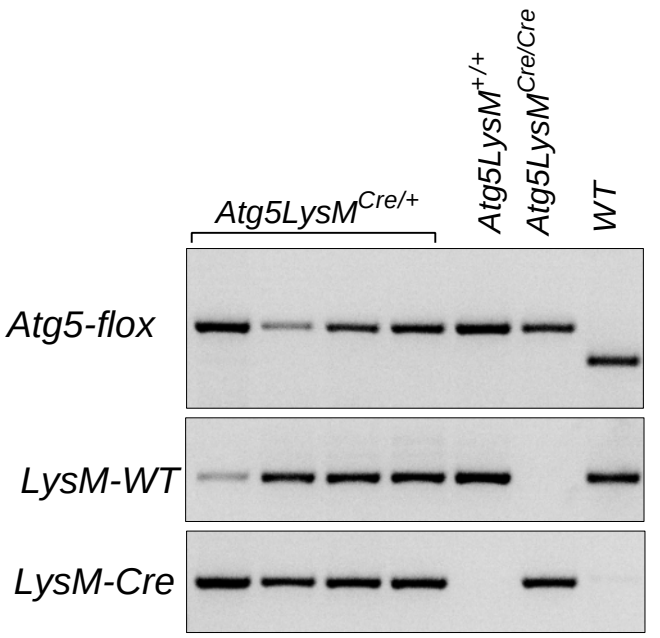

A
i.
Hamp1 (-Δct)
***
Id1 (-Δct)
***
Fga (-Δct)
WT
LysM-Atg5 -/-
ii.
Hamp1/ liver iron
iii.
Id1
r. 0.9772
R2. 0.9550
Hamp1
B
Hamp1 (-Δct)
*
Id1 (-Δct)
**
Fga (-Δct)

Figure 5

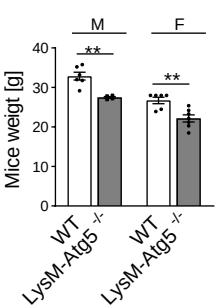

A
i.
WT
LysM-Atg5 -/-
- FAC TF oRBC - FAC TF oRBC
Atg5/12
p62
Fpn
Ft-H
HO-1
β-Actin
55 kDa
62 kDa
69 kDa
24 kDa
34 kDa
43 kDa
ii.
Fe-Ft
Hb
~ 450 kDa
B
LIP
ROS
TfR1
Fluo [a.u]
% [F4/80+ CD71+]
WT
LysM-Atg5-/-
C
WT
LysM-Atg5-/-
oRBC
- 0.5 1 2 4 8 16 24
p62
Fpn
HIF-2α
LC 3 I
LC 3 II
β-Actin
62 kDa
69 kDa
100 kDa
17 kDa
15 kDa
43 kDa
D
i.
oRBC
-
30 min
16 h
24 h
WT
LysM-Atg5 -/-
ii.
WT
LysM-Atg5 -/-
E
Hmox1 (-ΔΔct)
Hamp1 (-ΔΔct)
Fpn (-ΔΔct)
- 2h 4h 8h 16h
WT
LysM-Atg5-/-

Supplemental figure 1

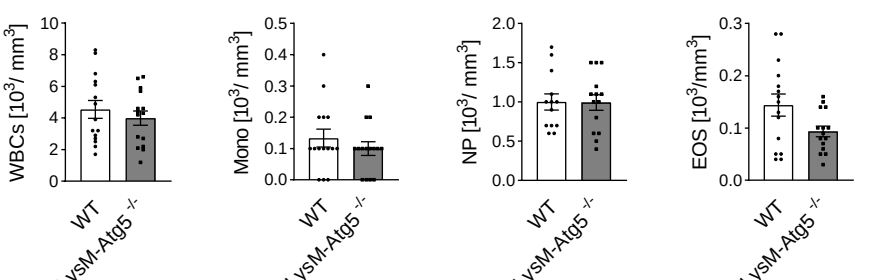
A



B

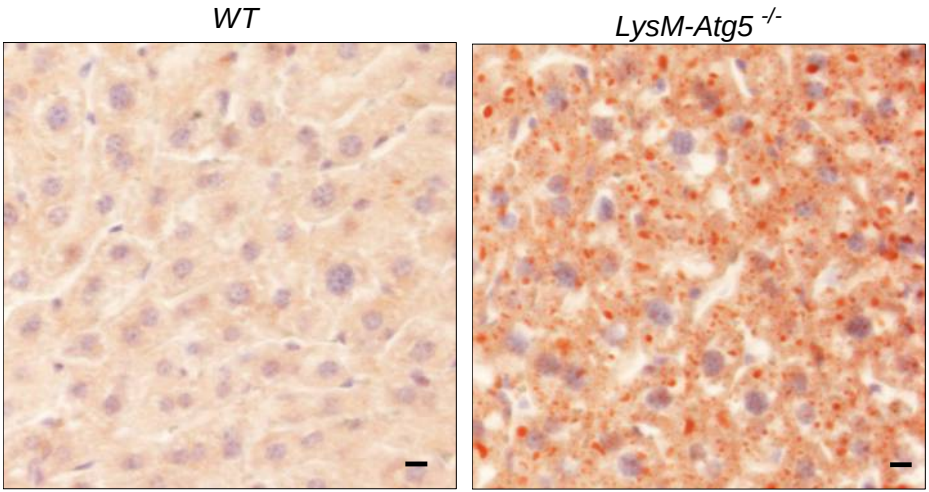


C

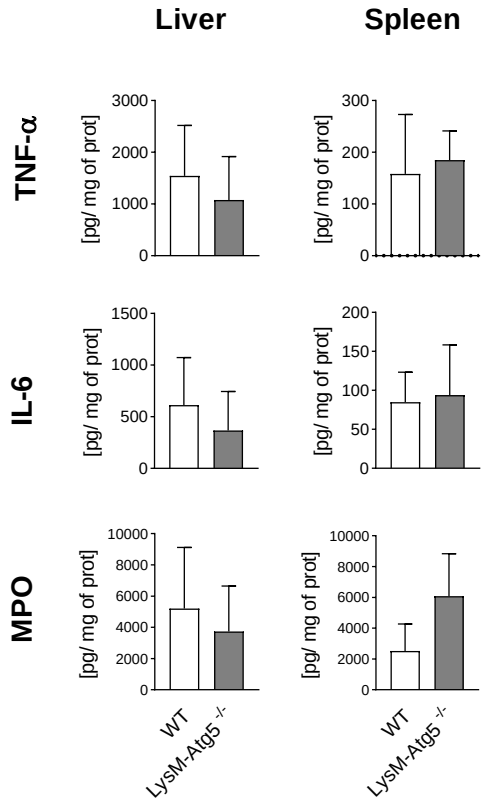


Supplemental figure 2

A

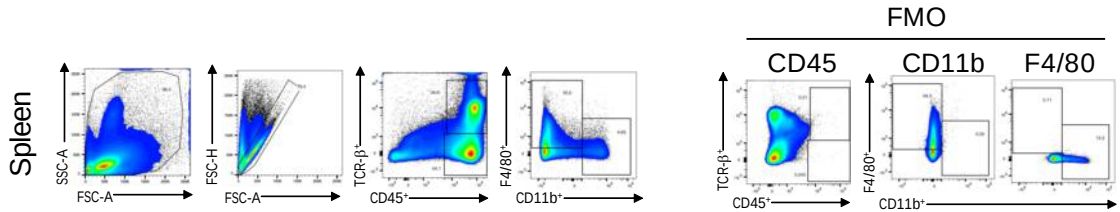


B

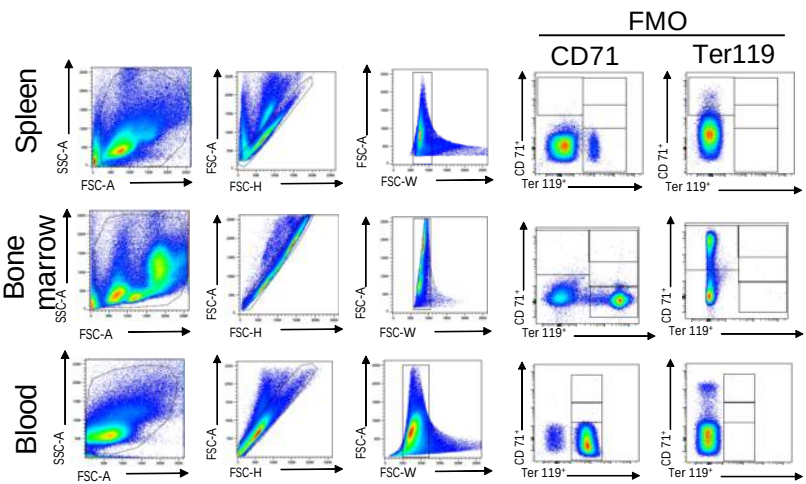


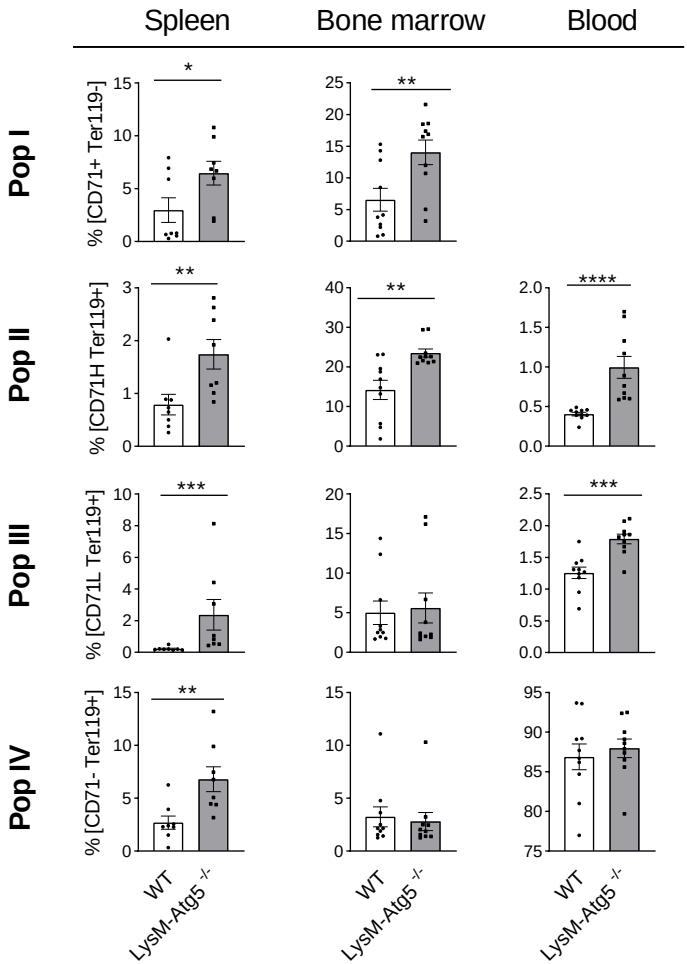
Supplemental figure 3

A

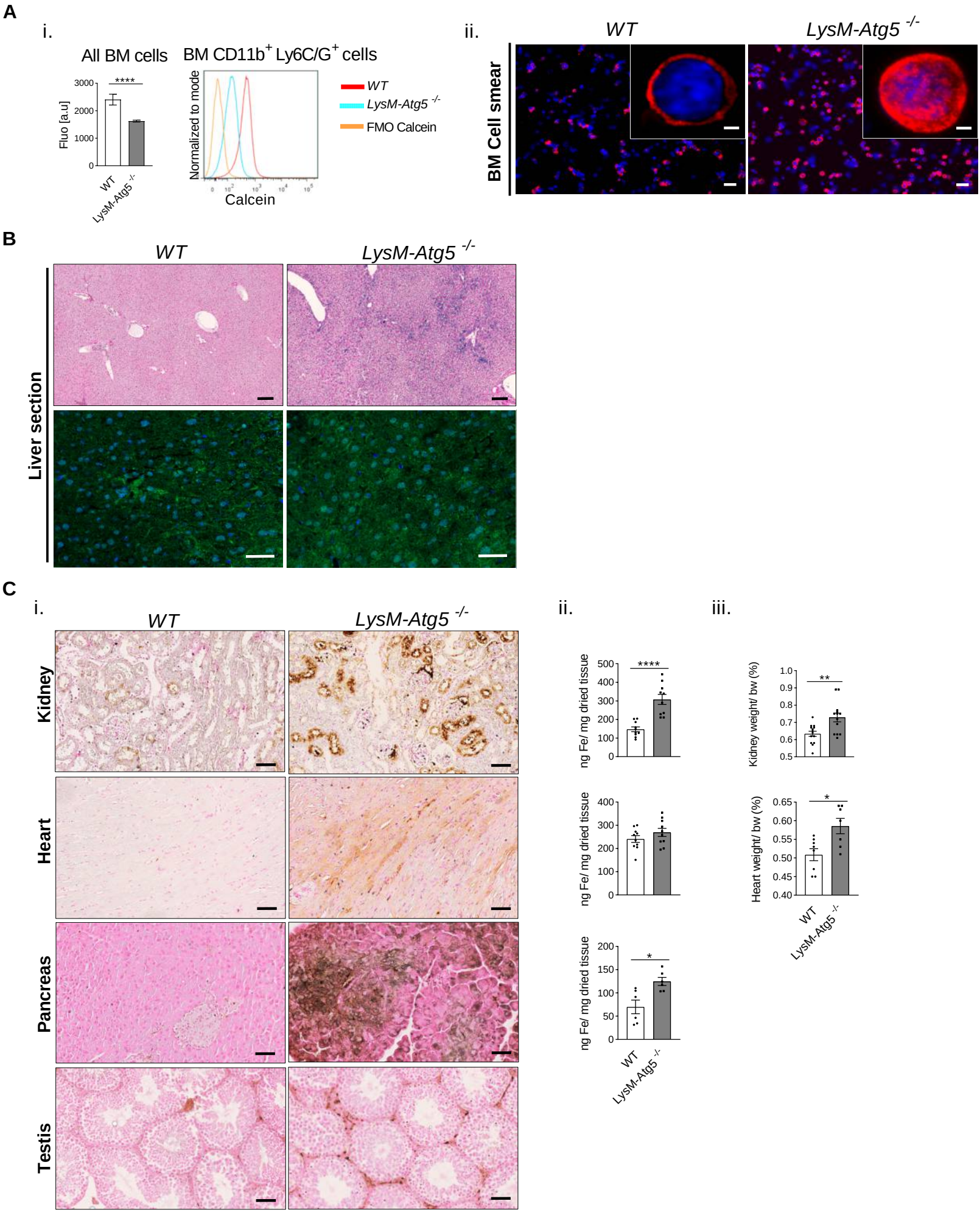


B

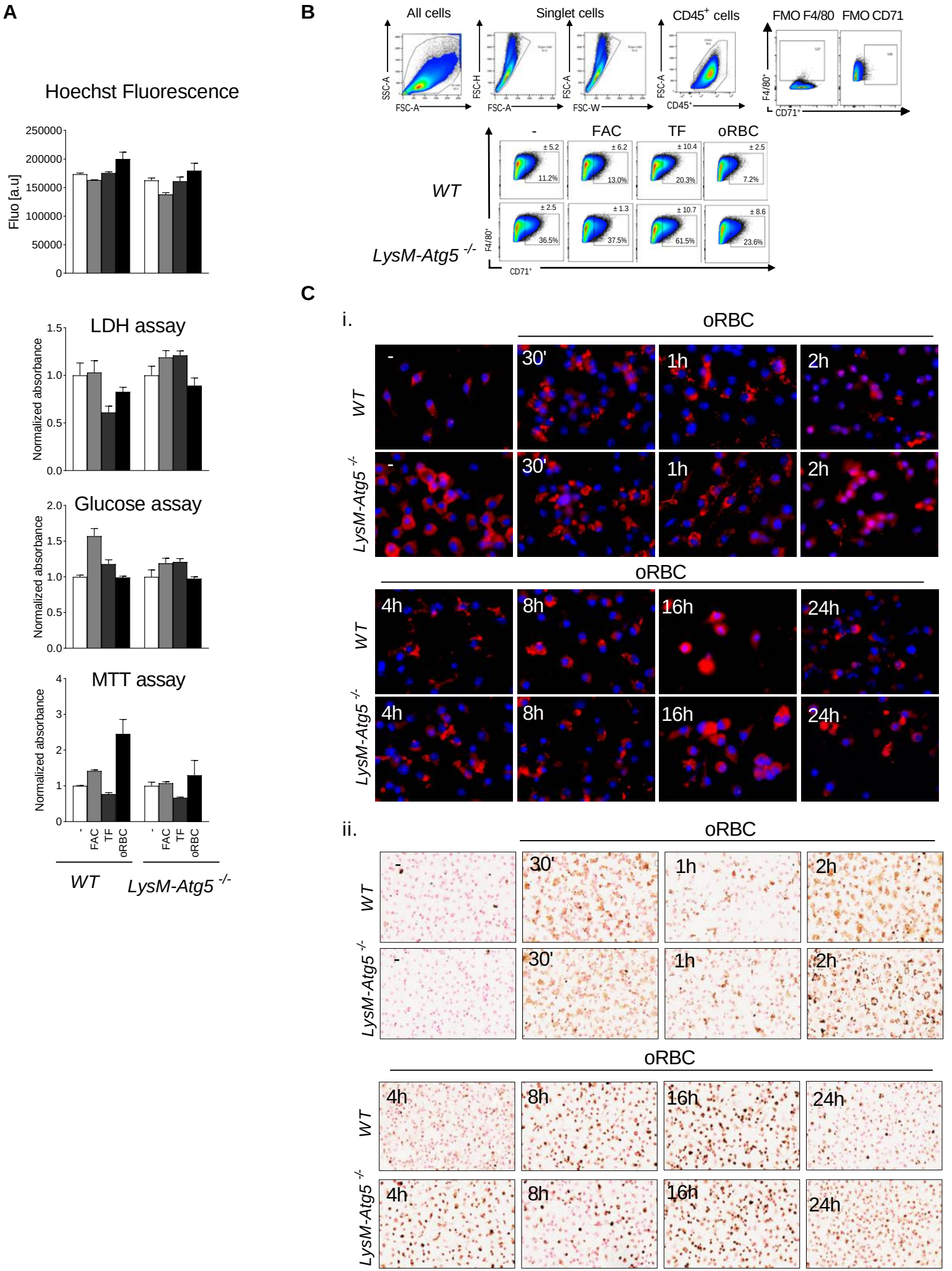




Supplemental figure 4



Supplemental figure 5



II. Étude de l'effet de fer sur l'immunomodulation des macrophages

Alors que les macrophages jouent un rôle central dans pratiquement tous les aspects de la réponse immunitaire, réponse immunitaire innée et initiation de l'immunité adaptative, les mécanismes moléculaires qui régulent leur phénotype sont multiples et ne sont pas encore entièrement compris. Les macrophages se caractérisent par leur forte hétérogénéité phénotypique et leur plasticité en réponse au microenvironnement en adoptant différents phénotypes. En effet, la reprogrammation du métabolisme intracellulaire en réponse aux signaux micro-environnementaux est nécessaire pour la polarisation et la fonction des macrophages M1/M2. Bien que le taux de fer soit un facteur environnemental important de l'inflammation, son impact sur la polarisation des macrophages et son rôle possible dans la modification ultérieure du microenvironnement inflammatoire ne sont pas complétement établis. La présente étude vise à élucider l'effet du fer sur la polarisation différentielle des macrophages *in vivo* et *in vitro*, ainsi que les interactions entre l'inflammation et l'homéostasie systémique du fer.

L'étude *in vivo* a été conduite sur des souris C57BL/6 soumises à différents régimes alimentaires en fer, standard (280 mg fer carbonyle/kg d'aliments), déficient (20 mg fer carbonyle/kg d'aliments) pendant 14 jours, et enrichie en fer (25g fer carbonyle/ kg d'aliments) pendant 3 jours ou *via* injection *i.p* systémique de fer dextran 48 heures avant nécropsie. Cette étude révèle que les deux voies de surcharges en fer, alimentaire ou systémique par injection *i.p,* est associée à une expression accrue des marqueurs de réponse immune de type 2, caractérisée par une augmentation de l'expression des transcrits de l'arginase1 *(Arg1)*, de la chitinase1 *(Ym1),* de l'interleukine 10 *(IL-10),* et du facteur de transcription caractéristique de la réponse 2 *(Stat6*) dans le foie et dans les macrophages péritonéaux. A l'inverse le régime carencé en fer conduit à la diminution de l'expression de ces marqueurs inflammatoires. Des conditions inflammatoires induites par l'endotoxine bactérienne LPS, indiquent que les variations des niveaux de fer *in vivo* influencent l'équilibre de la réponse immune de type1/type2. Une faible teneur en fer favorise l'expression des marqueurs pro-inflammatoires, tandis qu'une forte teneur en fer altère les marqueurs pro-inflammatoires au profit d'une dominance de marqueurs anti-inflammatoires.

Afin de mieux comprendre les modifications du profil inflammatoire induites par le fer *in vivo*, une étude *in vitro* sur macrophages dérivés de la moelle osseuse a été réalisée. Nos résultats révèlent que la surcharge en fer réduit le potentiel basal du profil des macrophages M1, illustré par une diminution de l'expression de leurs molécules caractéristiques, molécules de co-stimulation CD86 et complexe d'histocompatibilité 2, CMH-II. En conditions inflammatoire, la surcharge en fer des macrophages inhibe la réponse pro-inflammatoire induite par le LPS *via* une réduction de la translocation nucléaire de NF-κB p65 et une diminution de l'expression d'iNOS, IL-1β, IL-6, IL-12 et TNFα. De plus, la teneur élevée en fer intracellulaire entraîne une réduction de l'expression du transcrit de l'hepcidine, induite par le LPS et abolit la régulation à la baisse de la ferroportine dans les

macrophages. Ainsi, les niveaux de fer intracellulaires modulent l'issu de la réponse immunitaire opérant par des modifications de la polarisation macrophagique.

Prises ensemble, ces données indiquent que les concentrations intracellulaires de fer affectent le microenvironnement inflammatoire *in vivo* et *in vitro*, en partie en agissant sur l'immunomodulation interne des macrophages, et donc la réponse immunitaire impliquée. Des niveaux élevés de fer favorisant un phénotype M2 et de faibles niveaux un phénotype M1.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Cell iron status influences macrophage polarization

Rafiou Agoro[1,2¤], Meriem Taleb[1,2], Valerie F. J. Quesniaux[1,2], Catherine Mura[1,2]*

1 Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, Orléans, France,
2 University of Orléans, Orléans, France

¤ Current address: NYU College of Dentistry, New York, New York, United States of America
* catherine.mura@cnrs-orleans.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Agoro R, Taleb M, Quesniaux VFJ, Mura C (2018) Cell iron status influences macrophage polarization. PLoS ONE 13(5): e0196921. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921

Editor: Gernot Zissel, Universitatsklinikum Freiburg, GERMANY

Received: July 20, 2017

Accepted: April 23, 2018

Published: May 17, 2018

Copyright: © 2018 Agoro et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work received support from the European Regional Development Fund N° 2016-00110366; ec.europa.eu/regional_policy/en/funding/erdf/. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Macrophages play crucial roles in innate immune response and in the priming of adaptive immunity, and are characterized by their phenotypic heterogeneity and plasticity. Reprogramming intracellular metabolism in response to microenvironmental signals is required for M1/M2 macrophage polarization and function. Here we assessed the influence of iron on the polarization of the immune response *in vivo* and *in vitro*. Iron-enriched diet increased M2 marker *Arg1* and *Ym1* expression in liver and peritoneal macrophages, while iron deficiency decreased *Arg1* expression. Under LPS-induced inflammatory conditions, low iron diet exacerbated the proinflammatory response, while the IL-12/IL-10 balance decreased with iron-rich diet, thus polarizing toward type 2 response. Indeed, *in vitro* macrophage iron loading reduced the basal percentage of cells expressing M1 co-stimulatory CD86 and MHC-II molecules. Further, iron loading of macrophages prevented the pro-inflammatory response induced by LPS through reduction of NF-κB p65 nuclear translocation with decreased iNOS, IL-1β, IL-6, IL-12 and TNFα expression. The increase of intracellular iron also reduced LPS-induced *hepcidin* gene expression and abolished *ferroportin* down-regulation in macrophages, in line with macrophage polarization. Thus, iron modulates the inflammatory response outcome, as elevated iron levels increased M2 phenotype and negatively regulated M1 proinflammatory LPS-induced response.

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. Indeed, macrophage immune functions include pathogen recognition, antigen processing, inflammation, phagocytic clearance, immune regulation as well as resolution of immune responses and tissue repair [1]. Macrophages also play an essential role in iron homeostasis by recycling iron, a crucial transition metal for living organisms. Indeed, in mammals, most of the iron used for hemoglobin production is recycled after phagocytosis of senescent red blood cells by macrophages, with a limited intake of dietary iron absorbed through enterocytes. Clearly, interactions between iron homeostasis and immune functions of macrophages have been reported.

Systemic iron balance is maintained via hepcidin hormone and ferroportin cellular iron exporter [2–6] and macrophage polarization may affect their expression [7–9]. Indeed, *hepcidin 1* upregulation, controlled at the transcriptional level, is exacerbated by M1 polarization while *ferroportin* transcription is influenced by M2 polarisation [10, 11]. Conversely, several publications indicated a change in inflammatory response according to the iron status, but conflicting results have been reported [12–15]. Here, we questioned the influence of iron on macrophage polarization.

Macrophages represent a heterogeneous cell population with a dynamic spectrum of functional states from pro-inflammatory M1 to anti-inflammatory/immunoregulatory alternatively activated M2 macrophages, exhibiting marked differences in the gene expression signatures and effector functions [1, 16, 17]. Activated M1 macrophages stimulate type 1 T helper (Th1) adaptive responses, while alternatively activated M2 macrophages, which have been divided into several subsets depending on the differentiation/activation signals encountered, stimulate the Th2 adaptive response essential for humoral-mediated immunity, immunoregulatory and anti-inflammatory functionalities, pro-fibrotic and repair activities, parasite resistance and tumor promotion [1, 18]. Distinct functional phenotypes of macrophage M1 and M2 depend on a coordinated expression of various modulators promoting opposed functions. Indeed, M1 are characterized by high levels of IL-12 pro-inflammatory and low IL-10 anti-inflammatory cytokine expression (IL-12^{hi}/IL-10^{lo}), while M2 are IL-12^{lo}/IL-10^{hi}. M1 and M2 are also characterized by the expression of alternative L-arginine metabolizing enzyme activities, iNos and Arg1, respectively, producing NO and ornithine that correlate to either killing and repairing functions [1, 16, 17, 19–24]. The release of IFNγ, TNF-α, IL-1β, chemokines and proteases, together with production of reactive oxygen species (ROS) [1, 16, 17, 19–24]. is also a marked characteristic of M1, while M2 express other molecules including chitinase family proteins, and mannose receptor C-type 1 CD206 [16, 21–25]. Macrophage functions result from differential activation of transcription factors such as STAT, IRF, and NF-κB [17, 26–28] and metabolic status which contribute to the control of macrophage activation [29–31]. These pathways are activated by various stimuli, including pathogen associated molecular patterns (PAMPs), as well as endogenous cytokines, chemokines, nutrients and danger signals [32–34, 26]. The field of macrophage polarization expanded, both in terms of the range of inducing signals, which include tissue microenvironment and metabolites, and their resulting specificity and functional diversity [16, 19, 20, 35], and we addressed the role of iron, as a main cell growth factor, in macrophage polarization.

The couple hepcidin and ferroportin regulate systemic iron balance [2–6]. Hepcidin is mainly synthesized from hepatocytes and upregulated during iron overload through Bmp6-Smad1/5/8/4 pathway activation. Hepcidin is released in blood circulation and binds to the cellular iron exporter ferroportin, leading to its internalization and degradation [2, 6, 36, 37]. Thus, the systemic signal given by hepcidin decreases the transfer of iron from the enterocytes to the rest of the body by ferroportin and iron recycling from macrophages. Splenic macrophages and liver Kupffer cells contribute to erythrophagocytosis and influence the daily turn-over of iron by increasing *ferroportin* mRNA transcription [38, 39]. In isolated macrophages, while *hepcidin 1* gene is not upregulated by increased iron levels, the expression of *ferroportin* mRNA is upregulated upon iron cell loading and can be downregulated after addition of exogenous hepcidin [40, 41]. The expression of *hepcidin 1* and *ferroportin* genes is also altered upon inflammation. Liver and macrophage *hepcidin 1* expression is upregulated through Smad1/5/8/4 and Stat3 pathways in response to inflammation, while *ferroportin* transcription is downregulated at the transcriptional level, independently of hepcidin, both leading to hypoferremia [42–47].

Here we addressed the influence of iron on innate immune phenotype and macrophage polarization *in vivo* and *in vitro*, and we investigate the cross-talk between inflammation and iron balance regulation. We show that, while iron depletion reduces M2 markers, an iron-rich status promotes M2-like phenotype and reduces type 1 immune response markers, impairing LPS-induced pro-inflammatory cytokine expression, and this is accompanied by a differential regulation of *hepcidin 1* and *ferroportin* expression under inflammatory conditions.

Materials and methods

Ethics statement

All animal experimental protocols complied with the French ethical and animal experiments regulations (see Charte Nationale, Code Rural R 214–122, 214–124 and European Union Directive 86/609/EEC) and were approved by the "Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans" (CCO), registered (N°3) by the French National Committee of Ethical Reflexion for Animal Experimentation, under N° CLE CCO 2015–1085.

In vivo experiments

C57BL/6 wild-type mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) housed in the Transgenose Institute animal facility (TAAM, CNRS UPS44, Orleans) were fed with either iron-rich diet (25000 mg of iron carbonyl/kg) for 3 days, iron-deficient diet (less than 20 mg iron carbonyl/kg) for 14 days, or iron-replete diet as control diet (280 mg iron carbonyl/kg, R03 from Scientific Animal Food & Engineering; Augy, France). For some experiments mice received 0.2 g/kg of iron-dextran by peritoneal injection 48 hours before necropsy. Mice were observed daily and monitored for signs of distress including ruffled fur, immobility or hunching, and body weight loss. 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), and equivalent volume of sterile saline solution (0.9% NaCl) was used as vehicle control. After 4 hours, mice were bled under isoflurane anesthesia, then killed with carbon dioxide inhalation, liver and spleen removed, and peritoneal exudate cells harvested as a source of peritoneal macrophages.

Histology of iron staining

Liver and spleen tissues were fixed in 4% phosphate buffered formalin, paraffin-embedded, and 5 μm sections prepared. DAB-enhanced Perl's staining was performed on paraffin sections treated successively with 5% potassium ferrocyanide /4% HCl, 0.01M sodium azide /0.3% H_2O_2 in methanol, 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Sections were counterstained with Nuclear Fast Red (Sigma). Iron distribution was determined by light microscopy.

Measurement of hepatic iron content

Hepatic iron content (HIC) was measured from dried liver samples dissolved in nitric acid:sulfuric acid (1:1) at 90°C, then after adding 1 mL of H_2O_2, an equivalent volume of sample and 10 mM ferrozine / 32.6 mM ascorbic acid / 50 mM Tris HCl pH4 was incubated 30 min before reading at 560 nm. The values were expressed as ng of iron per mg of dry tissue.

Hematology and blood markers

Blood was obtained from retro-orbital plexus under isoflurane anesthesia. Serum iron and unbound iron binding capacity was measured by using ferrozine as described by Goodwin

et al. [48]. Transferrin saturation was calculated as follows: serum iron/ (serum iron + unbound iron binding capacity) × 100%. Red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), were measured from EDTA-plasma with MS9-5V Melet schloesing apparatus.

Cell culture

Bone marrow cells from C57BL/6 wild-type were isolated from femurs and differentiated into macrophages after culturing at 10^6 cells/ml for 10 days in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 mM glutamine, 25 mM Hepes, 100 U/ml penicillin and 100 μg/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 [49]. When indicated cells were treated with 100 ng/mL LPS (*E. coli* 055:B5), ferric ammonium citrate (FAC, 10, 50 or 100 μM, Sigma-Aldrich), IFN-γ (100 U/mL) or IL-4 (10 ng/mL, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA). Cell viability was assessed by cell membrane exclusion of 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) dye binding to DNA, followed by viable/dead cells analysis by flow cytometry (488/650 nm).

Labile cell iron and reactive oxygen species measurement

Labile cell iron and intracellular ROS were measured by using calcein acetoxymethyl (calcein-AM) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA), respectively. Bone marrow-derived macrophages plated in 96-well microplate (OptiPlate, PerkinElmer-Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) overnight were washed with PBS and incubated either 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 incubated with ferric ammonium citrate (FAC, Sigma-Aldrich) as indicated and fluorescence intensity was measured using fluorescent plate reader (Clariostar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). For calcein data are given as the delta (Δ) of the fluorescence to initial fluorescence.

NF-κB staining by immunofluorescence analysis

Bone marrow derived macrophages (BMDM) plated on slides were incubated with or without FAC (Sigma-Aldrich) overnight followed by LPS for 30 min. BMDM were then fixed with paraformaldehyde 4% (Sigma Aldrich) for 10 minutes and, after blocking with Tris 1M pH7.6/NaCl 0.73M containing 10% FCS (HyClone), 1% BSA (Eurobio, Courtaboeuf, France) and 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 45 minutes, were incubated with the anti-NF-κB p65 antibody (R&D systems Inc) overnight at 4˚C. Subsequently, cells were washed with Tris 1M pH7.6/NaCl 0.73M and incubated with the secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (abcam Cambridge, UK) for 2 hours and counterstained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI, Sigma Aldrich). Cells were washed and photographs were acquired using Axio OBSERVER Z1 microscope plan-Apochromat 63x/1,40 Oil (Carl ZEISS, Oberkochen, Germany) and analyzed with ImageJ software.

Cytokine determination in cell culture medium

After stimulation, cell supernatants were harvested to quantify IL-12p40, IL-1β, IL-6 and TNF-α concentrations using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; Duoset, R&D).

Nitric oxide production

The production of nitric oxide (NO) was measured in culture supernatants by colorimetric Griess assay for nitrites/nitrates [50]. An equal volume of culture supernatant sample and Griess reagent 0.5% sulfanilamide / 0.05% N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride / 2.5% phosphoric acid) (all chemicals were from Sigma-Aldrich) was mixed and incubated for 30 min. A standard curve was established with $NaNO_2$ and absorbance was measured at 562 nm.

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. Cells were washed and stained with 7-aminoactinomycin D (7-AAD), anti-CD86 PE (BD 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). Cells were then detached with cold PBS and analyzed by flow cytometry.

Quantitative PCR analysis

Total RNA from liver and spleen homogenates or cells was isolated using TRI Reagent (Sigma-Aldrich) and reverse transcription was performed with Promega synthesis system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed with QuantiTect SYBR Green PCR system (Qiagen, Hilden, Germany) on Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) by using *hepcidin 1* forward and reverse primers: `5′-CCTATCTCCATCAACAGATG-3′` and `5′-TGCAACAGATACCACAC TG-3′`, *ferroportin* forward and reverse primers: `5′-CTCTGTCAGCCTGCTGTTTG-3′` and `5′-TCAGGATTTGGGGCCAAGATG -3′`, other primers were Quantitect primers (Qiagen, Hilden, Germany). The mRNA levels were normalized to the housekeeping gene *Gapdh* in the same RT sample and relative transcript expression of genes was given as $\Delta Ct = C_{t\ target} - C_{t\ Gapdh}$. Fold change of genes expression compared with untreated mice was determined as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values ($\Delta\Delta Ct = \Delta C_{t\ treated} - \Delta C_{t\ control}$).

Statistical analysis

Student's *t*-test and one-way Anova test were used to determine the significance of the data by using GraphPrism software (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). 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 wild type C57BL/6 mice received specific iron-containing diet to induce either dietary iron loading or dietary iron deficiency. These diets had little effect on the overall body weight and relative liver weights (Fig 1A). Liver gene expression of *hepcidin* anti-microbial peptide (*Hamp1)* and bone morphogenic protein (*Bmp6*), the key iron-responsive inducer of *Hamp1* transcription, were then assessed to confirm the change of iron metabolism parameters induced by the specific diets. As expected, *Hamp1* and *Bmp6* mRNA expression in liver homogenates was increased with iron-rich diet and decreased with iron-deficient diet (Fig 1B), confirming their value as biomarkers of iron status. We next determined whether the modification of dietary iron and liver iron genes level was correlated with markers of immune

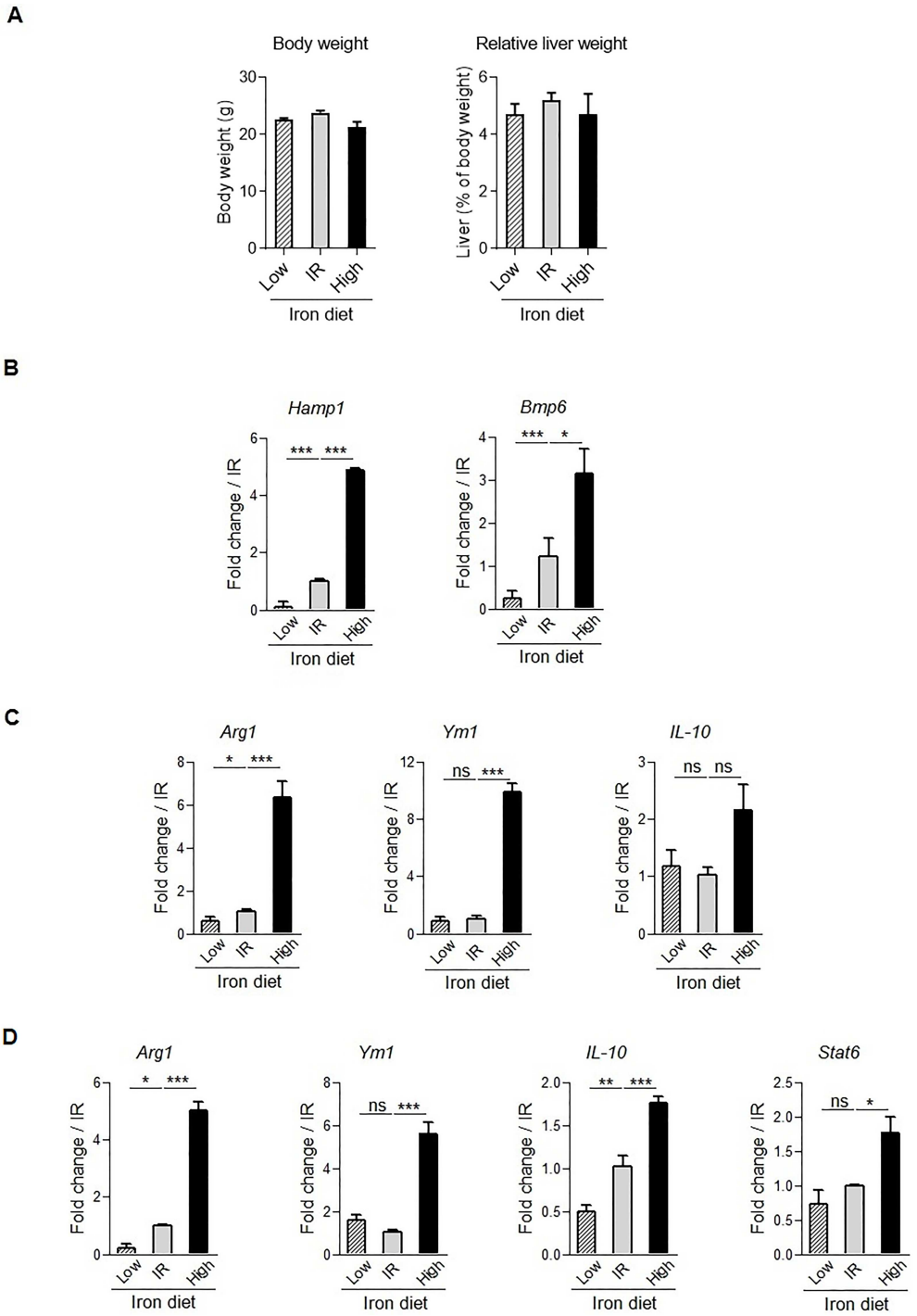


Fig 1. Association of iron status and immune response marker expression in liver and peritoneal macrophages. C57BL/6 wild type mice were fed with iron replete diet (IR), deficient diet for 14 days (Low) or iron-rich diet for 3 days (High). (**A**) Body weight and relative liver weights are indicated. Liver homogenates **(B, C),** and peritoneal macrophages (**D**) gene expression was then analyzed using quantitative PCR analysis. Data are expressed as mRNA fold change relative to control mice fed with IR diet. Data are from two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 6 mice per group). ns, non significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g001

response. Interestingly, in liver the expression of type 2 immune response markers *Arginase 1* (*Arg1*) and *Chitinase-like 3 (Ym1)* was increased after high iron diet correlating with a trend of increase expression of *IL-10* anti-inflammatory cytokine (Fig 1C). Conversely, after low iron diet liver *Arg1* was reduced. Since hepatocytes express Arg1 [51] we further assessed the impact of iron status on macrophages in the peritoneum compartment. Peritoneal macrophages were isolated from mice receiving iron-rich or iron-deficient diet. Indeed, the gene expression of *Arg1*, *Ym1*, *IL-10* and *Stat6*, a series of genes expressed in M2 polarized macrophages, was increased after high iron diet condition, and, conversely, the expression of *Arg1* and *IL-10* was significantly decreased after dietary iron deficiency (Fig 1D). Thus, *in vivo* dietary-induced modifications of iron levels influence the expression of type 2 immune response markers.

We documented the iron loading induced by feeding with a high iron-containing diet (25 g/kg) for 3 days and compared it with a systemic injection of iron-dextran (0.2 g/kg). Although overall body weight were barely affected liver relative weight, and furthermore spleen relative weight were increased after iron-dextran treatment (Fig 2A). Iron-dextran intraperitoneal injection resulted at 48h in high iron deposition in liver, including hepatocytes and macrophages, in spleen red pulp, and in cells from peritoneal exudates (Fig 2B), associated with 120-fold increased hepatic iron concentration (HIC) and elevated transferrin saturation (Table 1). The digestive route of iron loading resulted mainly in iron deposition in periportal hepatocytes (Fig 2B), and was associated with a more moderate increase in hepatic iron content and transferrin saturation (Table 1), as compared to control mice fed with iron-replete diet (IR). Spleen iron staining was equivalent for both conditions, with no iron staining of peritoneal cells (Fig 2B). The level of *hepcidin 1* gene upregulation was similarly increased in the liver of mice fed with iron-rich diet or injected with iron-dextran. *Hepcidin 1* gene expression was not altered in spleen and peritoneal cells in response to either iron treatments (Fig 2C). The expression of *ferritin L* gene, encoding the predominant subunit of ferritin in liver and spleen [52], was increased in liver under both iron overload conditions, while it was strongly enhanced in spleen and peritoneal cells after iron-dextran systemic injection, but was not affected after iron rich diet regimen (Fig 2C). The transcription of *ferritin L* gene is induced in response to oxidative challenge [53, 54] independently of iron level. Here, *ferritin L* gene overexpression was indicative of an increased ROS formation in correlation with tissue iron level. In blood, transferrin saturation percentage was increased under both iron overload conditions, whereas serum iron concentration was highly increased after iron-dextran injection and less so after iron-rich diet, as compared to mice fed with iron-replete diet (Table 1). Erythrocyte markers, including red blood cell counts, mean corpuscular volume, and hemoglobin were not affected by either iron overload conditions, but hematocrit tended to increase in iron loaded mice (Table 1). Thus, both iron-rich diet and iron-dextran injection led to liver iron overload and *hepcidin 1* upregulation, while iron-dextran also lead to systemic elevated iron deposits in spleen and peritoneal cells.

We next further characterized how iron overloading influenced markers of immune response. Hence, the gene expression of a series of markers expressed in M2 (*Arginase-1*, *Chitinase-like 3*, mannose receptor) or M1 (*iNos*) polarized macrophages was assessed in liver, spleen and peritoneal macrophages. Interestingly, in mice fed with high iron diet the expression of type 2 immune response markers *Arginase-1* (*Arg1*) and *Chitinase-like 3 (Ym1)* was increased in liver (Fig 3A), spleen (Fig 3B) and peritoneal macrophages (Fig 3C), yet *Mrc* was not affected and *iNos* expression did not change significantly after iron rich diet in liver and spleen, but increased in peritoneal macrophages (Fig 3A). In mice injected with iron dextran, *Arg1*, *Ym1*, mannose receptor (CD206) as well *iNos* expression was enhanced in liver homogenate, spleen and peritoneal macrophages (Fig 3A, 3B and 3C). Thus, *in vivo* high iron levels influence the expression of both type 1 and type 2 immune response markers.

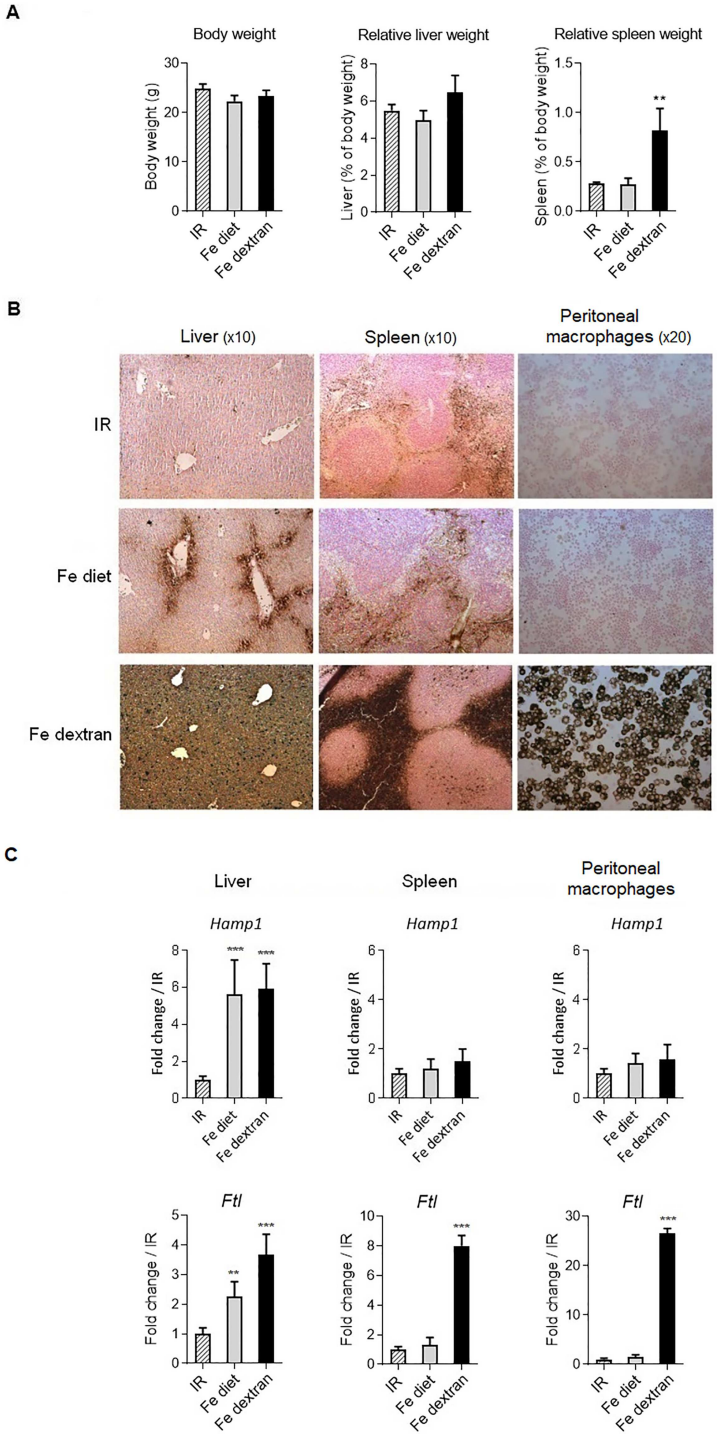


Fig 2. Iron status in liver, spleen and peritoneal macrophages. C57BL/6 wild type mice were fed with iron replete diet (IR), or iron-rich diet for 3 days (Fe diet) or received an injection of iron-dextran (Fe-dextran, 0.2 g/kg ip) for 48h. (**A**) Body weight, relative liver and spleen weights are indicated. (**B**) Representative DAB-enhanced Perl's staining of liver, spleen, and peritoneal exudate cells spin show iron deposit (in brown). (**C**) *Hepcidin 1 (Hamp1)* and *ferritin L* (*Ftl*) gene expression in liver tissue homogenates, spleen and peritoneal cells was analyzed using quantitative PCR. Data are expressed as mRNA fold change relative to control mice fed with IR diet. Data are from two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 6 mice per group). ns, non significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g002

Table 1. For each group of mice hepatic iron content and iron blood parameters, including serum iron and percentage of transferrin saturation, as well as red blood cell counts (RBC), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (Ht) and hemoglobin (Hb) are indicated. Data are from two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 6 mice per group).

Parameters	IR	Fe diet	Fe dextran
Iron			
HIC (ng Fe/mg dried tissue)	183.46 ±23.32	259.86 ±46.67	22681.22 ±9288.3 ***
SI (μg Fe/dL)	108.42 ±20	177.86 ±19.26	340.50 ±67.76 ***
Transferrin saturation (%)	47.45 ±4.50	76.73 ±7.22 **	77.87 ±15.20 **
Erythrocytes			
RBC (10^6/μL)	8.55 ±1.84	9.36 ±0.9	9.44 ±0.68
MCV (fl)	49.44 ±8.6	46.8 ±1.45	49.8 ±2.87
Ht (%)	40.95 ±5.57	43.72 ±3.69	46.8 ±1.62
Hb (g/dL)	13.3 ±0.77	13.84 ±0.77	14.7 ±0.67

* $p \leq 0.05$.

** $p \leq 0.01$.

*** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.t001

Iron status influences the IL-12/IL-10 axis balance during endotoxin-induced inflammation in peritoneal macrophages

Our results suggested that *in vivo* diet-induced iron status impacted immune polarization. We next hypothesized that changes of iron status could alter the inflammation process in macrophages. We thus assessed the effect of iron diet on lipopolysaccharide (LPS)-induced pro-inflammatory response in peritoneal macrophages. Adult C57BL/6 mice fed with high or low iron diet were treated with a sublethal concentration of LPS (50 μg/kg) or vehicle for 4 hours and cytokine gene expression in peritoneal cells was determined. In naïve cells from mice fed with either high or low iron diet *Il-12* and *Il-1β* gene expression were not affected as compared to iron replete, while *Il-10* was influenced by the iron diet (Fig 4A). In response to LPS treatment, the expression of *Il-12*, *Il-10* and *Il-1β* was clearly modulated by the iron status (Fig 4A). Iron deficiency promoted LPS-induced *Il-12* gene expression and decreased *Il-10* gene expression in response to LPS, while *Il-1β* was significantly reduced after iron supplementation (Fig 4A). *In vivo* extreme iron loading after iron-dextran injection yielded a decrease in *Il-1β* and *Il-10* (Fig 4B). Thus, *in vivo* iron status modulates the immune responses, dietary iron deficiency exacerbated pro-inflammatory effects of endotoxin whereas dietary iron loading decreased some inflammatory responses such as Il-1β expression.

Macrophages iron loading impairs IFN-γ-induced M1 polarization

To further assess the influence of iron loading on macrophage polarization, we next determined the profile of macrophages in response to cellular iron loading by using bone marrow derived macrophages incubated with ferric ammonium citrate (FAC). We first verified cell viability in response to iron loading, and showed that the FAC concentrations of 50–100 μM used in this study did not influence cell viability (Fig 5A). We then confirmed that increasing the concentration of ferric ammonium citrate in culture medium correlated with increased intracellular iron using calcein fluorescence quenching method (Fig 5B). Further, the increase of intracellular reactive oxygen species was determined using the general oxidative stress indicator 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA). The increase in intracellular iron was correlated with an increase of reactive oxygen species, which was significantly induced

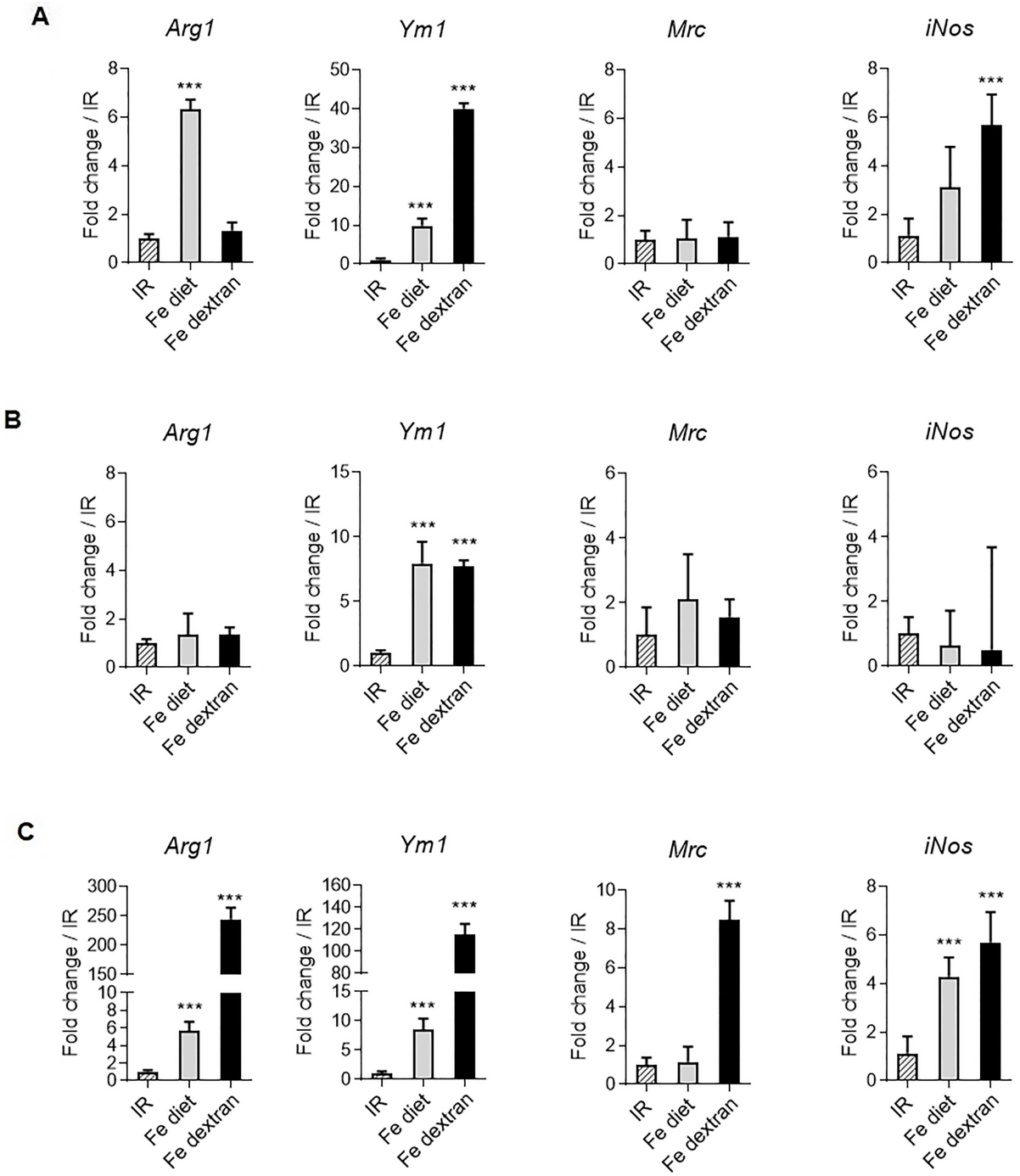


Fig 3. Expression of macrophage polarization markers upon iron overload in liver, spleen and peritoneal macrophages. C57BL/6 wild type mice were fed with iron replete diet (IR), or iron-rich diet for 3 days (Fe diet) or received an injection of iron-dextran (Fe-dextran, 0.2 g/kg ip) for 48h. Liver homogenates (**A**), spleen (**B**) and peritoneal exudate macrophages (**C**) gene expression of macrophage polarization marker *Arginase-1 (Arg1)*, *Chitinase-like 3 (Ym1)*, CD206 mannose receptor (*Mrc*) or *iNos* was analyzed using quantitative PCR analysis. Data are expressed as mRNA fold change relative to control mice fed with IR diet. Data are from two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 6 mice per group). ns, non significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g003

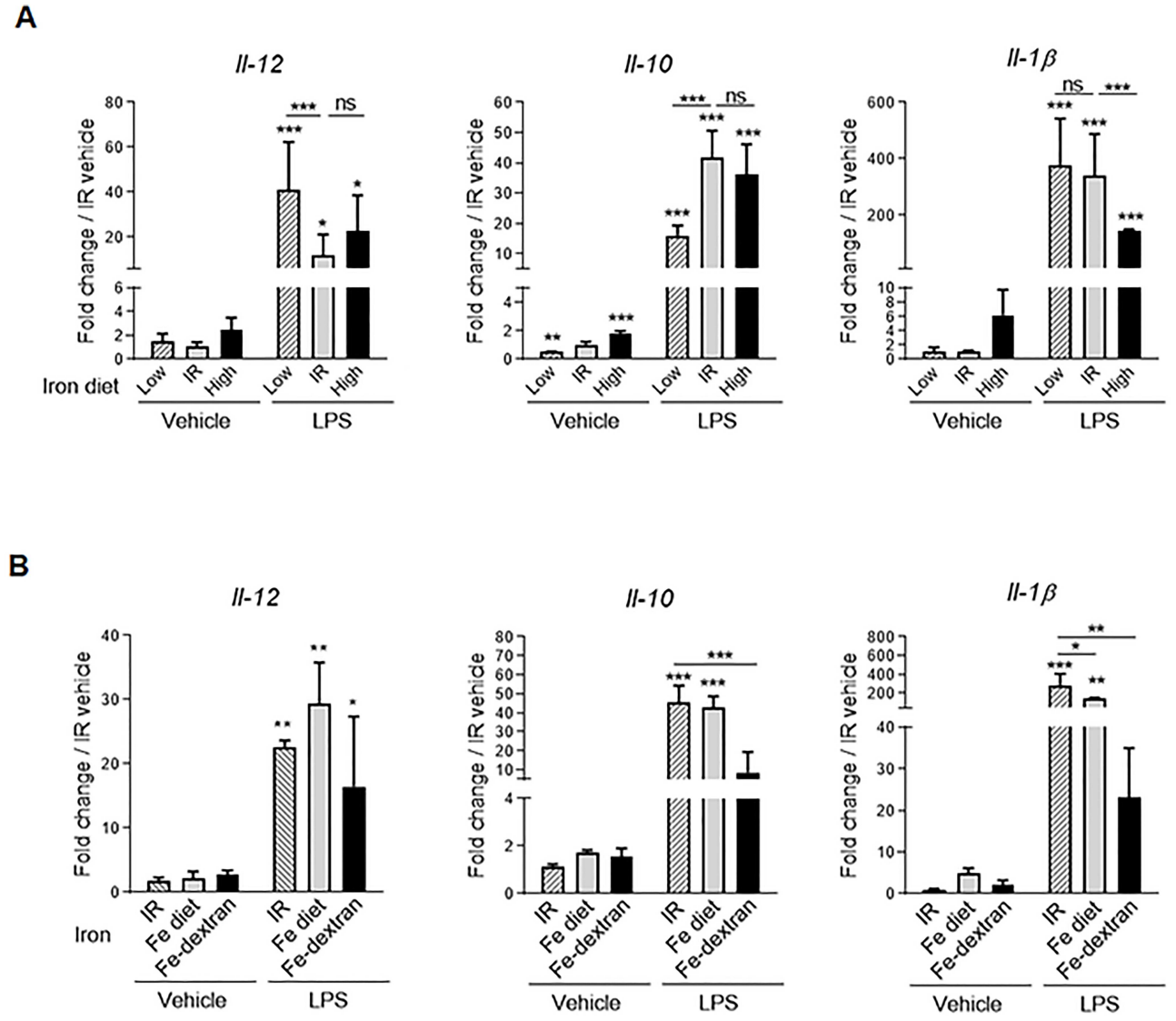


Fig 4. Iron deficiency increases LPS-induced IL-12/IL-10 balance *in vivo*. C57BL/6 wild type mice were either fed with iron replete diet (IR) or iron-deficient diet for 14 days (Low) or iron-rich diet for 3 days (High), or treated with iron-dextran (Fe-dextran, 0.2 g/kg ip) for 48h. Mice were then treated with LPS (i.p 50 μg/kg) or NaCl 0.9% as vehicle for 4 h. Peritoneal cells were collected to assess the *Il-12*, *Il-10*, and *Il-1β* gene expression using quantitative PCR. (A) data from mice fed with various diets and (B) comparison of mice fed with high iron diet or treated with iron-dextran. Data are expressed as mRNA fold change relative to vehicle control mice under IR diet. Gene expression was then analyzed using quantitative PCR analysis. Data are expressed as mRNA fold change relative to control mice fed with IR diet. Data are from two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 6 mice per group). ns, non significant; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g004

after 16 hours of incubation with ferric ammonium citrate (Fig 5B). Thereafter, we determined macrophage polarization based on cell surface expression of the CD86 co-stimulatory molecules and I-A/I-E MHC class II molecules, versus CD206 mannose receptor, as markers highly expressed on M1 and M2 polarized macrophages, respectively. BMDM were gated on 7-AAD$^-$, F4/80$^+$ cells and analysed by flow cytometry for the membrane expression of CD86, I-A/I-E, and CD206. Interestingly, 24 hours of incubation with ferric ammonium citrate alone decreased CD86$^+$ and I-A/I-E$^+$ cells within the F4/80$^+$ population (Fig 5C), suggesting that cell iron loading decreased the basal constitutive expression of these molecules. IFN-γ-induced

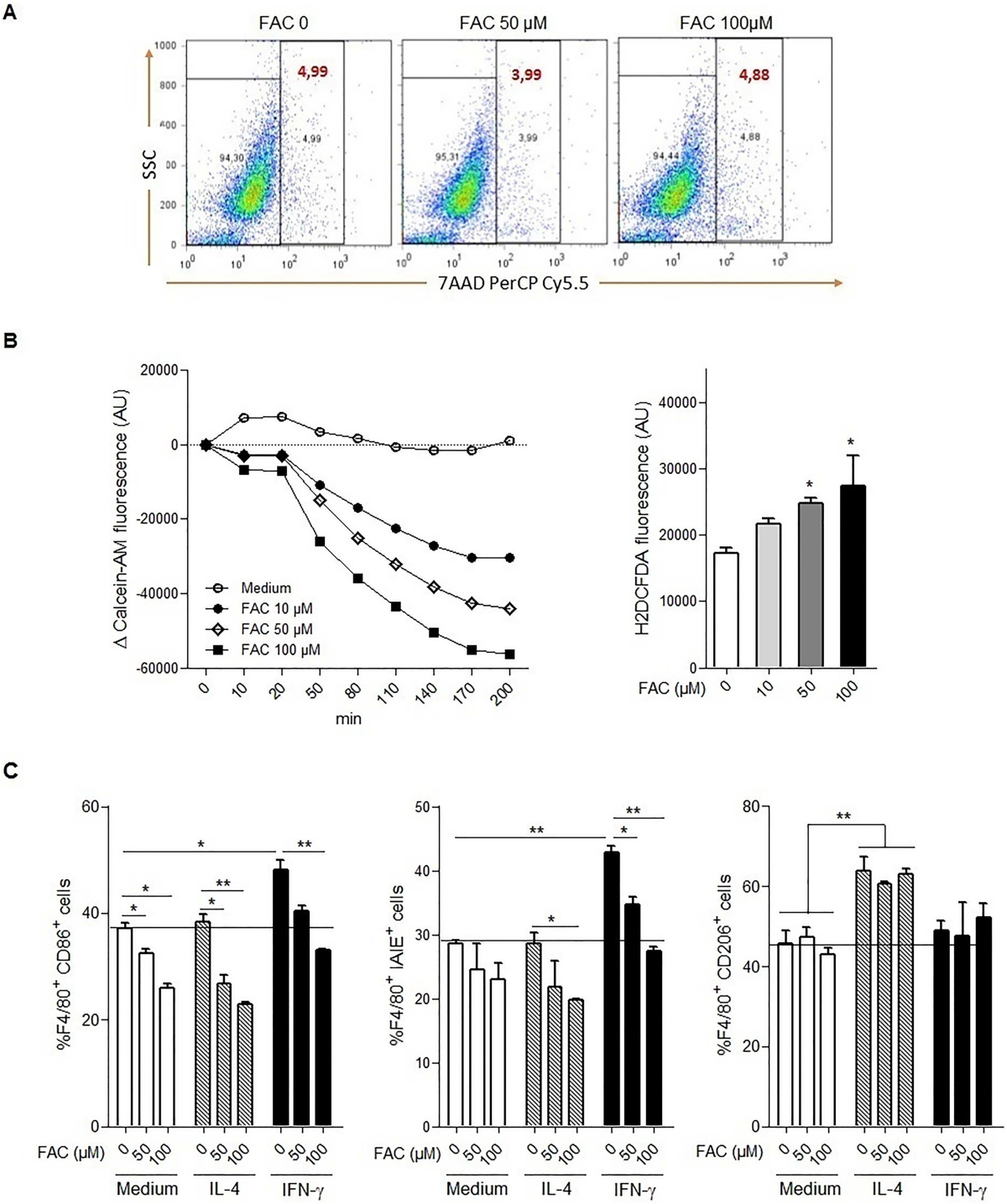


Fig 5. Iron loaded macrophages express constitutive M1 cell surface markers *in vitro*. **A**: Bone marrow-derived macrophages incubated in 6-wells plate were treated overnight with ferric ammonium citrate (FAC 0, 50 or 100 µM) as indicated. Thereafter, cells were stained by 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) and membrane integrity analyzed by flow cytometry. The percentage of viable cells is given by excluding all the positive cells. **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. After addition of ferric ammonium citrate (FAC, 10, 50 or 100 µM), 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 incubated in 6-wells plate were preincubated 2 hours with ferric ammonium citrate (FAC, 0, 50 or 100 µM), then incubated with IL-4 (10 ng/mL) or IFNγ (100 UmL)

overnight. The percentage of $CD86^+$, I-A/I-E^+ and $CD206^+$ cells were then assessed in $F4/80^+$ cells. Data are representative of two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 4). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g005

CD86 and I-A/I-E over-expression was impaired by ferric ammonium citrate pretreatment and this was dose-dependent. The decrease of CD86 and I-A/I-E expression induced by iron loading was accentuated by IL-4 (Fig 5C). In contrast, the expression of CD206, increased after incubation with IL-4, as expected, was not further increased by iron loading. Thus, cell iron loading affects the expression of membrane costimulatory molecules associated with macrophage polarization, higher iron levels notably reducing M1 marker expression.

Alteration of endotoxin-induced pro-inflammatory response by cell iron overload

To further address the anti-inflammatory role of cell iron loading, we next assessed the functional consequences of iron supplementation on LPS-induced inflammation response in macrophages. BMDM were treated with ferric ammonium citrate overnight followed by TLR4 stimulation with LPS during 4 h for gene expression and 24 h for cytokine protein release and mediator analysis. The mRNA overexpression of *Il-12b*, *Il-1β*, *Il-6* and *Tnfα* genes induced by LPS (Fig 6A) was drastically reduced in BMDM pretreated with ferric ammonium citrate and this correlated with a reduction in the respective pro-inflammatory cytokines Il-12p40, Il-1β, Il-6 and Tnfα release (Fig 6B). In addition, the expression of *iNos*, a marker of M1 macrophages and its chemical product nitric oxide (NO) in response to LPS were also strongly impaired by iron loading (Fig 6A and 6B).

Early activation of TLR4 pathway leads to M1 polarization of macrophages characterized by the activation of NF-κB p65/p50 heterodimers, 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 LPS during 30 min to analyse NF-κB p65 nuclear translocation. As shown in Fig 6C, neither medium nor ferric ammonium citrate incubation allowed NF-κB p65 nuclear translocation, whereas LPS treatment on macrophages led to translocation of NF-κB p65. Interestingly, pretreatment of macrophages with 100 μM of ferric ammonium citrate impaired the LPS-induced nuclear translocation of NF-κB p65 (≈21%). Thus, *in vitro* cellular iron loading reduced NF-κB p65 nuclear translocation, *iNos* and pro-inflammatory cytokines expression, indicating that iron overload directly prevents macrophage proinflammatory response to endotoxin.

Intracellular iron load differentially modulates macrophage *hepcidin* and *ferroportin* expression in response to LPS

Iron-loading of 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. Further, *hepcidin 1* upregulation and/or *ferroportin* downregulation have been associated with different inflammatory stimuli such as TLR agonists or cytokines [45, 47, 10]. Thus, we next analyzed how iron cellular loading might influence the expression of *hepcidin 1* and *ferroportin* in macrophages. As shown in Fig 7, intracellular iron loading decreased LPS-induced *hepcidin 1* mRNA expression dose-dependently 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 abrogated by ferric ammonium pretreatment (Fig 7).

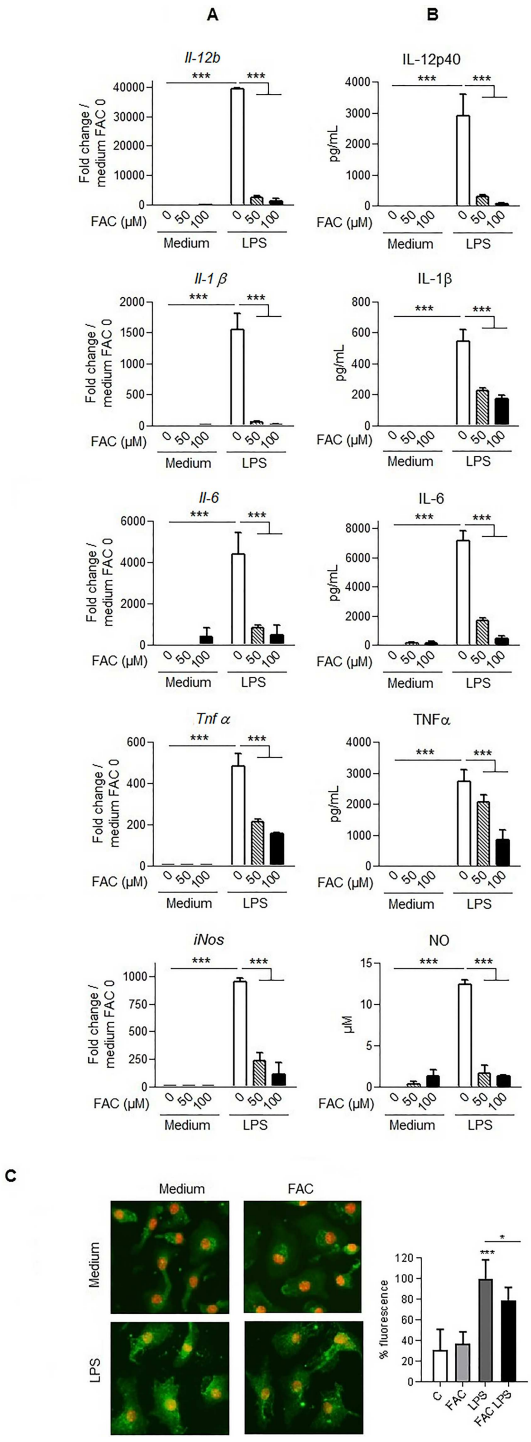


Fig 6. Iron loading of primary macrophages impairs LPS-induced pro-inflammatory responses. Bone marrow derived-macrophages were preincubated with ferric ammonium citrate (FAC, 0, 50 or 100 μM) overnight followed by LPS stimulation (100 ng/mL) for 4 h or 24 h to assess *Il-12b*, *Il-1β*, *Il-6*, *Tnfα* and *iNos* mRNA gene expression by quantitative PCR analysis (**A**) or cytokine Il-12p40, Il-1β, Il-6, Tnfα and nitric oxide measurement in cell medium by ELISA and Griess assay (**B**), respectively. Bone marrow derived-macrophages were preincubated with ferric ammonium citrate (FAC 100 μM) or medium overnight followed by LPS stimulation (100 ng/mL) for 30 min to assess NF-κB nuclear translocation by immunofluorescence, with NF-κB p65 in green and DAPI in red (**C**). Data of mRNA gene expression are given as fold change gene expression relative to the expression in untreated cells. Data are representative of at least two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 4). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g006

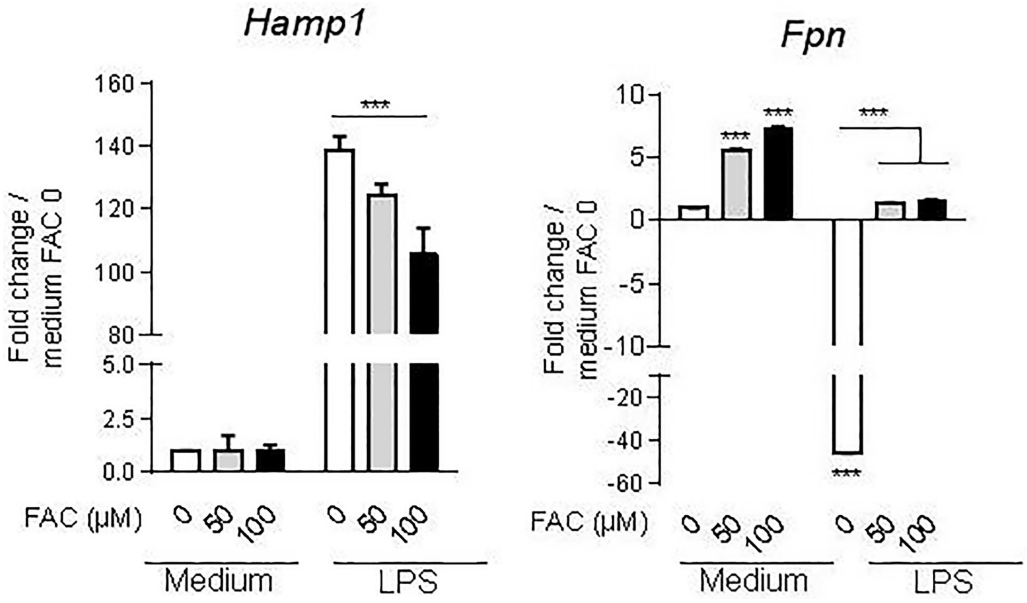


Fig 7. Iron loading modulates LPS-induced *hepcidin 1* and *ferroportin* expression in macrophages. Bone marrow derived-macrophages were incubated with ferric ammonium citrate (FAC, 0, 50 or 100 μM) for 16 hours followed by LPS stimulation (10 ng/mL). *Hepcidin 1* (*Hamp1*) and *ferroportin* (*Fpn*) mRNA expression were determined after 4 h (*Fpn*) or 12 h (*Hamp1*) using quantitative PCR analysis. Data are 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 ± SD (n = 4). *** $p \leq 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921.g007

Conversely, LPS stimulation prevented the upregulation of *ferroportin* in response to iron. Thus, the impaired expression of proinflammatory genes, cytokines and costimulatory receptors in response to LPS after macrophage iron overloading was associated with a reduced expression of *hepcidin 1* gene and restoration of *ferroportin* gene expression.

Discussion

Our data show that increased cell iron loading triggers the expression of monocyte polarization markers of M2-like phenotype in resting macrophages and dampens pro-inflammatory immune responses, while iron deficiency has the opposite effect. Indeed, *in vivo* increased iron status leading to increase transferrin saturation and tissue iron deposition, stimulated expression of M2-associated markers and cytokines, such as *arginase-1*, *Ym1* chitinase-like and mannose receptor. Modifications in iron balance also altered cellular inflammatory responses, as increased iron levels repressed some type 1 immune responses to TLR4 stimulation, such as *iNos* and *Il-12* gene expression. Indeed, after TLR4 stimulation iron-loading of primary bone marrow derived macrophages repressed the expression of M1-associated markers, decreased NF-κB p65 nuclear translocation, pro-inflammatory cytokines release and NO formation, while promoting M2-associated markers. Conversely, iron deficiency promoted type 1 pro-inflammatory cytokine expression in response to TLR4 stimulation. Therefore, changes in cell iron concentration can modulate macrophage phenotype and function with clear implications for the immune responses.

The effect of iron status on macrophage is consistent with previous reports of decreased CD86 and I-A/I-E expression in bone marrow derived macrophages in response to the iron chelator deferoxamine in the absence of an inflammatory context [11], or impaired *iNos* expression and NO release, M1 associated markers, in IFNγ treated RAW264.7 monocytic cell

line after iron loading [55]. Interestingly, intracellular iron dysbalance disrupted the L-arginine metabolism as a precursor for iNos and arginase-1, M1 and M2 activity, respectively [16, 21, 56]. We showed that cellular iron status influences macrophage metabolic programs, which are a key component of macrophage plasticity and polarization, instrumental to their function in homeostasis, immunity, and inflammation [16, 17, 22, 23, 26, 30]. We also document that changes in cell iron status interfere with the inflammation process by impairing LPS-induced pro-inflammatory response. The IL-12/IL-10 balance is one of the most striking features of macrophage polarization. Activated macrophages M1 and M2 produce IL-12^{hi} IL-10^{lo} and IL-12^{lo} IL-10^{hi}, respectively, which are cytokines involved in their pro-inflammatory and anti-inflammatory functions [1, 16, 17]. Indeed, IL-12/IL-10 ratio in response to LPS was significantly increased under iron deficiency, suggesting a pro-inflammatory role of iron deficiency in macrophages. Conversely, iron overload tended to decrease the IL-12/IL-10 balance as well as other pro-inflammatory cytokine response. Furthermore, we showed that NF-κB p65 translocation into the nucleus was reduced in our model of iron loaded macrophages, which can account for the reduced pro-inflammatory cytokine expression. NF-kB is a redox-sensitive transcription factor, and ROS are clearly implicated in its activation [57–59]. Here, the decrease in NF-κB p65 nuclear translocation after LPS stimulation was accompanied by an increase in ROS production. High ROS production by phagocytes mediates bacteria killing, but it has been previously shown that non-pathogenic levels of ROS, such as induced by certain commensal bacteria via TLRs or by H_2O_2 treatment, had suppressive activity on host inflammatory pathway and dampened the innate immune response [60, 61]. Indeed, ROS trigger inactivation of redox sensitive ubiquitin ligase involved in NF-κB inhibitor IκB-α degradation, reducing nuclear translocation of the p65 subunit of NF-κB [60, 61]. The decrease in NF-κB p65 nuclear translocation evidenced in iron loaded macrophages may be a consequence of low levels of ROS formation, and result in the suppression of NF-κB pathway activity and the alteration of pro-inflammatory genes expression.

Changes in inflammatory responses according to iron status were reported, although with different results [12–15]. We showed a reduced pro-inflammatory response to LPS in mice with iron overload induced by either iron-rich diet or intraperitoneal iron-dextran. These results corroborated a previous study showing that *in vivo* iron deprivation exacerbated the production of pro-inflammatory cytokines TNFα and IL-6 in liver, spleen macrophages and serum in LPS treated mice and this was reversed after hepcidin injection [12]. Other reports revealed an exacerbation of pro-inflammatory response associated with high iron status. Indeed, a model of high dose iron-dextran intraperitoneal injection (1 g/kg) exacerbated the pro-inflammatory response to a high LPS endotoxin dose (5 mg/kg) [13]. This was associated with elevated serum iron, but no data on tissue iron load was reported. In our hands, very high iron overload after iron-dextran injection (0.5 g/kg on day 8 and 4 before necropsy) and high LPS (10 mg/kg) increased LPS-induced *iNos* and pro-inflammatory cytokines expression S1 Fig). Indeed, high iron content due to erythrophagocytosis / extravasion of erythrocytes in a model chronic venous leg ulcers, or after repeated massive iron-dextran overload (0.25 g/kg every 3 days for 21 days), induced a proinflammatory M1 macrophage population [14]. Further, local iron oxide nanoparticles treatment or systemic ferumoxytol supplementation suppressed tumor growth by inducing pro-inflammatory macrophage responses with strong oxidative bursts [15]. Thus, under these conditions, the high iron tissue deposition associated with high macrophage iron levels was pro-inflammatory. In contrast, our studies show that under dietary iron supplementation, moderate iron overload is rather dampening inflammation. Thus, depending on the level of iron overload, through systemic or enteric route, the effect on inflammation might be pro-inflammatory at extremely high doses but rather anti-inflammatory at more moderate iron overload doses. In conclusion, we show here that under

physiological iron loading conditions, iron-enriched diet modifies the expression of markers of macrophage polarization and influences the inflammatory responses.

Supporting information

S1 Fig. Expression of pro-inflammatory markers in liver upon high iron dextran overload. C57BL/6 wild type mice were fed with iron replete diet (C) or received an injection of iron-dextran (Fe-dextran) 0.5 g/kg on day 8 and 4 before necropsy or dextran as vehicle (C). Mice were then treated with LPS (i.p 10 mg/kg) or NaCl 0.9% as vehicle. After 4 h liver homogenates gene expression of pro-inflammatory cytokines (*Il-6*, *Tnfα*, *Il-1β*, *Ifnγ*) and *iNos* was analyzed using quantitative PCR analysis. Data are expressed as mRNA fold change relative to control mice fed with IR diet. Data are from two independent experiments and presented as mean ± SD (n = 4 mice per group). ns, non significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.
(TIF)

Acknowledgments

The authors are grateful to Stéphanie Rose for skillful assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Rafiou Agoro, Valerie F. J. Quesniaux, Catherine Mura.

Formal analysis: Rafiou Agoro.

Funding acquisition: Valerie F. J. Quesniaux.

Investigation: Rafiou Agoro, Meriem Taleb, Catherine Mura.

Methodology: Rafiou Agoro.

Project administration: Catherine Mura.

Supervision: Catherine Mura.

Writing – original draft: Rafiou Agoro, Catherine Mura.

Writing – review & editing: Valerie F. J. Quesniaux, Catherine Mura.

References

1. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest 2012; 122:787–795. https://doi.org/10.1172/JCI59643 PMID: 22378047
2. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. J Biol Chem 2001; 276:7811–7819. https://doi.org/10.1074/jbc.M008923200 PMID: 11113132
3. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. J Biol Chem 2000; 275:19906–19912. https://doi.org/10.1074/jbc.M000713200 PMID: 10747949
4. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt S, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. Nature 2000; 403:776–781. https://doi.org/10.1038/35001596 PMID: 10693807
5. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. Mol Cell 2000; 5:299–309. PMID: 10882071
6. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, McVey Ward D, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science 2004; 306:2090–2093. https://doi.org/10.1126/science.1104742 PMID: 15514116

7. Soares MP, Hamza I. Macrophages and iron metabolism. Immunity 2016; 44:492–504. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.016 PMID: 26982356
8. Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. Trends Immunol 2011; 32:241–247. https://doi.org/10.1016/j.it.2011.03.007 PMID: 21514223
9. Recalcati S, Locati M, Marini A, Santambrogio P, Zaninotto F, De Pizzol M, et al. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. Eur J Immunol 2010; 40:824–835. https://doi.org/10.1002/eji.200939889 PMID: 20039303
10. Agoro R and Mura C. Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization. Blood Cells Mol Dis 2016; 61:16–25. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.07.006 PMID: 27667162
11. Corna G, Campana L, Pignatti E, Castiglioni A, Tagliafico E, Bosurgi L, et al. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. Haematologica 2010; 95:1814–1822. https://doi.org/10.3324/haematol.2010.023879 PMID: 20511666
12. Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, et al. Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. Blood 2011; 118:736–746. https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-337212 PMID: 21628413
13. Hoeft K, Bloch DB, Graw J A, Malhotra R, Ichinose F, Bagchi A. Iron loading exaggerates the inflammatory response to the toll-like receptor 4 ligand lipopolysaccharide by altering mitochondrial homeostasis. Anesthesiology 2017; 127:121–35. https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001653 PMID: 28430694
14. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A., Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkötter C, Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. J Clin Invest 2011; 121:985–997. https://doi.org/10.1172/JCI44490 PMID: 21317534
15. Zanganeh S, Hutter G, Spitler R, Lenkov O, Mahmoudi M, Shaw A, Pajarinen JS, Nejadnik H, Goodman H, Moseley M,Coussens LM, Daldrup-Link EH. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. Nature Nanotech 2016; 11:986–995.
16. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000 Prime Reports 2014; 6:13. https://doi.org/10.12703/P6-13 PMID: 24669294
17. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. Nat Rev Immunol 2011; 1:750–761.
18. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. J Leukoc Biol 2002; 72:101–106. PMID: 12101268
19. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. Nat Immunol 2016; 17:34–40. https://doi.org/10.1038/ni.3324 PMID: 26681460
20. Glass CK, Natoli G. Molecular control of activation and priming in macrophages. Nat Immunol 2016; 17:26–33. https://doi.org/10.1038/ni.3306 PMID: 26681459
21. 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. *Am* J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 286:L198–209. https://doi.org/10.1152/ajplung.00136.2003 PMID: 12972406
22. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nat Rev Immunol 2005; 5: 641–654. https://doi.org/10.1038/nri1668 PMID: 16056256
23. Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. Frontiers in Immunol 2015; 6:1–12.
24. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, de Dios Ruiz-Rosado J, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. Plos One 2015; 10: e0145342. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342 PMID: 26699615
25. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. Annu Rev Physiol 2011; 73:479–501. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142250 PMID: 21054166
26. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. Frontiers Immunol 2014; 5:1–9.
27. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GCN, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. J Clin Invest 1998; 102:1645–1652. https://doi.org/10.1172/JCI3877 PMID: 9802878
28. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sicaa A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. Semin Immunol 2015; 27:237–248. https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.003 PMID: 26561250

29. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. Nat Comm 2013; 4:2834.
30. Covarrubias AJ, Aksoylar HI, Horng T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. Semin Immunol 2015; 27:286–296. https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.08.001 PMID: 26360589
31. Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. Trends Immunol 2003; 24:358–363. PMID: 12860525
32. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Ukital J, et al. MΦ1 and MΦ2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. Immunobiology 2006; 211:473–486. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.017 PMID: 16920487
33. Akira S. Innate immunity and adjuvants. Phil Trans R Soc *B* 2011; 366:2748–2755. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0106 PMID: 21893536
34. Yin Q, Fu TM, Li J, Wu H. Structural biology of innate immunity. Ann Rev Immunol 2015; 33:393–416.
35. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. Nature Immunol 2016; 17:9–17.
36. Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. Nat Genet 2009; 41:482–487. https://doi.org/10.1038/ng.335 PMID: 19252486
37. Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. Blood 2008; 112:1503–1509. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143354 PMID: 18539898
38. Beaumont C, Delaby C. Recycling iron in normal and pathological states. Semin Hematol, 2009; 46:328–338. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2009.06.004 PMID: 19786201
39. Nairz M, Schroll A, Demetz E, Tancevski I, Theurl I, Weiss G. 'Ride on the ferrous wheel'—The cycle of iron in macrophages in health and disease. Immunobiology 2015; 220:280–294. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.010 PMID: 25240631
40. Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ, Wessling-Resnick M. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. Blood 2003; 102:4191–4197. https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1250 PMID: 12907459
41. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. Blood 2005; 106:3979–3984. https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2398 PMID: 16081696
42. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudoff S, Pederson BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. J Clin Invest 2004; 113:1271–1276. https://doi.org/10.1172/JCI20945 PMID: 15124018
43. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth MP, 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; 120:431–439. https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-411470 PMID: 22611157
44. Yang F, Liu XB, Quinones M, Melby PC, Ghio A, Haile DJ. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. J Biol Chem 2002; 277:39786–39791. https://doi.org/10.1074/jbc.M201485200 PMID: 12161425
45. Liu XB, Nguyen NB, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. Blood Cells Mol Dis 2005; 35:47–56. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.04.006 PMID: 15932798
46. Nguyen NB, Callaghan KD, Ghio AJ, Haile DJ, Yang F. Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006; 291:L417–425. https://doi.org/10.1152/ajplung.00484.2005 PMID: 16648237
47. Guida C, Altamura S, Klein FA, Galy B, Boutros M, Ulmer AJ, et al. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. Blood 2015; 125:2265–2275. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-595256 PMID: 25662334
48. Goodwin JF, Murphy B, Guillemette M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. Clin Chem 1966; 12:47–57. PMID: 4952421
49. Muller M, Eugster HP, Le Hir M, Shakhov F, Di Padova C. Maurer V.F, et al. Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. Mol Med 1996; 2:247–255. PMID: 8726467
50. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Methods Enzymol 1996; 268:142–151. PMID: 8782580

51. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. Bit J Pharmacol 2009; 158:638–651.

52. Mackenzie E, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications. Antioxid Redox Signal 2008; 10:997–1030. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1893 PMID: 18327971

53. Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, Morrow CS, Torti SV, Torti FM. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. Mol Cell Biol 2000; 20:5818–5827. PMID: 10913165

54. Huang BW, Ray PD, Iwasaki K, Tsuji Y. Transcriptional regulation of the human ferritin gene by coordinated regulation of Nrf2 and protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT4. FASEB J 2013; 27:3763–3774. https://doi.org/10.1096/fj.12-226043 PMID: 23699174

55. Gan ZS, Wang QQ, Li JH, Wang XL, Wang YZ, Du HH. Iron reduces M1 macrophages polarization in RAW264.7 macrophages associated with inhibition of STAT1. Mediators of Inflammation 2017; 2017: 8570818. https://doi.org/10.1155/2017/8570818 PMID: 28286378

56. Hardbower DM, Asim M, Murray-Stewart T, Casero RA Jr, Verriere T, Lewis ND, et al. Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to Helicobacter pylori infection. Amino Acids. 2016; 48:2375–88. https://doi.org/10.1007/s00726-016-2231-2 PMID: 27074721

57. Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Separation of oxidant-initiated and redoxregulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:11527–11531. PMID: 7526398

58. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-xB transcription factor and HIV-1. EMBO J 1991; 10:2247–2258. PMID: 2065663

59. Shi X, Dong Z, Huang C, Ma W, Liu K, Ye J, et al. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. Mol Cell Biochem 1999; 194:63–70. PMID: 10391125

60. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IκB-α ubiquitination. Science 2000; 289:1560–1563. PMID: 10968793

61. Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Hansen JM, Li T, Yamoah K, et al. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. EMBO J 2007; 26:4457–4466. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601867 PMID: 17914462

Copyright of PLoS ONE is the property of Public Library of Science and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

Étude des interactions métabolisme du fer/réponse immune lors d'une infection à *Nippostrongylus brasiliensis* chez la souris.

Meriem Taleb [1-2] Léa chapart [2], et Catherine Mura[*,1-2]

[1]Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS, Orléans, France; [2]University of Orléans, Orléans, France

Abstract

Iron is a critical trace element for cellular biochemistry and is crucial for the growth of the pathogens, but also for the immune system that control infections. A battle for iron is engaged between the pathogen that tries to acquire host iron, and the infected host that tries to deprive for pathogens. This strategy is associated with chronic anemia events that accompany infections. In mammals, systemic homeostasis of iron is mainly based on the hepcidin/ferroportin axis. Hepcidin is induced in the presence of a high iron level and during inflammation. Hookworms infections are considered to cause one of the major neglected tropical diseases, in human, there are mainly represented by *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. The disease leads to modifications of the nutritional status and is characterized clinically by anemia. Using *Nippostrongylus brasiliensis*, a well-documented murine model of hookworm infection, we propose to study how iron influences the immune response and the outcome of infection. Our preliminary results suggest that moderate iron status, decrease the reported hemorrhage, enhance cellular recruitment and the secretion of type II mediators, thus reinforcing the type 2 immune response, and leading to faster tissue repair, while iron deprivation leads to the abolition of the type 2 immune response and an exacerbate phenotype. Significant changes in the regulation of iron have been detected at the intestinal level with a high iron release from the enterocytes suggesting the involvement of the hepcidin - ferroportin axis in this type of infection to induce pathogenic iron deprivation.

Mots clefs

Fer, Immunité nutritionnelle, réponse immune type 2, anémie.

Introduction

Les helminthiases transmises par le sol (STH) sont l'une des infections les plus courantes dans le monde, elles affectent les populations des pays à revenu faible et intermédiaire, et restent un problème majeur de santé publique. De plus, les problèmes actuels de réchauffement climatique peuvent être à l'origine de la récurrence de nombreuses maladies tropicales oubliées causées par des parasites, et ce en leur offrant un environnement propice à leur survie. Les principales espèces infestant les humains sont divisées en trois groupes principaux : le ver rond *(Ascaris lumbricoides),* le trichocéphale *(Trichuris trichiura)* et les ankylostomes qui se nourrissent de sang *(Necator americanus et Ancylostoma duodenale).* Ces derniers font partie de la famille des hémoparasites et dépendent donc de la digestion de l'hémoglobine des érythrocytes de l'hôte comme source d'énergie (Hotez *et al.,* 2016). En effet, les ankylostomes se nourrissant activement de sang provenant des capillaires lacérés de la muqueuse intestinale provoquent des saignements gastro-intestinaux sévères qui se traduisent par une carence en fer (ID) et éventuellement de l'anémie microcytaire hypochrome (MHA) ou de l'anémie ferriprive (IDA) qui est la principale signature clinique de l'infection ankylostome, en plus de la perte de certaines protéines sériques et de l'inflammation intestinale (Pearson *et al.,* 2012). Les infections helminthes passent par deux phases, d'abord une phase pulmonaire caractérisée par une inflammation, puis les vers transitent au niveau de l'intestin grêle de l'hôte où ils acquièrent leurs formes mâture pour se reproduire (Loukas *et al*., 2016). Il est également connu que l'état nutritionnel des patients peut affecter les infections et *vice versa*. Les suppléments de fer sont souvent prescrits aux populations défavorisées, ce qui modifie leurs réserves de fer interne (OMS., 2020). Actuellement, les stratégies thérapeutiques incluent la prescription de suppléments de fer en association avec des traitements anthelminthiques (Stoltzfus *et al.,* 2011). Cependant, les études épidémiologiques rapportées révèlent souvent des discordances dans l'amélioration thérapeutique de ces combinaisons moléculaires, probablement en raison des besoins en fer respectifs entre le pathogène et l'hôte infecté. De plus, des rapports de plus en plus nombreux montrent l'impact du fer sur l'immunomodulation des cellules immunitaires (Weiss., 2002). Le rôle du fer dans l'immunité a été bien documenté notamment à travers l'étude de la biologie des macrophages. Par exemple, dans le modèle LPS, le statut riche en fer tend à induire une augmentation du phénotype de type M2, modifiant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Agoro *et al.,* 2017). Il a également été montré que la mutation dans *TFRC* qui empêche l'internalisation du fer médiée par TfR1, entraîne une prolifération défectueuse des cellules T et B ainsi qu'une commutation de classe altérée, ce qui est nécessaire pour la production d'anticorps (Jabara *et al.,* 2016). Les niveaux de fer intracellulaire affectent aussi la prolifération des lymphocytes T CD4 en favorisant la signalisation de l'IL-2R et la fonction mitochondriale (Yarosz *et al.,* 2020). Selon le contexte inflammatoire, le fer peut jouer des rôles différents sur l'issue des infections. Alors que certaines études suggèrent que la supplémentation en fer peut prévenir l'anémie rapportée qui accompagne les infections, soutenir le système immunitaire et sont donc bénéfiques pour la défense de l'hôte. D'autres rapports semblent suggérer l'effet inverse, comme par exemple en cas d'infection par les schistosomes ou le

paludisme (Armitage et D Moretti., 2019). Cependant, il existe peu de données biologiques et immunologiques sur les relations de l'état nutritionnel de l'hôte et l'infection aux ankylostromes. En utilisant *Nippostrongylus brasiliensis*, un modèle murin bien documenté d'infection par l'ankylostome, nous proposons d'étudier l'impact des changements nutritionnel en fer de l'hôte sur la réponse immunitaire et l'issue de l(infection. Nous proposons également de tester l'hypothèse de l'anémie des maladies chroniques (ACD) dans ce contexte d'infections puisqu'elle n'a jamais été abordée.

Matériels et méthodes

1. Suivi des animaux

Des souris de type sauvage C57BL/6 (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) logées dans l'animalerie du Transgenose Institute (TAAM, CNRS UPS44, Orleans) ont reçus soit un régime standard (280 mg de fer carbonyle/kg), un régime riche en fer (25 000 mg de fer carbonyle/kg) pendant 15 jours, pauvre en fer (moins de 20 mg de fer carbonyle/kg) pendant 15 jours, ou un régime modérément enrichi en fer (2 500 mg de fer carbonyle/kg) pendant 60 jours (différents régimes de fer : R03 de Scientific Animal Food & Engineering; Augy, France), avant d'être infecté par les larves L3 de *N. brasiliensis.* Les souris ont été observées quotidiennement et surveillées pour détecter les signes de détresse, y compris la fourrure ébouriffée, l'immobilité ou la courbure et la perte de poids corporel. Toutes les expérimentations animales sont conformes à la réglementation de l'expérimentation animale du gouvernement français et ont été approuvées par le « Comité d'éthique de l'expérimentation animale du CNRS Campus Orléans » (CCO; N ° CLE CCO 2012-047) (Suppl figure 1A).

2. Infection à *Nippostrongylus brasiliensis*

Les larves *N. brasiliensis* de stade larvaire L3 sont extraites à partir de culture fécale de rats infectés provenant du laboratoire du Docteur Dewal (Liège, Belgique). Les larves L3 ont été récoltées par le système Baermann (Suppl figure 1B). Ce système se compose d'un entonnoir suspendu contenant une superposition de papier selon l'ordre suivant : une couche de coton, quatre couches de tissu et une couche de coton, et d'un tube plastique que l'on peut ouvrir et fermer. Tout d'abord, de l'eau déionisée est introduite sous la couche de papier. La culture fécale est par la suite introduite sur la couche supérieure du papier. Au bout de 15 à 20 minutes, les larves L3 migrent en traversant les différentes couches de papiers et sédimentent sous forme d'un culot contenant les larves L3 pures. Ce dernier est lavé dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), centrifugé pendant 3 min à 150 G à 20° C, puis compté au microscope en déposant 10 µL de la suspension larvaire avec 10 µL de lugol comme fixateur. Les souris sont ensuite infectées par voie sous-cutanée à raison de 500 larves L3/ souris (Suppl figure 1B).

3. Comptage des parasites intestinaux post-infection

L'intestin grêle est extrait au jour 6 post-infection, il est coupé sur toute sa longueur en portions de 4 cm et disposé sur un mini-système Baermann. Les parties intestinales sont placées sur une

compresse, en prenant soin de garder tout le contenu intestinal pour perdre le moins de vers possible. La compresse placée en bourse est déposée sur le bord d'un tube de 50 mL rempli de PBS à 37°C. Le tube est par la suite refermé et déposé 1 h dans un bain-marie à 37°C. Une fois les parasites adultes migrent dans la solution, le contenu de la solution est placé dans une large boite de pétrie quadrillée et le nombre total de vers est compté.

4. Comptage des cellules infiltrées dans le lavage broncho-alvéolaire

Le lavage broncho-alvéolaire (BAL) est récupéré en introduisant une canule au niveau de l'œsophage. Deux prélèvements sont réalisés avec 700 µL de NaCl 0.9% dans un premier temps puis trois fois 500 µL dans un second temps. Ils sont par la suite centrifugés à 1750 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré et le culot est suspendu avec 400µL de NaCl. 0.9%. Les cellules obtenues sont comptées puis centrifugées en spot cytospin, ce dernier est par la suite coloré par une coloration Giemsa®. Cette coloration contient un mélange d'azure, de bleu de méthylène et d'éosine. L'azure et l'éosine colorent les composants des cellules tels que le cytoplasme et les granules alors que le bleu de méthylène colore le noyau de la cellule, permettant ainsi de distinguer les cellules immunitaires présentes dans les alvéoles en fonction de leurs morphologies.

5. Analyse hématologique et analyse sérique

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et le sang a été collecté par prélèvement rétro-orbital dans des tubes EDTA pour le plasma ou dans des tubes séparateurs de sérum (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) pour la séparation du sérum. Les paramètres hématologiques ont été déterminés en utilisant un hématomètre SCIL Vet abc Plus + (SCIL Animal Care Company, Altorf, France). La morphologie des globules rouges a été évaluée sur des frottis sanguins colorés avec le kit Fast Quick May-Grunwald Giemsa (kit DiaPath, Martinengo, Italie). La concentration de fer sérique et la capacité de liaison du fer insaturé (UIBC) ont été déterminées par la méthode colorimétrique à la ferrozine standard [Yamanashi *et al.,* 2002 ; Goodwin et al., 1966], la saturation de la transferrine (%) a été calculée comme suit : (fer sérique / fer sérique + UIBC) × 100.

6. Cytométrie en flux

Le lobe gauche du poumon et la rate sont broyés dans une solution de milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) contenant 1 µg/mL de DNase 1 (Sigma-Aldrich®) et 125µg/mL de Liberase (Roche®) pendant 45 min à 37°C. Pour stopper les réactions enzymatiques du RPMI complet (1 % Pénicilline/Streptomycine et 10 % SVF) est ajouté et les débris cellulaires sont retirés par filtrage. Les broyats sont par la suite centrifugés pendant 5 min à 1200 rpm à 4°C, les hématies sont lysées par l'ajout d'une solution Pharmalyse® puis la réaction est stoppée avec du RPMI complet. Après une nouvelle centrifugation, les culots sont suspendus dans du tampon contenant du PBS, SVF 2% et 2 mM EDTA, puis incubées avec différents anticorps couplés à différents fluorochromes relatifs à nos marquages d'intérêt. Le marquage membranaire est réalisé à 4°C durant 30 minutes et à l'obscurité. Les

cellules sont ensuite lavées avec du PBS, SVF 2% et 2 mM EDTA, puis perméabilisées (BD Perm/ wash) pendant 30 min, afin de réaliser un second marquage intracellulaire durant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont fixées à l'aide du tampon FACS lysing à la fin de l'incubation.
Des contrôles FMO (Fluorescence Minus One) ont été réalisés pour distinguer le signal positif du négatif. Ils correspondent à un mixage d'anticorps couplés à leur fluorochrome excepté le marquage d'intérêt. Un contrôle FMO est fait pour chaque marquage. Les données de cytométrie de flux ont été acquises sur le cytomètre BDFACS Canto II (Becton Dickinson®). Pour chaque échantillon 40.000 événements ont été enregistrés. L'analyse finale et la sortie graphique ont été réalisées en utilisant le logiciel FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

7. Détermination de l'expression des gènes cibles par RT-qPCR.

L'ARN total provient d'échantillons de tissus pulmonaire broyés dans du TRIzol (Invitrogen). La transcription inverse de 1 µg d'ARN total a été réalisée avec le système de synthèse du premier brin SuperScript III (Life Technologies) dans un volume total de 20 µL. Les niveaux d'ARNm des gènes sélectionnés ont été mesurés à l'aide du système QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) et du système de PCR en temps réel Aria Mx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Pour *Hmox,* l'*Il-13, Il-4, Ym-1, Timp1, Lcn2*, et *Gapdh*, des amorces quantitect de Qiagen ont été utilisées pour l'analyse Fpn amorce sens : 5'-CTCTGTCAGCCTGCTGTTTG-3' ; antisens : 5'TCAGGATTTGGGGCC. Les réactions de qRT-PCR ont été effectuées en triplicat. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène de contrôle *GAPDH* grâce à la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour déterminer le fold change d'expression génique par rapport au contrôle régime standard non infecté (Pfaffl., 2001).

8. Histologie des organes

Les échantillons de tissus fixés dans du formol 4% en tampon phosphate, puis inclus dans de la paraffine ont été coupés au microtome avec une épaisseur égale à 3 µm. Les coupes de tissu déparaffinées ont été colorées avec de l'hématoxyline/éosine (H&E) pour évaluer l'architecture tissulaire, ou avec la solution de Perl's (3,7%) acide chlorhydrique : ferrocyanure de potassium à 5%/ Nuclear fast red), signal ensuite intensifié avec une solution de 3,3′-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Chemicals, St Louis, MO, USA) (0,025% DAB / 0,12% H_2O_2 dans du PBS pH7 .2) pour visualiser les dépôts de fer ferrique. Les images histologiques ont été acquises avec le scanner de lames NanoZoomer NDP scan 1.0.9 et importées dans le logiciel NDP view 2.0 (Hamamatsu Photonics K.K., JPY).

9. Extraction protéique

Les protéines ont été extraites suivant un protocole en deux étapes. Les parties réservées à l'étude des protéines de l'intestin et de la rate ont été conservés à -80°C. Les organes ont été décongelés puis broyés manuellement à l'aide d'un piston dans une solution de lyse contenant du Tris 10 mM pH

7/1 mM $MgCl_2$ comprenant le cocktail d'inhibiteur de protéase (Invitrogen) incubés sur glace pendant 10 min puis centrifugés à 25 000 g, les surnageant ont été récupérés sous forme de protéines natives cytosoliques. Ensuite, les culots ont été homogénéisés dans 10 mM Tris pH8 / 1 mM EDTA/0,15 M NaCl/1% NP40/1% SDS/10 mM NaF / 0,5 mM DTT/ cocktail inhibiteur de protéase et inhibiteur de la phosphatase 1x (Sigma), soniqués (6 x 30 s) incubés sur glace pendant 1 h puis centrifugés à 25 000 g, le surnageant a été récupéré sous forme d'extrait de protéine membranaire. La concentration en protéines a été mesurée en utilisant un kit de dosage Micro BCA (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA). La coloration du fer ferrique contenu dans ferritine a été réalisée sur gel en conditions non dénaturantes sur un extrait de protéine cytosolique native fraichement préparé (50 µg) mélangé avec un tampon de charge (20 mM Tris HCl pH8, 80% (v/v) glycérol, 0,1% (w/v) bleu de bromophénol) et séparés sur un gel 5% d'acrylamide : bis acrylamide non dénaturant (37,5 : 1) dans du Tris 0,375 M pH 8,8 à 30 mA pendant 1 h 30 à 4 °C. Le gel a été coloré avec le colorant Perl's fraîchement préparé pendant 1 h à température ambiante, la coloration a ensuite été amplifiée avec une solution de DAB (0,075% DAB / 0,015% H_2O_2 dans du PBS pH 7,2). Les gels après transfert semi-sec ont été incubés avec un anticorps monoclonal anti-ferritine de lapin (dilution 1 : 1000 ; clone SC0620) pour confirmer que les bandes étaient colorées pour la ferritine ferrique. Dans toutes les expériences, une seule bande de poids moléculaire élevé (environ 440 kDa) colorée avec Perl's/ DAB était positive pour l'anticorps de ferritine.

Pour le western blot, les échantillons de protéines cytosoliques ont été séparés sur SDS-PAGE 12% ou 8%, puis immunoblotés, les membranes ont été transférées dans un système semi-sec, puis bloquées dans une solution saline tamponnée au Tris, 0,5% (v / v) Tween-20 (TBS -T) et 10% (p/v) de lait écrémé pendant 2 h. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires anti-ferritine monoclonale de lapin [1 : 1000, clone SC0620], ou anti-Gapdh de lapin [1 : 5000, Sigma] ou anti-β-actine-HRP de souris pour la normalisation [1 : 5000, Abcam] préparés dans TBS-T à 5% (p / v) de lait écrémé et incubés pendant une nuit à 4°C. Après (3 x 5 min) de lavages au TBS-T, et incubation d'anticorps secondaire IgG anti-lapin conjuguée à la peroxydase de [1 : 5000, Cell signaling], les signaux protéiques ont été détectés à l'aide du réactif de chimioluminescence (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Royaume-Uni) et les images capturées numériquement à l'aide de l'imageur fuorescent Syngene Pxi4 System (Ozyme).

9.1. Dosage du fer sur tissu sec

Le dosage du fer tissulaire est réalisé au niveau du poumon, du foie, de l'intestin et de la rate. Un fragment des différents organes est mis à sécher dans un four à 120°C 24 h. Par la suite, 5 à 10 mg de tissu sec est pesé pour chaque échantillon, et dissout dans un ratio 1 : 1 d'acide sulfurique et acide nitrique à 90°C. Les échantillons sont dilués dans de l'eau pour un volume final de 1 mL. Les niveaux de fer ont été déterminés par la méthode colorimétrique à la ferrozine standard [Yamanashi *et al.,* 2002; Goodwin *et al.,* 1966].

Résultats

1. L'infection *N. brasiliensis* induit une légère perte de poids des souris qui se résorbe au 4ème jour post-infection

Un suivi et un contrôle quotidien ont été mis en place afin de veiller au bien-être animal, conformément aux règles édictées dans le protocole éthique APAFIS 23557. Les animaux ont été euthanasiés si leur poids corporel initial est réduit de plus de 20% ou si leur état général se détériore. L'infection par *N. brasiliensis* induit une perte progressive et légère du poids corporel des animaux entre le 1er et le 4ème jour avec un début de récupération pondérale au bout du 4ème jour post-infection. Aucune différence n'a été notée entre les différents régimes carencés en fer et moyennement enrichis par rapport au régime standard. Cependant, une plus forte tendance à la perte de poids est observée avec le régime fortement enrichi en fer (résultat non montré).

2. Le régime modérément enrichi en fer améliore l'hémorragie et l'inflammation pulmonaire induites par *N. brasiliensis*

L'inflammation pulmonaire a été évaluée au jour 6 post-infection. Une augmentation similaire du poids pulmonaire des souris infectées sous les différents régimes alimentaires est observée par rapport à leurs témoins non infectés respectifs (Figure 1A). L'analyse histologique de la structure pulmonaire par coloration H&E, montre que contrairement aux animaux non infectés qui présentent un parenchyme pulmonaire correctement structuré et ordonné, les animaux infectés présentent un réseau alvéolaire déstructuré, ainsi qu'un épaississement parenchymateux et alvéolaire témoignant d'un recrutement de cellules immunitaire au niveau pulmonaire. Les lésions pulmonaires apparaissent moins prononcées dans le groupe infecté sous le régime alimentaire modérément enrichi en fer. A l'inverse, ces lésions semblent plus importantes dans le groupe infecté sous le régime alimentaire carencé en fer, et inchangées dans le groupe infecté sous le régime fortement enrichi en fer par rapport au groupe infecté sous le régime alimentaire standard (Figure 1B). L'infection à *N. brasiliensis* est connue pour induire de l'anémie, qui est en partie due aux saignements causés par la migration des vers. L'analyse H&E montre effectivement que les souris infectées présentent une hémorragie représentée par une présence diffuse d'hématies. L'hémorragie observée semble mieux contrôlée dans le groupe ayant reçu le régime modérément enrichi en fer comparé au groupe ayant été infecté sous un régime standard. A l'inverse, les groupes infectés sous un régime carencé ou fortement enrichi en fer semblent montrer une hémorragie plus sévère représentée par une présence plus importante d'hématies. Ce résultat va de pair avec l'observation faite le jour de l'autopsie qui montrait moins de saignement au niveau des poumons et du lavage broncho-alvéolaire du groupe infecté sous le régime modérément enrichi en fer (Figure 1A). En somme ces observations suggèrent que le régime modérément enrichi en fer jouerait un rôle

favorable dans le contrôle pulmonaire de l'hôte à l'infection *N. brasiliensis* contrairement aux régimes carencés en fer et enrichi fortement en fer qui eux semblent exacerber la phase pulmonaire de l'infection à *N. brasiliensis.* L'analyse histologique des dépôts de fer, par coloration de Perl's montre que les cellules recrutées au niveau du site enflammée présentent une coloration bleue intense, indiquant une surcharge en fer des cellules infiltrés au niveau des poumons. Cette surcharge peut-être soit due à une rétention du fer par les cellules immunitaires ou le résultat de la phagocytose des hématies libérés lors de l'hémorragie par les macrophages présents et/ ou recrutés au niveau pulmonaire (Figure 1C).

La réponse immune de type 2 est cruciale pour le contrôle de l'hôte aux infections parasitaires. Elle est caractérisée par une polarisation des macrophages M0 en M2 et des T $CD4^+$ Th0 en Th2, tous deux sécréteurs d'IL-4, 13, et 5. Une analyse transcriptomique par qPCR ainsi qu'une analyse par cytométrie en flux ont été effectués afin d'étudier l'impact des différents régimes en fer sur les marqueurs immunitaires impliqués dans l'infection *N. brasiliensis.* L'expression des transcrits *Il-4, Il-13,* ainsi que les marqueurs de réparation tissulaire *Chil-3, Timp1, Rentla1*, et *Hmox1* est significativement augmentée chez les souris infectées sous un régime modéré en fer, mais significativement réduite chez les souris infectées sous un régime carencé en fer (Figure 1D).

L'analyse par cytométrie en flux des cellules lymphocytaires T $CD4^+$, montre une augmentation significative des cellules T $CD4^+$ dans les groupes infectés indiquant la mise en place d'une réponse adaptative de type T $CD4^+$ due à l'infection *N. brasiliensis.* Cette augmentation des cellules T $CD4^+$ est plus importante dans le groupe infecté sous un régime alimentaire modérément enrichi en fer comparés aux autres groupes infectés. En outre, l'analyse de la sous population Th2 caractérisée par la sécrétion de l'IL-13, ainsi que le facteur de transcription Gata-3 montre un recrutement plus important des Th2 dans le groupe infecté sous le régime modéré en fer comparé au groupe contrôle infecté sous un régime alimentaire standard. Les proportions des sous population T $CD4^+$ ainsi que celle des Th-2 ne semblent pas changer entre les groupes infectés sous le régime alimentaire déficient et fort en fer comparé au groupe contrôle infecté sous le régime alimentaire standard (figure 1E). L'infection *N. brasiliensis* induit une régulation à la baisse du transcrit de la ferroportine *(Fpn)* dans le groupe infecté suivant le régime standard en fer. Les différents changements alimentaires pauvre, modérément et fortement enrichis en fer abolissent cette régulation négative. De plus, l'infection à *N. brasiliensis* dans un contexte carencé en fer abolit la régulation positive du transcrit de la lipocaline-2 *(Lcn2),* observée avec les régimes standard, modérément, et fortement enrichie en fer (Figure 1D). Ces résultats suggèrent d'une part que l'apport modéré et non fort en fer favorise la réponse immune de type 2, illustrée par une plus forte augmentation des médiateurs de cette réponse. D'autre part le régime alimentaire carencé en fer abolit la réponse immune de type 2.

3. L'infection à *N. brasiliensis* induit une anémie accompagnée de modification des paramètres du fer circulant et activation du processus d'érythropoïèse

Il est bien connu que les infections helminthiques s'accompagnent de pertes sanguines et d'épisodes anémiques. Une analyse sanguine a été réalisé afin de vérifier l'effet des apports alimentaires en fer sur l'état anémique. L'analyse des frottis sanguins par coloration de Griess montre que les érythrocytes des souris infectées par *N. brasiliensis* suivant les différents régime standard, carencé, modérément et fortement enrichis en fer sont hypochromiques (Figure 2A). Parallèlement, le dosage de l'hémoglobine sanguine (Hb) a révélé une diminution de l'Hb dans les groupes infectés sous un régime standard et carencé en fer par rapport à leurs témoins non infectés respectifs. Cependant, le taux de l'Hb semble être inchangé en présence ou en absence d'infection dans les groupes ayant reçus une supplémentation en fer qu'elle soit modérée ou forte (Figure 2B). L'hématocrite ne montre pas de diminution de globules rouges circulants suite à l'infection. Le dosage des paramètres de fer circulant montre une diminution de fer sérique ainsi que celle de la saturation de la transferrine chez les animaux infectés sous les régimes standard et carencé en fer comparés au animaux non infectés, ce qui n'est pas observé lors de l'infection avec des régimes modérément et fortement enrichis en fer (Figure 2B). De plus, l'infection induit une diminution des cellules immunitaires circulantes, monocytes, lymphocytes T, neutrophiles, et éosinophiles circulants (Figure 2D).

Afin d'étudier plus avant l'état anémique des animaux infectés par *N. brasiliensis*, une analyse du processus d'érythropoïèse a été réalisée. L'étude par cytométrie en flux des différents stades érythrocytaires de la moelle osseuse montre une augmentation des populations érythroblastiques de stade I et II dans les groupes infectés dans le cadre d'un régime modérément et fortement enrichi en fer, avec une diminution des populations érythroblastique des stades avancé III et IV. Un profil inverse a été noté dans les groupes infectés dans le cadre d'un régime standard et carencés en fer. Ce résultat suggère que l'infection *N. brasiliensis* implique une demande de synthèse d'érythrocytes, conduisant ainsi à l'activation du processus d'érythropoïèse. De plus, les régimes alimentaires pauvre ou enrichie modérément et fortement en fer amplifient le processus d'érythropoïèse comparés au régime standard (Figure 2C).

4. L'infection à *N. brasiliensis* entraîne une diminution du mécanisme d'érythrophagocytose avec activation du processus d'érythropoïèse dans la rate

Le dosage de fer splénique, ainsi que l'analyse histologique des sidérophages, macrophages contenant de l'hémosidérine, réalisée par coloration Perl's montre différents niveaux des dépôts de fer dans les macrophages de la pulpe rouge de la rate suivant les divers régimes alimentaires. Cependant, l'infection par *N. brasiliensis* entraine une réduction considérable des niveaux de fer avec les différents régimes alimentaires. Les souris infectées sous un régime riche en fer montrent une diminution, mais qui reste néanmoins moindre comparé au niveau initial de leurs témoins alimentaires ; alors que les

souris infectées sous un régime faible en fer montrent une diminution d'autant plus importante, également due à leur niveau initial, contrôle alimentation faible en fer sans infection (Figure 3A, 3B). L'étude de la ferritine chargée en fer sur un extrait protéique migré sur gel PAGE dans des conditions natives suivie d'une coloration Perl's et d'une amplification DAB, révèle que l'infection par *N. brasiliensis* induit une réduction de la charge en fer de la ferritine sous le régime standard, modéré, et fortement enrichi en fer, par opposition au groupe carencé en fer, qui semble augmenter la charge en fer de la ferritine avec l'infection. L'analyse par transfert western de la sous-unité de ferritine Ft-H ne semble pas montrer de différence entre les groupes infectés et non infectés (Figure 3D). Ce résultat indique que l'infection par *N. brasiliensis* entraîne une diminution de l'absorption des globules rouges par la rate, et suggère une réduction du mécanisme érythrophagocytaire. De plus, le régime alimentaire riche en fer associé à l'infection semble assurer un meilleur stock de fer splénique lors l'infection à *N. brasiliensis.*

Afin de mieux comprendre l'augmentation des taux de fer total détectés par le dosage ferrozine indépendamment de l'augmentation d'hémosidérine, un marquage des précurseurs érythroïdes par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs de surface CD71/Ter119 qui permettent de différencier les différents stades de maturation des globules rouges a été effectué au niveau de la rate. L'infection à *N. brasiliensis* induit une érythropoïèse extramédullaire avec tous les régimes alimentaires suivis. Les précurseurs érythroïdes précoces I et II semblent inchangés avec l'alimentation, cependant, on note une augmentation des précurseurs érythroïdes avancés III et IV dans les groupes infectés en condition alimentaire modérément ou fortement enrichies en fer par rapport au témoin infecté sous un régime standard. Le régime alimentaire carencé en fer semble induire une activité érythropoïétique dans la rate indépendamment de l'infection, celle-ci augmente davantage avec l'infection. Ce résultat suggère que lors d'une infection à *N. brasiliensis*, une érythropoïèse extramédullaire s'installe, cette dernière est probablement activée pour compenser un manque de synthèse d'érythrocytes observé dans des conditions d'anémie. De plus, les régimes enrichis en fer présentent une activité plus importante probablement en raison de l'alimentation qui fournit de plus grandes quantités de fer.

5. L'infection à *N. brasiliensis* entraîne une régulation intestinale du métabolisme du fer avec une libération accrue du fer des entérocytes

La charge parasitaire au niveau intestinal a été évaluée au jour 6 post-infection par dénombrement des parasites matures totaux présents au long de l'intestin. On remarque une diminution significative du nombre de vers dans les groupes infectés ayant reçu le régime carencé et modéré en fer comparés aux souris infectés sous un régime standard. Aucune différence dans le groupe ayant reçu le régime fort en fer comparé au groupe contrôle infecté sous une alimentation standard en fer n'a été notée (Figure 4A). Étant donné que les souris ont reçu la même dose parasitaire au jour 0, les résultats observés

peuvent être attribués à la différence des régimes alimentaire plus ou moins chargés en fer. La distribution générale du fer au niveau de l'intestin a ensuite été évaluée à l'aide d'une analyse histologique par coloration de Perl's intensifiée au DAB permettant de visualiser la présence des dépôts de fer sous forme de couleur brune. Différentes quantités de fer intestinal sont détectées en fonction des divers régimes alimentaires exposés. Le groupe ayant reçu le régime alimentaire standard présente une légère coloration brune due à l'absorption du fer contenue dans l'alimentation standard. Lorsque le régime alimentaire est pauvre en fer, la présence dans les entérocytes de ce dernier n'est pas perceptible, et ce, en raison de la quantité infime de fer alimentaire. Inversement, lors d'une alimentation modérément et fortement enrichie en fer, une forte absorption est observée représentée par une coloration brune nettement plus intense. Cette analyse qualitative par coloration de Perl's intensifiée au DAB montre des changements clairs dans la distribution intestinale du fer dans tous les groupes infectés. Les souris infectées, quel que soit le régime alimentaire, ont tendance à montrer une coloration brune plus faible indiquant une réduction du fer dans les entérocytes, à l'exception du régime riche en fer (Figure 4B). L'étude quantitative du fer intestinal par dosage colorimétrique en utilisant le chélateur de fer ferrozine, confirme l'observation histologique de la diminution du fer intestinal. De plus, on peut remarquer des déchirures au niveau du réseau capillaire constituant les villosités. D'une manière plus intéressante l'étude de la ferritine chargée en fer sur un extrait protéique migré sur gel PAGE dans des conditions natives suivie d'une coloration Perl's et d'une amplification avec DAB, ainsi que l'étude de l'expression protéique de la chaîne lourde de ferritine (Ft-H) analysée par western-blot, montrent que l'infection *N. brasiliensis* induit une diminution de l'expression de la ferritine chargée en fer, ainsi qu'une réduction des niveaux protéiques de Ft-H. Ainsi, l'infection *N. brasiliensis* induit une réduction des stocks de fer intestinaux (Figure 4C, 4D).

6. L'infection à *N. brasiliensis* entraîne une rétention hépatique en fer

Le foie est le site principal de stockage du fer, afin d'étudier l'effet de l'infection helminthique sur la distribution générale du fer, le taux de fer hépatique a été exploré par coloration de Perl's intensifiée au DAB, ainsi que par dosage à la ferozzine. On observe que les quantités de fer hépatique suivent les différents régimes. Nous notons également des dépôts de fer plus importants chez les souris infectées, ce qui suggère que l'infection à *N. brasiliensis* entraîne une rétention hépatique en fer (Figure 5A, 5B, 5C). De plus, l'infection conduit à une réduction de la masse du foie (Figure 5C).

Discussion

Les ankylostomes sont des nématodes parasites transmis par le sol (HST), qui causent l'ankylostomiase. Cette dernière est considérée comme maladie tropicale négligée (MTN), cependant, un sixième de la population mondiale, souffrent d'une ou plusieurs MTN, principalement répandues dans les pays émergeant, Afrique sub-saharienne, Amérique du Sud/ Centrale, et Asie (Loukas *et al.,* 2016). Les ankylostomes adultes peuvent résider pendant de nombreuses années dans l'intestin grêle de leurs hôtes, où ils sucent le sang et peuvent causer une anémie ferriprive (IDA). Le protocole thérapeutique propose des traitements anti-helminthiques associés à des suppléments de fer afin de restaurer au mieux l'anémie rapportée des ankylostomiases Asie (Tan *et al.,* 2017). Cependant, les avis divergent sur l'efficacité d'une thérapie par supplémentation en fer. Par ailleurs, les personnes vivant dans des zones à haut risque souffrent souvent d'anémie en raison d'une carence en nutriments ou de diverses autres conditions (Loukas *et al.,* 2016). Ainsi, les populations exposées à ce type d'infection se voient le plus souvent prescrire des suppléments de fer qui modifient probablement leurs réserves de fer basales internes. L'objet de la présente étude est de caractériser l'effet des modifications de l'apport nutritionnel en fer sur la réponse immune à l'ankylostome dans le modèle murin *Nippostrongylus brasiliensis (N. brasiliensis)*.

Nos résultats indiquent que la modification de la teneur en fer par voie alimentaire à des répercussions sur le processus inflammatoire et la réponse immune mis en jeu. Nos analyses ont effectivement montré une activation du processus d'érythropoïèse lors de l'infection, suggérant une demande de synthèse érythrocytaire comme mécanisme de compensation des pertes sanguines. De plus, nous avons remarqué une forte rétention de fer dans les leucocytes pulmonaire, accompagnés d'une augmentation de l'expression de la lipocaline-2 *(Lcn-2)* et d'une diminution de ferroportine *(Fpn).* Ces observations suggèrent une érythrophagocytose dans les poumons due aux pertes sanguines, mais aussi une rétention de fer dans les poumons. Parallèlement, la rate, site initial d'érythrophagocytose, montre une atténuation d'érythrophagocytose splénique, insinuant une arrivée moindre d'érythrocytes vers la rate.

L'apport modéré en fer sur une période prolongée conduit à une meilleure résistance aux dommages causés par l'infection *N. brasiliensis* aussi bien au niveau pulmonaire qu'intestinal. En effet, moins de vers parasitaires adultes ont été détectés au niveau de l'intestin. De plus, ce groupe présente moins de lésions pulmonaires, accompagnées d'un recrutement plus important de cellules immunitaire de type 2. Ce qui n'est pas observé avec l'apport excessif en fer. Les bénéfices apportés par une alimentation modérément enrichie sont annulés dans un contexte de forte teneur en fer. Cela peut être attribué à un scénario inverse, où c'est le ver parasite qui tire plus profit de la teneur élevée en fer. A l'inverse la déficience en fer induit une abolition de la réponse immune type 2 avec des dégâts pulmonaires plus prononcés et un nombre réduit de vers matures dans l'intestin. Les fortes lésions pulmonaires accompagnées de saignements abondants indiquent un contrôle inefficace de la phase

l'infection pulmonaire et, suggèrent donc des défauts de maturation du parasite. Les ankylostomes étant incapables de synthétiser l'hème, il est fort probable qu'ils dépendent de mécanismes d'acquisition exogène de l'hème. Il a en effet été rapporté que *N. brasiliensis* nécessite un apport sanguin très tôt dans son cycle de développement, ce qui indique que des altérations du métabolisme de l'hème modifient le cycle de vie parasitaire (Bouchery *et al.,* 2018).

Nos résultats montrent également que l'infection *N. brasiliensis* entraine une régulation interne du métabolisme du fer dans l'intestin, avec une importante libération du fer intestinal. Cette régulation a été attribuée en partie à des changements dans la régulation de l'expression de la ferritine, mais suggèrent aussi une expression différenciée de la ferroportine qui reste à démontrer. De plus, les niveaux de fer peuvent également induire un schift du microbiote intestinal (Deschemin *et al.,* 2016). Il se peut que la teneur en fer cumulée à l'infection induise une modification de la signature de la flore intestinale locale, qui à son tour conduit à des changements favorisant l'exportation ou la rétention du fer.

De plus, nos résultats montrent une rétention hépatique du fer lors de l'infection *N. brasiliensis*, ce qui suggère qu'en plus de l'anémie ferriprive rapporté, les infections helminthique pourraient conduire à des anémies inflammatoires, ces observations restent à mieux caractériser, notamment par l'évaluation de l'expression du transcrit de l'hepcidine hépatique et son niveau sérique et urinaire.

De nombreuses données existent sur les liens du métabolisme du fer dans des contextes pro-inflammatoire, notamment de réponse à la tuberculose, réponse antivirale, ou antipaludique (Agoro et Mura 2019 ; Nairz *et al.,* 2018). Cependant, on compte très peu d'études des effets du fer dans des modèles d'infection anti-inflammatoires. Cette étude est l'une des premières à aborder expérimentalement le lien entre la réponse immunitaire et l'infection parasitaire helminthique. Nos résultats apportent une preuve empirique d'un lien direct entre la teneur en fer alimentaire et la réponse immune mise en jeu. Cette étude a un impact sur les populations malnutries et infectées, et apportent de nouveaux éléments à prendre en compte dans la prise en charge des infections en considérant les interactions hôte-pathogène dans le métabolisme du fer afin d'adapter les thérapies anti-parasitaires proposées.

Liste des figures

Suppl Figure 1.

A. **Modèle expérimental d'étude.** Souris C57BL/6j, et différents régimes alimentaires suivis. J0 correspond au jour 0 de l'infection des souris. J6. Jour d'analyse.
B. **Système de Baermann d'extraction des *N. brasiliensis* L3.** A gauche, système de Baermann. En haut à droite, disposition de la culture fécale contenant les larves *N. brasiliensis* L3 et culot larvaire récupéré après 20 min de migration. En bas, Larve L3 observée au microscope optique grossissement 40X.

Figure 1. **Un apport modéré en fer améliore la phase d'inflammation pulmonaire à *N. brasiliensis,* et faible apport en fer l'exacerbe.**

A. Image représentative de l'aspect des poumons au jour 6 post-infection des animaux infectés par *N. brasiliensis* suivant les différents régimes alimentaires, standard, faible, modérément ou fortement enrichis en fer. Poids des poumons au jour 6 post-infection.
B. Sections histologiques des poumons après colorations H&E.
C. Sections histologiques des poumons à 3 µm après colorations de Perl's. Coloration bleue = fer, coloration rose = cytosol. Teneur en fer dans le tissu pulmonaire déterminée par dosage ferrozine et rapportée en ng de fer par mg de tissu sec.
D. Expression relative des gènes de réponse type 2, *Il-4, Il-13, Chil-3* ; des marqueurs de réparation tissulaire ; *Timp1, Rentla1*, et *Hmox1*, et des protéines du fer, *Fpn, Lcn2* déterminée par qPCR. L'espression des gènes a été déterminée selon la formule $2\Delta Ct$, normalisée par rapport au gène de référence *Gapdh, et* les souris non infectées sous un régime standard. Test de comparaison multiple ANOVA correction de Bonferroni (P-values<0.005), n=4, moyenne ± ESM.
E. Analyse par cytométrie en flux des lymphocytes T $CD4^+$ Th2 dans les poumons. Test de comparaison multiple ANOVA correction de Bonferroni (P-values<0.005), n=4, moyenne ± ESM.

Figure 2. **L'infection *N. brasiliensis* induit un statut anémique avec une demande érythropoïètique**

A. Image représentative des frottis du sang périphérique colorés avec May-Grunwald Giemsa.
B. Hématocrite RBC, dosage colormétrique de l'hémoglobine, ainsi que dosage des paramètres de fer sérique incluant, le fer sérique (SI) et le pourcentage de saturation de la transferrine (% TS).

Test de comparaison multiple ANOVA correction de Bonferroni (P-values<0.005), n=4, moyenne ± ESM.

C. Analyse par cytométrie en flux des précurseurs érythroïdes au niveau de la moelle osseuse. Le pourcentage relatif des stades I-IV de l'érythropoïèse, avec des proérythroblastes de stade précoce $CD71^{+}$/$Ter\text{-}119^{-}$ simples positifs de stade I (région I), stade II double positif $CD71^{+}$/$Ter\text{-}119^{+}$ érythroblastes basophiles de stade tardif (région II), $CD71^{low}$/$Ter\text{-}119^{-}$ érythroblastes polychromatiques et orthochromatiques (région III et IV) et $CD71^{-}$/$Ter\text{-}119^{high}$ (région IV). n=4, moyenne ± ESM.

D. Les cellules myéloïdes du sang périphérique, éosinophiles (EOS), neutrophiles (NP), lymphocytes (LYT) et de monocytes (Mono). n =4, moyenne ± ESM.

Figure 3. **L'infection *N. brasiliensis* induit une diminution du taux de fer splénique.**

A. Sections histologiques de la rate à 3 µm après colorations de Perl's. Coloration bleue = fer, coloration rose = cytosol.

B. Poids de la rate au jour 6 post-infection. Teneur en fer splénique déterminée par dosage ferrozine et rapportée en ng de fer par mg de tissu sec. n =4, moyenne ± ESM.

C. Coloration de la ferritine chargée en fer ferrique sur gel PAGE en conditions natives, à partir d'extraits de lysats cytosoliques natifs de rate. 40 ng de protéines de ont été chargés sur chaque piste de PAGE non dénaturant, et après électrophorèse, le gel a été directement coloré avec la solution de Perl's puis intensifié avec du DAB. Et western blot d'extraits cytosolique de la rate chargé sur gel SDS-PAGE dénaturant et immunobloté pour Ft-H et Gapdh.

D. Analyse par cytométrie en flux des précurseurs érythroïdes au niveau de la rate. Le pourcentage relatif des stades I-IV de l'érythropoïèse, avec des proérythroblastes de stade précoce $CD71^{+}$/$Ter\text{-}119^{-}$ simples positifs de stade I (région I), stade II double positif $CD71^{+}$/$Ter\text{-}119^{+}$ érythroblastes basophiles de stade tardif (région II), $CD71^{low}$/$Ter\text{-}119^{-}$ érythroblastes polychromatiques et orthochromatiques (région III et IV) et $CD71^{-}$/$Ter\text{-}119^{high}$ (région IV). n=4, moyenne ± ESM.

Figure 4. **L'infection *N. brasiliensis* induit une diminution du taux de fer intestinal.**

A. Évaluation de la charge des parasitaire matures intestinaux au jour 6 post-infection.

B. Sections histologiques de l'intestin à 3 µm après colorations de Perl's intensifié au DAB. Coloration brune = fer, coloration rose = cytosol.

C. Teneur en fer intestinale déterminée par dosage ferrozine et rapportée en ng de fer par mg de tissu sec. n =4, moyenne ± ESM.
D. Coloration de la ferritine chargée en fer ferrique sur gel PAGE en conditions natives, à partir d'extraits de lysats cytosoliques natifs de rate. 40 ng de protéines de ont été chargés sur chaque piste de PAGE non dénaturant, et après électrophorèse, le gel a été directement coloré avec la solution de Perl's puis intensifié avec du DAB. Et western blot d'extraits cytosolique de la rate chargé sur gel SDS-PAGE dénaturant et immunobloté pour Ft-H et Gapdh.

Figure 5. **L'infection *N. brasiliensis* conduit à une rétention du fer hépatique.**

A. Sections histologiques du foie à 3 µm après colorations de Perl's intensifié au DAB. Coloration brune = fer, coloration rose = cytosol.
B. Poids du foie au jour 6 post-infection
C. Teneur en fer hépatique déterminée par dosage ferrozine et rapportée en ng de fer par mg de tissu sec. n =4, moyenne ± ESM.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement le Dr. Benjamin G. Dewals (Université de Liège) pour les larves *Nippostrongylus brasiliensis.* Cette étude a été financé par le CNRS, l'Université d'Orléans, et la Région Centre Val de Loire, France.

Bibliographie

Agoro, R., & Mura, C. (2019). Iron Supplementation Therapy, A Friend and Foe of Mycobacterial Infections Pharmaceuticals, 12(2), 75. https://doi.org/10.3390/ph12020075

Agoro, R., Taleb, M., Quesniaux, V. F. J., & Mura, C. (2018). Cell iron status influences macrophage polarization. PLoS ONE, 13(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921

Armitage, A. E., & Moretti, D. (2019). The Importance of Iron Status for Young Children in Low- and Middle-Income Countries: A Narrative Review. Pharmaceuticals, 12(2). https://doi.org/10.3390/ph12020059

Bouchery, T., Filbey, K., Shepherd, A., Chandler, J., Patel, D., Schmidt, A., Camberis, M., Peignier, A., Smith, A. A. T., Johnston, K., Painter, G., Pearson, M., Giacomin, P., Loukas, A., Bottazzi, M.-E., Hotez, P., & LeGros, G. (2018). A novel blood-feeding detoxification pathway in Nippostrongylus brasiliensis L3 reveals a potential checkpoint for arresting hookworm development. PLoS Pathogens, 14(3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006931

Deschemin, J.-C., Noordine, M.-L., Remot, A., Willemetz, A., Afif, C., Canonne-Hergaux, F., Langella, P., Karim, Z., Vaulont, S., Thomas, M., & Nicolas, G. (2016). The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. The FASEB Journal, 30(1), 252-261. https://doi.org/10.1096/fj.15-276840

Hotez, P. J., Beaumier, C. M., Gillespie, P. M., Strych, U., Hayward, T., & Bottazzi, M. E. (2016). Advancing a vaccine to prevent hookworm disease and anemia. Vaccine, 34(26), 3001-3005. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.078

Jabara, H. H., Boyden, S. E., Chou, J., Ramesh, N., Massaad, M. J., Benson, H., Bainter, W., Fraulino, D., Rahimov, F., Sieff, C., Liu, Z.-J., Alshemmari, S. H., Al-Ramadi, B. K., Al-Dhekri, H., Arnaout, R., Abu-Shukair, M., Vatsayan, A., Silver, E., Ahuja, S., Geha, R. S. (2016). A missense mutation in TFRC, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency. Nature Genetics, 48(1), 74-78. https://doi.org/10.1038/ng.3465

Loukas, A., Hotez, P. J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J. S., Correa-Oliveira, R., Croese, J., & Bethony, J. M. (2016). Hookworm infection. Nature Reviews Disease Primers, 2(1), 1-18. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.88

Nairz, M., Dichtl, S., Schroll, A., Haschka, D., Tymoszuk, P., Theurl, I., & Weiss, G. (2018). Iron and innate antimicrobial immunity—Depriving the pathogen, defending the host. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 48, 118-133. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.03.007

Pearson, M. S., Tribolet, L., Cantacessi, C., Periago, M. V., Valero, M. A., Valerio, M. A., Jariwala, A. R., Hotez, P., Diemert, D., Loukas, A., & Bethony, J. (2012). Molecular mechanisms of hookworm disease: Stealth, virulence, and vaccines. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 130(1), 13-21. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.029

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research, 29(9), e45-e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45

Stoltzfus, R. J., Kvalsvig, J. D., Chwaya, H. M., Montresor, A., Albonico, M., Tielsch, J. M., Savioli, L., & Pollitt, E. (2001). Effects of iron supplementation and anthelmintic treatment on motor and language development of preschool children in Zanzibar: Double blind, placebo controlled study. BMJ: British Medical Journal, 323(7326), 1389.

Tan, X., Cheng, M., Zhang, J., Chen, G., Liu, D., Liu, Y., & Liu, H. (2017). Hookworm Infection Caused Acute Intestinal Bleeding Diagnosed by Capsule: A Case Report and Literature Review. The Korean Journal of Parasitology, 55(4), 417-420. https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.4.417

Weiss, G. (2002). Iron and immunity: A double-edged sword. European Journal of Clinical Investigation, 32(1), 70-78. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.0320s1070.x

Yarosz, E. L., Ye, C., Kumar, A., Black, C., Choi, E.-K., Seo, Y.-A., & Chang, C.-H. (2020). Cutting Edge: Activation-Induced Iron Flux Controls CD4 T Cell Proliferation by Promoting Proper IL-2R Signaling and Mitochondrial Function. The Journal of Immunology. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901399

Figure 1

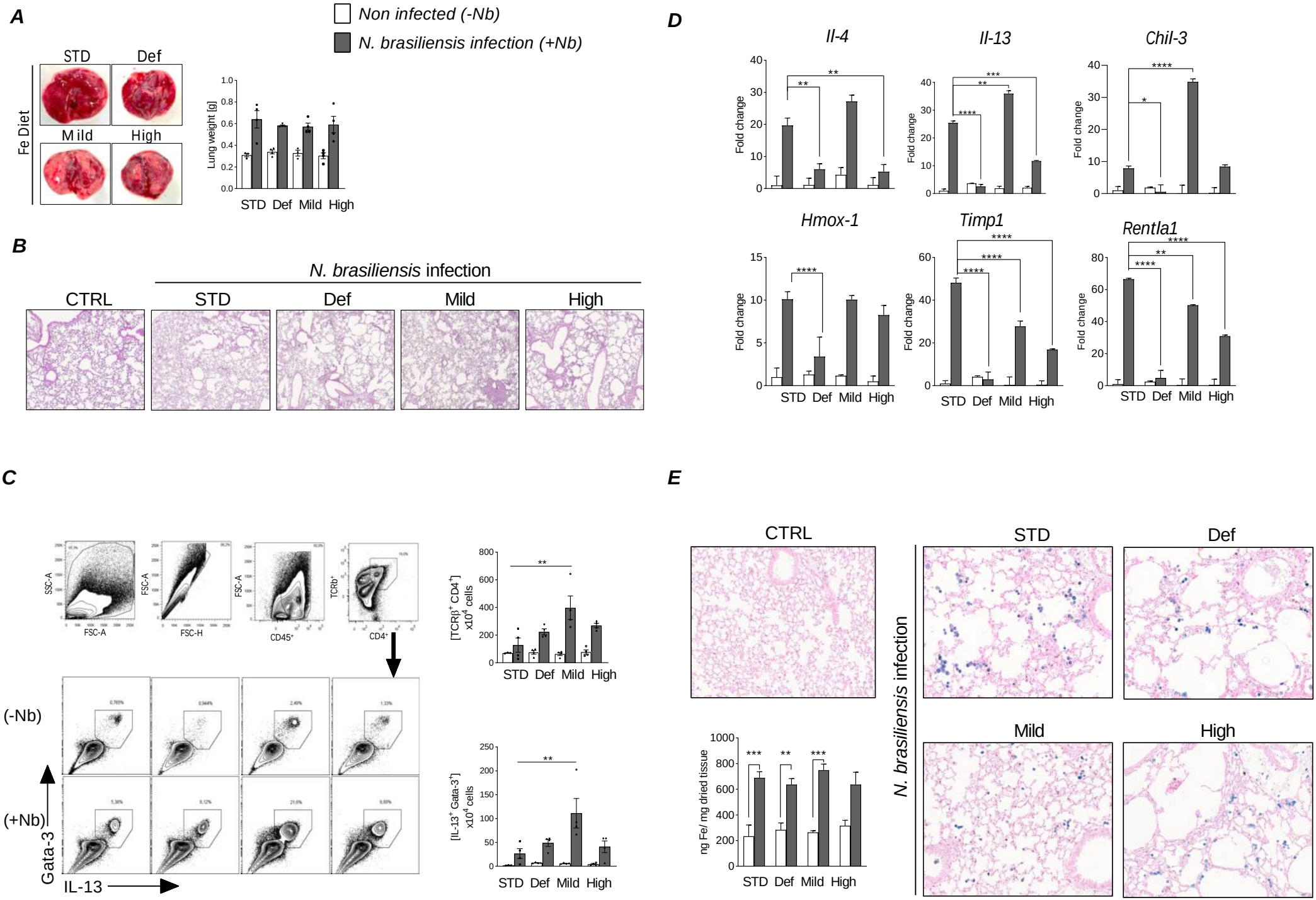

A
Non infected (-Nb)
N. brasiliensis infection (+Nb)
STD
Def
Mild
High
Fe Diet
Lung weight [g]
STD Def Mild High
B
N. brasiliensis infection
CTRL
STD
Def
Mild
High
C
SSC-A
FSC-A
FSC-H
CD45+
TCRb+
CD4+
(-Nb)
(+Nb)
Gata-3
IL-13
[TCRβ+ CD4+] x10^4 cells
[IL-13+ Gata-3+] x10^4 cells
D
Il-4
Il-13
Chil-3
Hmox-1
Timp1
Rentla1
Fold change
E
CTRL
N. brasiliensis infection
ng Fe/ mg dried tissue

Figure 2

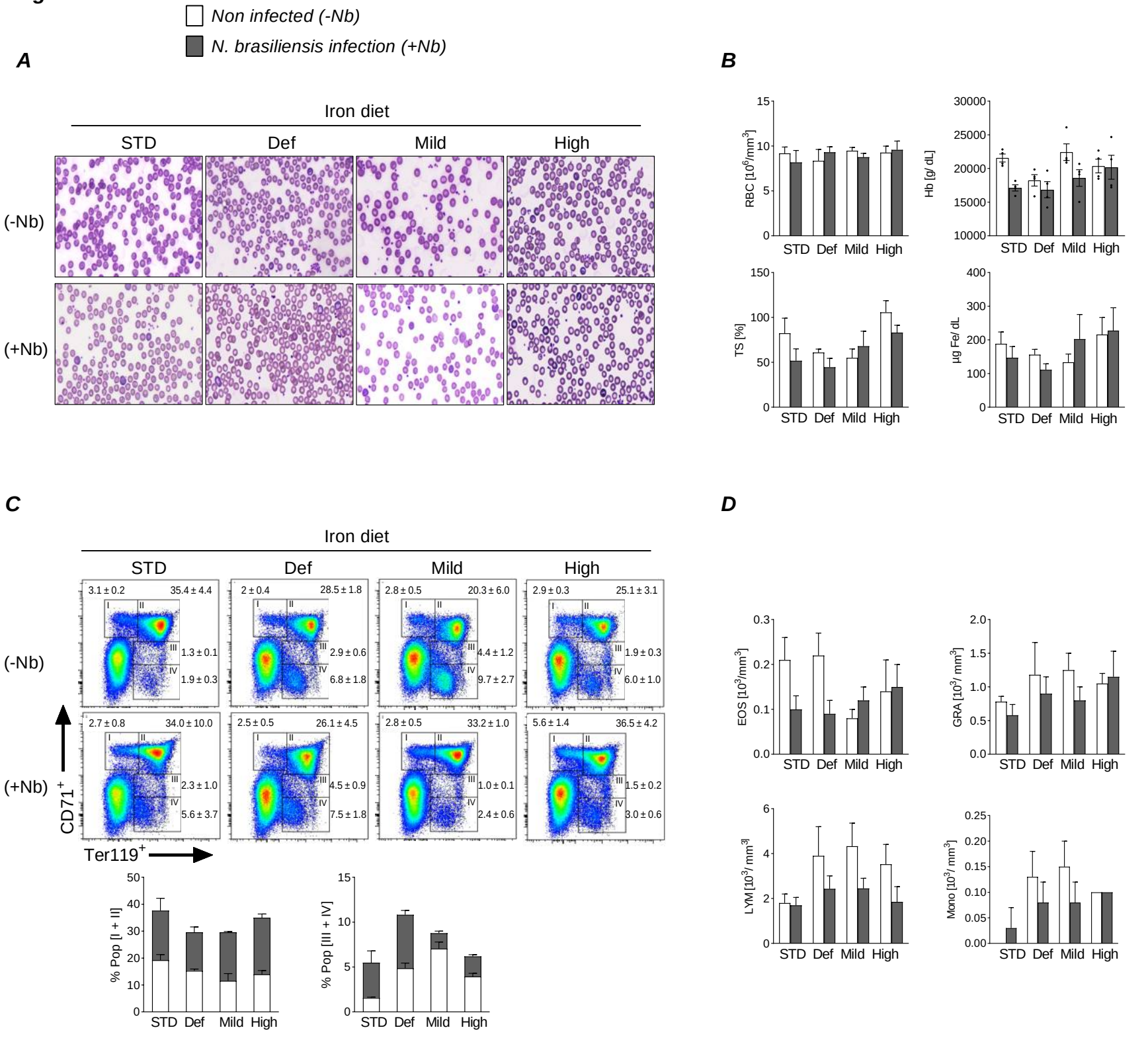
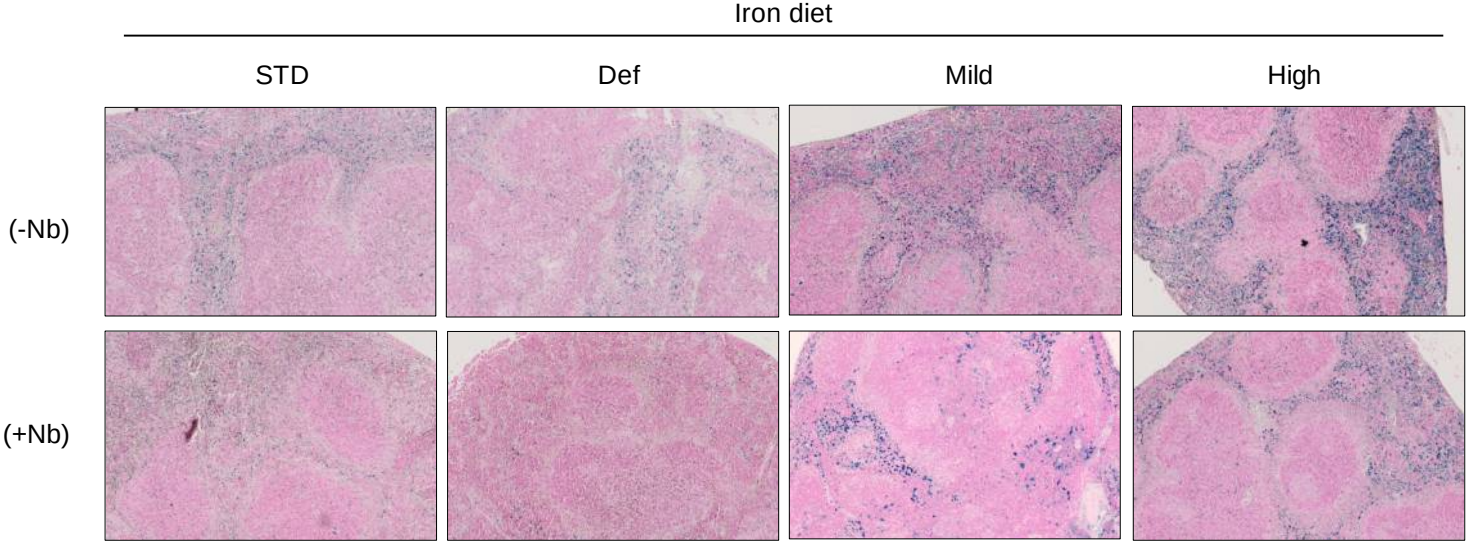

Non infected (-Nb)
N. brasiliensis infection (+Nb)
A
Iron diet
STD
Def
Mild
High
(-Nb)
(+Nb)
B
RBC [10^6/mm^3]
Hb [g/ dL]
TS [%]
µg Fe/ dL
C
D
CD71+
Ter119+
% Pop [I + II]
% Pop [III + IV]
EOS [10^3/mm^3]
GRA [10^3/ mm^3]
LYM [10^3/ mm^3]
Mono [10^3/ mm^3]

Figure 3

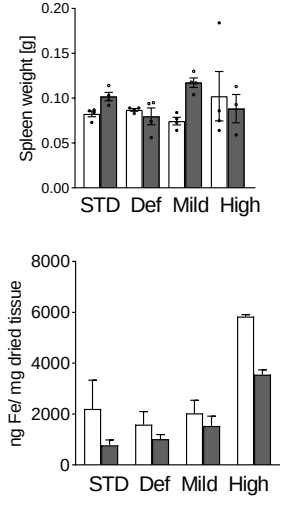
Non infected (-Nb)

N. brasiliensis infection (+Nb)

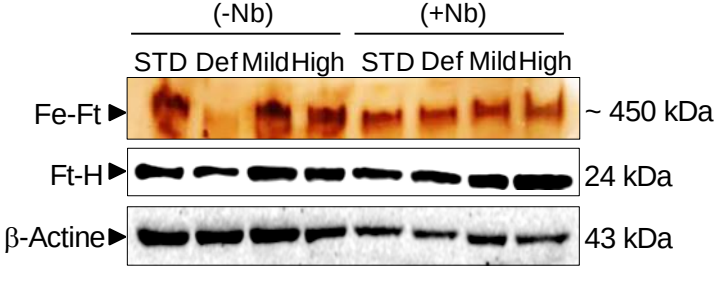
A



B



C



D

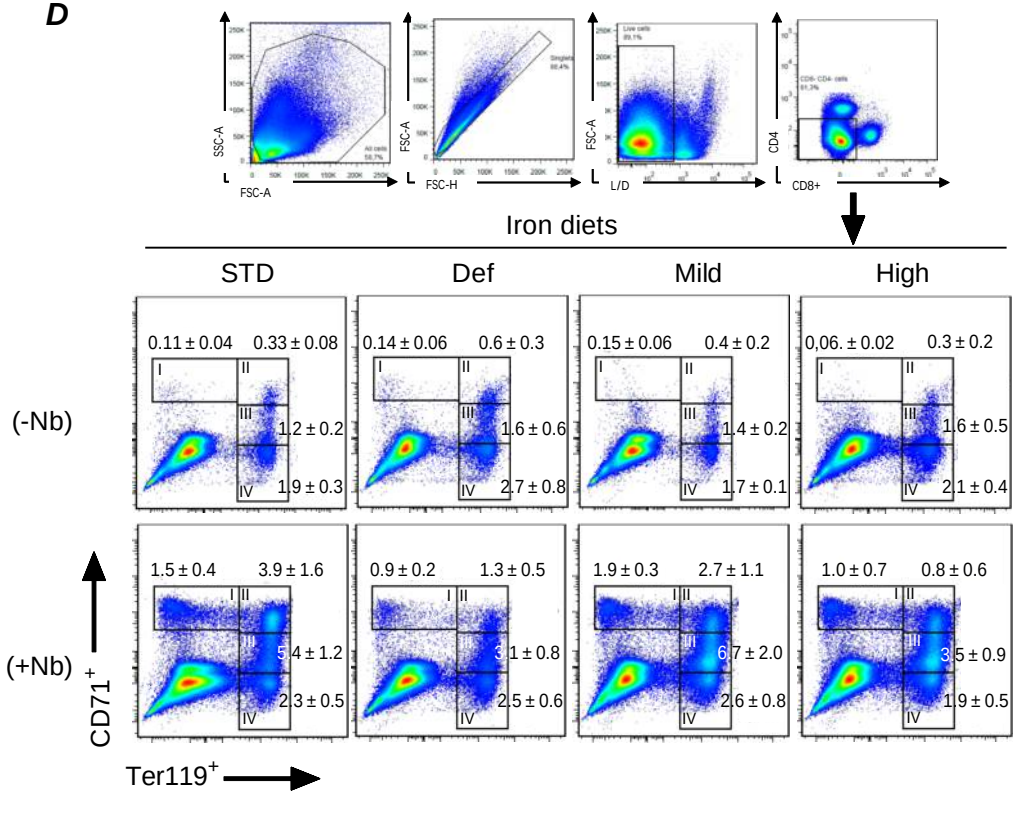


Figure 4

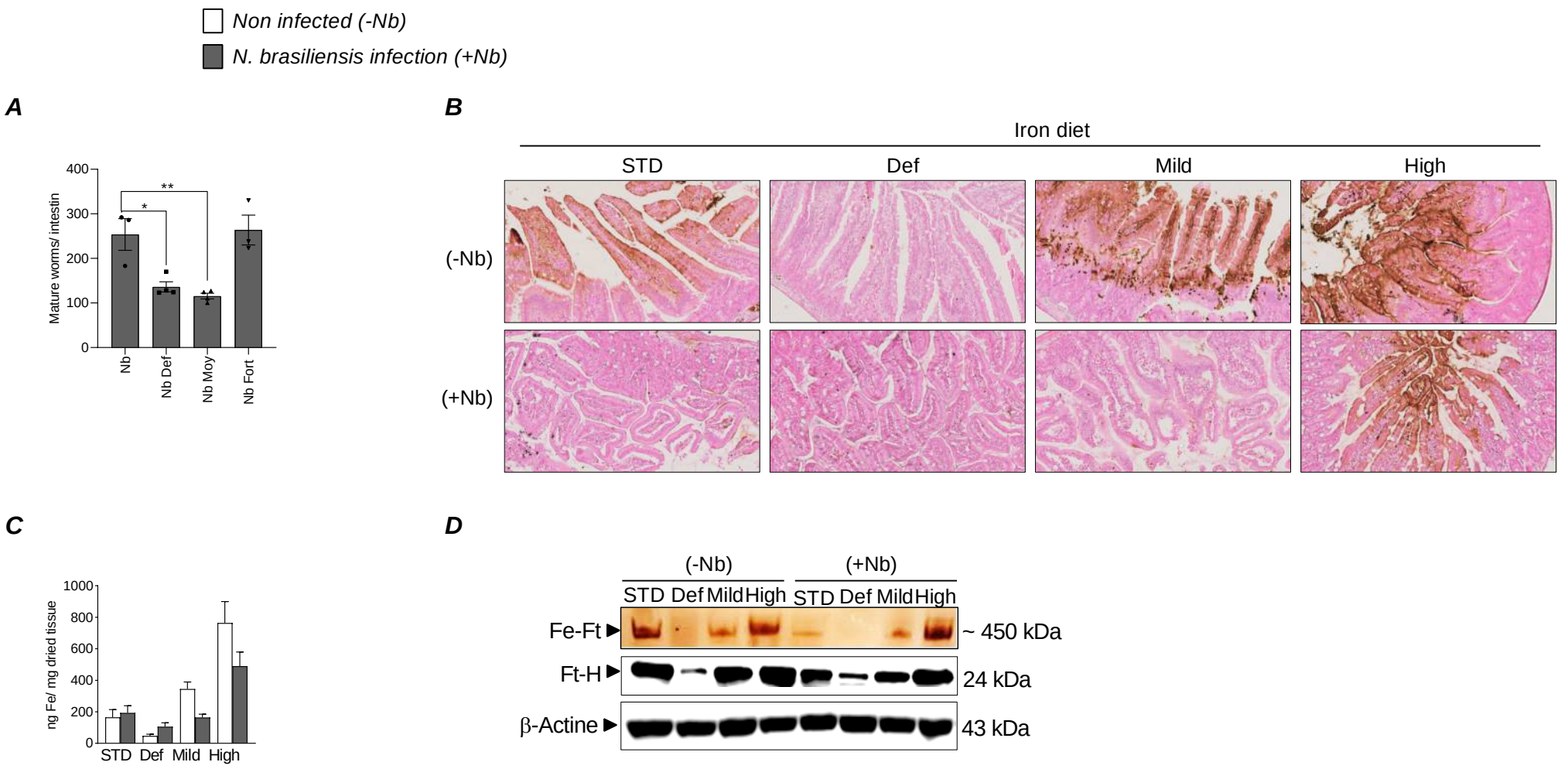
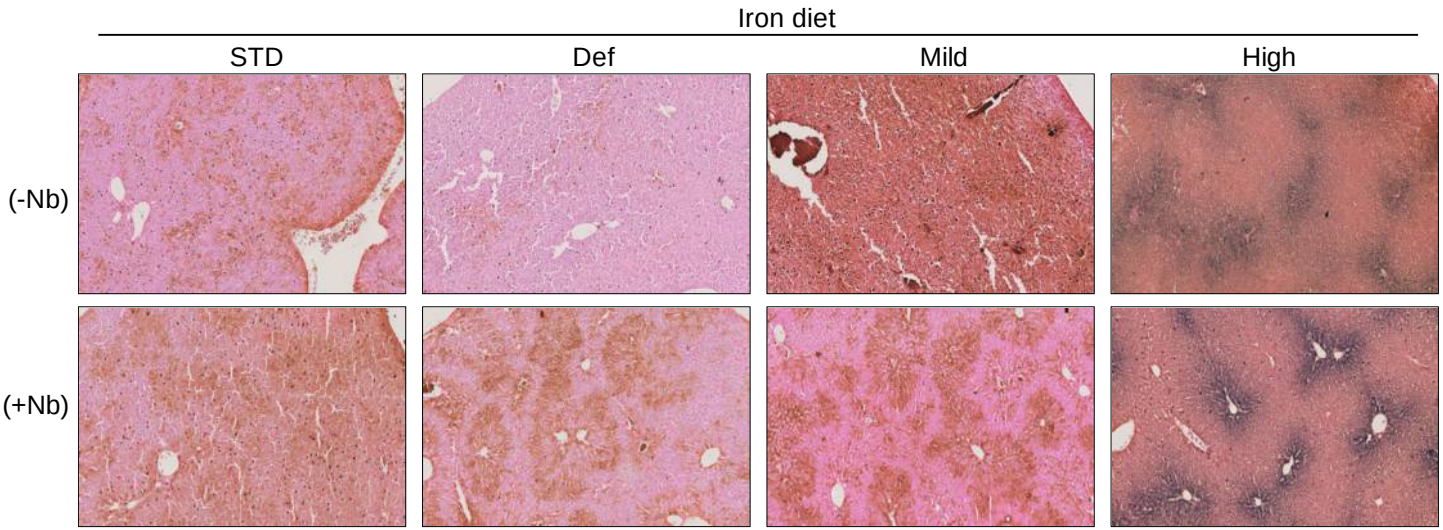

Non infected (-Nb)
N. brasiliensis infection (+Nb)
A
Mature worms/ intestin
400
300
200
100
0
**
*
Nb
Nb Def
Nb Moy
Nb Fort
B
Iron diet
STD
Def
Mild
High
(-Nb)
(+Nb)
C
ng Fe/ mg dried tissue
1000
800
600
400
200
0
STD
Def
Mild
High
D
(-Nb)
(+Nb)
STD Def Mild High STD Def Mild High
Fe-Ft
~ 450 kDa
Ft-H
24 kDa
β-Actine
43 kDa

Figure 5

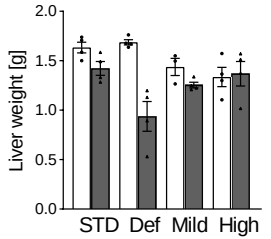
Non infected (-Nb)

N. brasiliensis infection (+Nb)

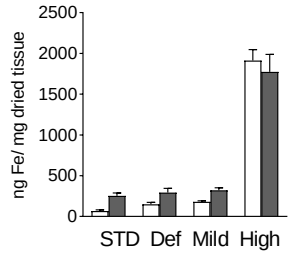
A



B



C



Supplemental figure 1

A

500 vers L3 s.c

Régime standard en fer
(8 semaines - 280 mg/ kg)

Régime modérément enrichi en fer
(8 semaines - 2.5 mg/ kg)

Régime fortement enrichi en fer
(2semaines - 25 g/ kg)

Régime déficient en fer
(2 semaines - 6 mg/ kg)

Analyses
Paramètres du fer
Réponse inflammatoire

B

DISCUSSION

Tremblez, humains, au sujet de n'importe quel sujet. Songez que vous avez des opinions, des convictions, des idées nettes, mais songez à tout ce à quoi vous n'avez jamais songé dans le domaine des choses mêmes auxquelles vous avez le plus réfléchi. Craignez ce à quoi vous auriez pu penser, à quoi vous allez peut-être penser, et n'avez jamais pensé, et qui peut illuminer par le travers l'idée dont vous êtes captif, qui vous semble la seule et la bonne, et qui va se trouver naïve dans l'instant même. Paul Valéry

1. **Partie 1.** Autophagie et métabolisme du fer

Ce travail avait pour premier objectif de préciser les mécanismes de régulation de l'axe hepcidine - ferroportine en explorant conjointement les mécanismes d'homéostasie cellulaire et systémique du fer. Les macrophages sont le site d'un trafic de fer permanent impliquant son entrée, son stockage, ainsi que sa mobilisation extracellulaire, et donc jouent un rôle prépondérant dans ces échanges.

Afin d'établir le rôle du métabolisme du fer dans les macrophages et l'homéostasie systémique du fer, nous avons développé un nouveau modèle de souris viables déficientes pour le gène de l'autophagie *Atg5* spécifiquement au niveau des macrophages, modèle murin d'invalidation conditionnelle $Atg5^{flox/flox}$ *Lys-M Cre*. L'étude de la caractérisation du phénotype de ces souris a permis d'établir un lien entre la régulation cellulaire du fer dans les macrophages et l'homéostasie systémique.

a. L'altération de l'autophagie dans les macrophages entraîne une modification de la distribution du fer cellulaire

L'étude *in vitro* sur macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDMs), a révélé que l'invalidation du processus de l'autophagie affecte le turn-over de la ferroportine, ainsi que la distribution cellulaire du fer des macrophages. Le modèle d'érythrophagocytose des BMDMs $Atg5^{-/-}$ montre un fort apport de ferroportine à partir des globules rouges, suivi d'une relocalisation dans les agrégats périnucléaires avant d'être dégradée. L'autophagie, est l'un des processus cataboliques pro-survie, destiné à délivrer les composants intracellulaires aux lysosomes pour la dégradation ou le recyclage de leurs composants, il a lieu en réponse à des stimuli de stress et permet à la cellule de recycler ses constituants et organites. L'autophagie basale, constitutive même en conditions riches en nutriments sert de contrôle de qualité pour dégrader les agrégats de protéines, les organites et les agents pathogènes (Hayat 2017). L'autophagie serait ainsi nécessaire pour éliminer l'excès de ferroportine et maintenir des niveaux d'expression adéquats.

Les macrophages déficients en autophagie $Atg5^{-/-}$ ne montrent pas de défaut d'entrée de fer, ni de stockage et de mobilisation du fer. Ils se caractérisent par une faible teneur en fer labile chélatable, corrélés à des niveaux élevés de TfR1 membranaire, suggérant le sensing de la déficience par le système IRP/IRE. Cette déficience en fer cellulaire est aussi associée à un très bas niveau du transcrit de l'hepcidine dans les macrophages. L'ensemble de nos observations suggèrent un état de déplétion en fer des macrophages déficients en autophagie, et indiquent que la forte expression de la ferroportine

localisée au niveau de la membrane plasmique exporterait le fer de manière continue vers le milieu extracellulaire.

L'autophagie joue un rôle prépondérant dans le turn-over de certaines protéines, et semble donc impliquée dans celui de la ferroportine. Il a été rapporté que la mutation de la maladie ferroportine dominante conduit à une accumulation de la protéine dans les vésicules intracellulaires endocytaires des macrophages PBMCs humains et dans des conditions de surcharge en fer à une relocalisation moins efficace de la ferroportine vers la membrane plasmique entraînant une accumulation de fer dans les macrophages (Sabelli *et al.* 2017). En outre, les modèles *in vitro* exprimant des transgènes de la ferroportine ont apporté un modèle d'action impliquant l'activité de cet exportateur, notamment *via* sa principale régulation post-traductionnelle négative par l'hepcidine (Nemeth *et al.* 2004). De plus, une présence supranucléaire de ferroportine a été rapportée chez des souris saines, suggérant un rôle supplémentaire de la ferroportine. Cette expression intracellulaire a été associée à un rôle possible de la ferroportine dans le mouvement vers les organites ou les structures vésiculaires lors de l'absorption du fer (D'Anna *et al.* 2009).

Nos résultats ont montré que les mécanismes d'apport de fer par endocytose TfR1 dépendant et par érythrophagocytose ne sont pas affectés par les mécanismes de déficience en autophagie. Cependant, les macrophages *Atg5*$^{-/-}$ présentent un mécanisme plus lent de dégradation de fer héminique et de son stockage dans la ferritine. Le fer non héminique est stocké dans le complexe de ferritine, la quantité de cette dernière est principalement liée à la concentration de fer, cependant, lorsque le niveau de fer, est élevé, les complexes de ferritine chargés de fer se transforment en complexes d'hémosidérine, structures entourées de membrane produites après une dégradation lysosomale. L'analyse *in vitro* des cellules *MEF-Atg5* déficientes a montré qu'en conditions de déplétion en fer, la dégradation lysosomale autophagie dépendante est nécessaire à la délivrance du fer à partir de la ferritine (Asano *et al*. 2011). Par la suite, le processus a été décrit comme empruntant la voie d'autophagie sélective *via* NCOA4. (Bellelli *et al.* 2016). En conditions de surcharge en fer, les lysosomes sont incapables de digérer complètement la ferritine et perdent leur efficacité à exporter le fer vers le cytosol, favorisant la formation d'hémosidérine (Asano *et al.* 2011). Nos résultats obtenus sur *BMDMs-Atg5*$^{-/-}$ montre en effet un excès de fer-ferritine malgré un export marqué du fer cellulaire et une déficience de fer intracellulaire. Ces résultats suggèrent que l'autophagie serait nécessaire à la formation des vésicules membranées d'hémosidérine.

Un autre rapport suggère que dans des conditions de déplétion cellulaire en fer induites par une surexpression de ferroportine ou par un traitement au chélateur, la dégradation de la ferritine opère aussi de manière protéasomique, où la libération du fer de la ferritine précède sa dégradation protéasomale (De Domenico *et al.* 2006). Dans une étude sur un modèle d'anémie induite par la phénylhydrazine (PHZ), situation expérimentale conduisant à une augmentation de la demande érythropoïétique, il a été observé que les souris saines présentent une colocalisation ferroportine-hémosidérine, principalement

au niveau cytoplasmique, tandis que les animaux anémiques montrent une redistribution de la ferroportine au niveau de la membrane cellulaire. Cette observation suggère que l'anémie induit des changements adaptatifs dans l'expression de la ferroportine passant par un transport vésiculaire qui suit celui de l'hémosidérine (Sabelli *et al.* 2017). Il a également été rapporté que la protéine de fusion vacuolaire Mon1 est impliquée dans le trafic de la ferroportine à la surface des macrophages, ainsi que dans le trafic d'autres molécules de surface cellulaire non liés au métabolisme du fer (Wang *et al.* 2007). De plus, un récent rapport suggère l'implication de l'axe tet1-RNF217, déméthylase, ubiquitine ligase E3, respectivement, dans la régulation de la ferroportine (Jiang *et al.* 2021). Entre autre, l'importance des interconnexions entre l'autophagie et les voies endosomales sont également décrites dans d'autres contextes comme celui de l'absorption du glucose, où l'autophagie dicte le trafic de Glut1 pour l'absorption extracellulaire des nutriments, observation faite *in vitro* sur des lignées MEF autophagie déficientes (Roy *et al.* 2017).

Étant donné que les macrophages sont des cellules sensibles à la teneur en fer, il est fort probable que ce sont ces mêmes cellules qui régulent leurs niveaux d'expression d'hepcidine afin de permettre un turnover correct des niveaux de ferroportine.

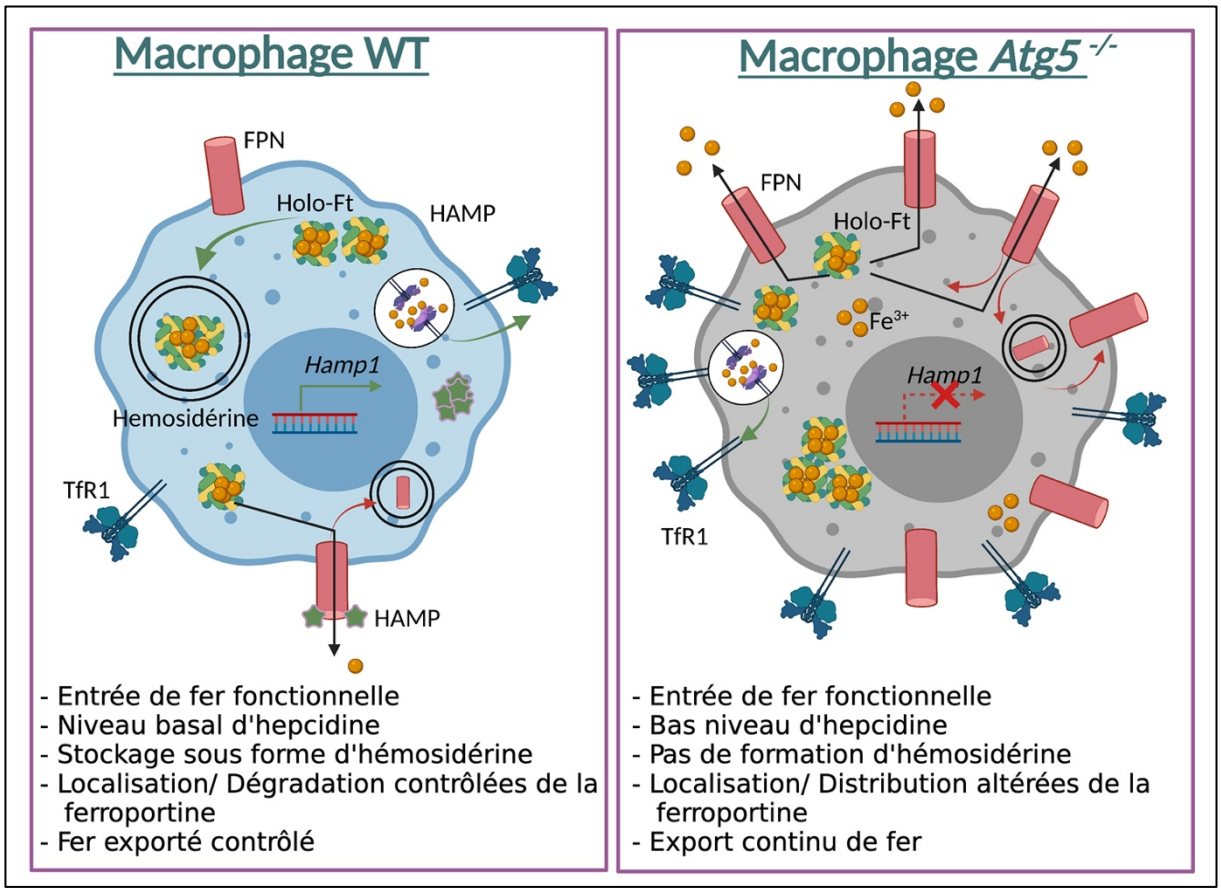


Figure 40. *Représentation schématique récapitulant le phénotype des macrophages WT vs. Atg5$^{-/-}$. Hamp (Hepcidine), Fpn (ferroportine), Ft (ferritine), TfR1 (Récepteur à la transferrine), Fe^{3+}présenté en jaune.*

b. La perturbation du processus d'autophagie au niveau des macrophages est suffisante pour induire une surcharge généralisée en fer

Notre modèle de souris *Atg5 LysM Cre*, ne montre aucun problème de viabilité ou de développement, cependant, il présente une accumulation excessive de fer dans le foie, ainsi que dans d'autres tissus parenchymateux. Cette accumulation est accompagnée d'une absence de stockage de fer dans les macrophages de la rate, ainsi qu'une absence de fer dans les entérocytes duodénaux. Ce phénotype rappelle celui de l'hémochromatose, et suggère donc un rôle des macrophages dans la régulation systémique du fer.

Malgré la faible teneur en fer observé dans les macrophages spléniques des souris *Atg5 LysM Cre* documentée par coloration de Perl's, ces animaux présentaient des niveaux élevés de fer labile. Le dosage du fer total a montré une quantité de fer plus élevées dans la rate des souris *Atg5 LysM Cre* par rapport à celles des souris de type sauvage, alors que les niveaux de ferritine ne montrent aucune différence entre les deux génotypes. L'ajout d'une étape d'oxydation H_2O_2 avant coloration Perl's du protocole de routine permet de détecter un niveau de fer plus élevé chez les animaux *Atg5 LysM Cre*. Ainsi, cette observation pourrait refléter une libération plus lente du fer aussi observée *in vitro* dans les expériences d'érythrophagocytose ou une érythropoïèse plus active dans la rate.

Les souris *Atg5 LysM Cre* ne présentent aucune différence de paramètres hématologiques ou d'anémie. Cependant, l'évaluation des précurseurs érythroïdes dans la rate a montré que les souris *knock-out* révèlent une érythropoïèse extramédulaire. De même, le processus d'érythropoïèse est augmenté dans la moelle osseuse des animaux *Atg5 LysM Cre* par rapport aux animaux sauvages, les deux observations convergent avec l'apparition de précurseurs érythroïdes immatures dans le sang en raison de la sur-activation du processus érythropoïétique.

De plus, les paramètres de fer sanguin sont augmentés chez ces souris *Atg5 LysM Cre*, suggérant une mobilisation et une circulation continues du fer, qui provoque un transit anormal entre les différents compartiments d'absorption, de stockage et d'utilisation. Ce résultat sous-entend une absence de signal de communication entre ces différents niveaux de régulation qui se traduit par un échange de fer altéré au niveau systémique. Les défauts génétiques liés au manque d'hepcidine (HAMP1, HFE, TfR, HJV et BMP) conduisent à une expression incontrôlée de la ferroportine sur la membrane plasmique des macrophages et des entérocytes et une augmentation des indices de fer sérique qui favorisent l'absorption du fer principalement dans les hépatocytes. La ferroportine mutante qui ne répond pas à l'hepcidine donne un phénotype similaire. L'analyse de l'expression de l'hepcidine dans les souris *Atg5 LysM Cre* montre une augmentation de l'expression du transcrit *Hamp1* hépatique, qui est en corrélation avec celle de *Id1*, ce qui est compatible avec la surcharge en fer généralisée. Cependant, l'expression de

la ferroportine au niveau de la membrane plasmique des entérocytes et des macrophages est anormalement élevée. L'augmentation de l'hepcidine hépatique bien qu'augmenté chez les souris *Atg5-LysM Cre*, ne semble pas corréler avec les quantités de fer accumulés, et ne parvient pas à limiter l'exportation de fer médiée par la ferroportine à partir des macrophages et des entérocytes, suggérant l'implication d'un mécanisme supplémentaire indépendant de la signalisation hépatique de l'hepcidine. En effet, l'analyse du transcrit de l'hepcidine au niveau de la rate montre une expression significativement réduite de *Hamp1* splénique chez les animaux *Atg5 LysM-Cre* comparés aux animaux sauvages. Ainsi, les animaux *Atg5 LysM-Cre* révèlent un rôle prépondérant de l'hepcidine splénique illustrant effectivement l'importance de la prise en considération de l'effet autocrine/paracarine dans les mécanismes d'homéostasie du fer.

Une série de défauts génétiques comprenant DMT1$^{-/-}$, STEAP3$^{-/-}$, NCO4$^{-/-}$, IRP2$^{-/-}$, l'acéruloplasminémie, ainsi que l'hypo-transferrinémie et la maladie de la ferroportine dominante sont caractérisés par une diminution de la mobilisation du fer qui compromet l'hématopoïèse mais conduit à une surcharge tissulaire en fer. Cela est probablement due aux mécanismes compensatoires d'absorption intestinale de fer par les entérocytes. La régulation systémique du fer centralisée sur l'activité hépatique de l'hepcidine est en contradiction avec les phénotypes de ces modèles *knock-out*. Par conséquent l'idée d'un mode d'action autocrine-paracarine prend de plus en plus d'ampleur (Gunshin *et al.* 2005 ; Sabelli *et al.* 2017).

Comme la coloration Perl's met en évidence les complexes d'hémosidérine, la faible coloration rapportée dans les macrophages des animaux *Atg5 Lys-M Cre* suggère également un défaut de formation d'hémosidérine. Ces résultats rejoignent les observations effectuées *in vitro.*

Il a récemment été proposé que le macrophage ferrostat (Winn *et al.* 2020), sensible aux taux de fer environnants régulerait la disponibilité du fer dans le microenvironnement local afin de maintenir ses besoins propres en fer mais aussi la demande systémique du fer. Le présent travail sur souris *Atg5 LyM Cre* montre que les réponses autophagiques opérant spécifiquement dans les cellules myéloïdes sont des événements clés pour soutenir l'homéostasie systémique et cellulaire du fer, et rejoint cette hypothèse du macrophage ferrostat.

Chez la souris, l'invalidation des gènes de l'autophagie au niveau systémique induisent des létalités à différents stades de développement, certaines mutations conduisent à une mort *in utero*, certaines à une mort peu après la naissance, tandis que d'autres mutations n'entraînent aucune anomalie évidente. Les souris déficientes en gènes *Atg* impliqués dans le système de conjugaison Atg12 et Atg8, à savoir (*Atg3*$^{-/-}$*, Atg5*$^{-/-}$*, Atg7*$^{-/-}$*, Atg12*$^{-/-}$*, Atg16*$^{-/-}$*)* meurent 24 heures après la naissance. Cette létalité précoce confirme l'importance du processus d'autophagie pendant la période néonatale (Gunshin *et al.*

2005). En effet, l'autophagie semble jouer un rôle adaptatif afin de fournir les nutriments nécessaires aux premiers stades après la naissance pour maintenir l'état nutritionnel pendant la période de famine néonatale. Le sauvetage par expression spécifiques de l'autophagie dans le cerveau sur les knock-out Atg5 total, modèle *Eno2/Nse-Atg5*, exprimant Atg5 uniquement dans le cerveau, suggère que la létalité précoce est principalement due à un dysfonctionnement neuronal associé à l'échec de l'allaitement. Et bien que la carence en autophagie dans les autres organes ne soit pas fatale pendant au moins plusieurs mois, elle s'avère néanmoins jouer un rôle dans d'autres aspects métaboliques (Yoshii *et al.* 2016). Les animaux *Eno2/Nse-Atg5* présentaient plusieurs anomalies sous-jacentes, les deux principales étant liées à l'hypogonadisme et à l'anémie hypochrome. L'anémie rapporté dans ce modèle était en partie due à une absorption réduite du fer de l'intestin, avec une dérégulation transcriptionnelle des gènes liés à l'absorption du fer à savoir, cytochrome b duodénal, transporteur de métaux divalent 1 et ferroportine, qui conduisent à une dérégulation des apports hématopoïétiques (Yoshii *et al.* 2016). Par ailleurs, les délétions tissues spécifiques des protéines de l'autophagie permettent également de surmonter la létalité causée par les délétions à l'échelle de l'organisme entier et fournissent des outils incontournables dans l'étude d'un ensemble de mécanismes sous-jacents fondamentaux à la physiologie cellulaire (Mijaljica *et al.* 2011 ; Mizushima et Levine 2010).

Plusieurs études ont déjà rapporté le rôle potentiel que pourrait jouer l'autophagie dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et plus particulièrement dans les fonctions de l'érythropoïèse. En effet, la perturbation de l'autophagie chez la souris conduit à l'accumulation anormale des mitochondries dans de nombreux types cellulaires. Les souris *Vav-Cre-Atg7*, qui n'expriment pas le gène *Atg7* au niveau du système hématopoïétique, ont des anémies sévères dues à des défauts d'élimination mitochondriale et des anomalies dans le développement des cellules érythroïdes (Mortensen *et al.* 2010 ; Mortensen *et al.* 2011). De même, il a été montré que l'autophagie joue un rôle important dans la régulation de la maturation des cellules érythroïdes à la fois i*n vitro* sur la lignée cellulaire K562, de la leucémie myéloïde, et *in vivo* sur le modèle *Vav-Cre-Atg7* (Cao *et al.* 2016).

Notre modèle conditionnel de déficience en autophagie dans les macrophages a démontré un lien entre les deux niveaux de régulation cellulaire et systémique en fer. En effet, la perturbation de la distribution de fer au niveau local dans ces cellules a conduit à des changements majeurs à l'échelle systémique, avec l'apparition d'un phénotype de type hémochromatose-like.

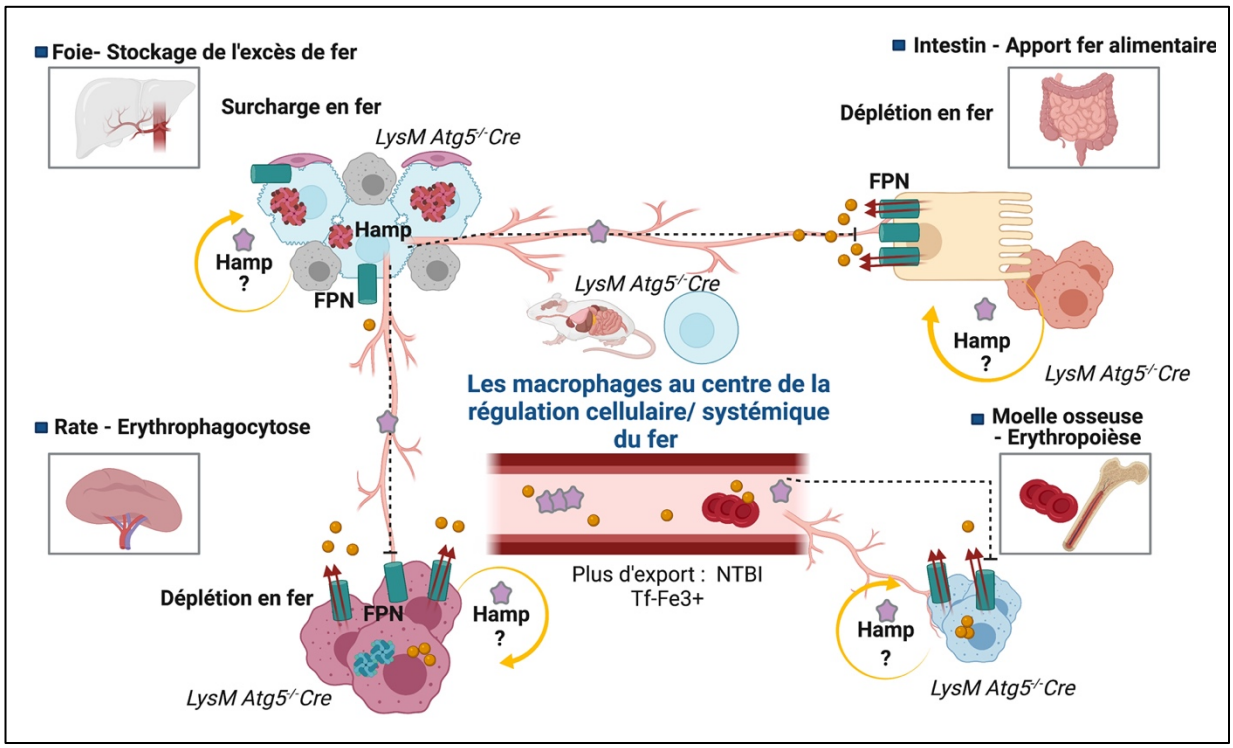


Figure 41. *Représentation schématique récapitulant le phénotype systémique des souris Atg5 LysM Cre.*

Les mécanismes d'interactions entre métabolisme cellulaire et systémique ne sont pas encore clairement définis et nécessitent donc des études supplémentaires afin d'être davantage caractérisés. Les résultats présentés dans cette étude démontrent un lien fort entre l'autophagie et le métabolisme du fer cellulaire et systémique, et offrent donc de nouvelles pistes de recherche. Il est important de poursuivre les investigations dans ce domaine afin de mieux étoffer nos conclusions sur les rôles de l'autophagie dans le trafic du fer labile-ferritine-hémosidérine ainsi que dans la régulation du niveau de la ferroportine.

Par la suite, il serait donc intéressant de caractériser le modèle *Atg5 LysM-Cre* sous régime alimentaire enrichi de fer afin d'examiner les effets sur la régulation du couple hepcidine – ferroportine et son influence sur le profil de surcharge de ces souris. Le modèle alimentaire de déficience en fer alimentaire pourrait également renseigner sur la capacité de mobilisation de la ferritine. Il serait également intéressant de caractériser le phénotype dans le cadre d'un apport exogène d'hepcidine. Par ailleurs, l'analyse de l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine des animaux *Atg5 LysM-Cre* dans un modèle inflammatoire, pourrait fournir des informations supplémentaires sur les liens de la signalisation hepcidine en réponse au fer et à l'inflammation.

Les modèles d'étude reliant l'autophagie au métabolisme du fer restent très peu nombreux, il serait donc judicieux de générer et d'analyser les conséquences de l'invalidation des gènes de l'autophagie dans d'autres modèles conditionnels, notamment dans les entérocytes duodénaux, et dans les hépatocytes. Le recours à des inhibiteurs ciblant différentes étapes de l'autophagie peut également affiner la compréhension des mécanismes mis en place. Il serait également pertinent de tester les

conséquences de double combinaison d'inhibition ou d'invalidation apoptose, protéasome - autophagie afin de mettre en évidence les mécanismes compensatoires entre les différentes voies de trafic cellulaire dans la modulation du métabolisme systémique du fer.

L'affinement des mécanismes cellulaires du métabolisme du fer permettraient de fournir de nouvelles stratégies thérapeutiques à prendre en compte dans les pathologies liées au fer.

2. **Partie 2.** Métabolisme du fer et réponse inflammatoire

Les macrophages sont capables de se différencier en un sous-ensemble fonctionnel spécialisé différent, en fonction des facteurs micro-environnementaux. Notre second objectif visait d'une part, de comprendre le rôle du fer sur la polarisation différentielle des macrophages *in vivo* et *in vitro*, en examinant ces effets directs sur les macrophages dans un modèle inflammatoire de surcharge ou de déficience. D'autre part, il visait à étudier l'effet des taux de fer sur la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative, ainsi que les interactions possibles entre son métabolisme et l'infection à l'ankylostrome dans un modèle *in vivo* d'interaction hôte-pathogène.

a. La teneur en fer est un facteur environnemental impactant la plasticité des macrophages, leurs profils d'expression et leurs fonctions effectrices

Notre analyse des marqueurs de réponse immune dans le foie et les macrophages péritonéaux a révélé que la surcharge en fer que ce soit par voie alimentaire ou par injection systémique de fer dextran est associée à une expression accrue des marqueurs de réponse immune de type 2, évalués par une augmentation de l'expression des transcrits de l'arginase1 *(Arg1)*, et de la chitinase1 *(Ym1)*. A l'inverse le régime carencé en fer conduit à une diminution de l'expression des marqueurs de réponse type 2. Ces résultats indiquent que les variations des niveaux de fer *in vivo* influencent l'équilibre de la réponse immune de type1/type2. Une teneur élevée en fer favorisant l'expression des marqueurs de réponse immune de type 2 et une faible teneur en fer les réduisant. En effet, plus de 60% des gènes liés au fer sont différentiellement exprimés entre les macrophages M1 et M2, ce qui explique probablement pourquoi les niveaux de fer dans les macrophages M2 sont généralement inférieurs à ceux des macrophages M1 (Recalcati *et al.* 2010).

Les macrophages sont caractérisés par un vaste éventail phénotypique en réponse aux stimuli de l'environnement, couvrant un continuum d'états fonctionnels. En réponse aux agents inducteurs environnants, ces cellules modifient spécifiquement un ensemble de métabolites, notamment leur profil de production des médiateurs de l'inflammation, cytokines, agents microbicides, métabolites lipidiques, consommations du glucose, et expression des protéines du fer, ainsi que leurs activités enzymatiques et

phagocytaires. Ils peuvent acquérir un phénotype M1 pour participer à l'activité microbicide et pro-inflammatoire, un phénotype M2a pour participer aux phénomènes de réparation et de cicatrisation tissulaires, ou encore un phénotype M2b et M2c pour une action régulatrice et anti-inflammatoire permettant le retour à l'homéostasie (Martinez et Gordon 2014). Bien que le scénario *in vivo* soit beaucoup plus complexe que cela, le concept de polarisation est simplifié en phénotype M1/M2 dans cette thèse afin de faciliter la compréhension des profils observés plus ou moins associés aux effets pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2). La dichotomie simplifiée qui définit les macrophages comme M1/M2 a en effet été établie lors d'étude portant sur le métabolisme de l'arginine. Les macrophages comptent à la fois des enzymes inductibles d'oxyde nitrique synthase (iNOS) et d'arginase, qui peuvent convertir l'arginine en NO ou en ornithine. Les M1 expriment l'iNOS qui convertit l'arginine en NO et inhibent donc la prolifération cellulaire, tandis que les M2 expriment l'arginase qui convertit l'arginine en ornithine et favorise la prolifération et la réparation cellulaires. Cette polarisation peut se produire indépendamment des cellules immunitaires adaptatives, montre donc l'importance du système immunitaire inné dans le contrôle de la réponse adaptative (Martinez et Gordon 2014).

La gestion des stocks de fer apparaît notamment comme une signature métabolique distincte lors de l'activation des macrophages. Les cellules polarisées en M1 ont tendance à réduire la disponibilité du fer, tandis que les cellules polarisées en M2 ont tendance à augmenter la biodisponibilité du fer vers les tissus par leur phénotype (Cairo *et al.* 2011). De plus, 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, et assurent 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 $Ferritin^{high}$ (Cairo *et al.* 2011 ; Corna *et al.* 2010). Dans les modèles d'athérosclérose, plusieurs sous-ensembles de macrophages ont été décrits , M1, M2, M4, Mox et Mhem (Vinchi *et al.* 2014). Les macrophages Mhem sont associés aux zones hémorragiques, confirmant que l'hémoglobine libéré est une source de fer pour les macrophages associés à l'athérosclérose et oriente leur polarisation vers un phénotype qui dépend de la captation d'hémoglobine et/ou de fer (Boyle *et al.* 2009). Les macrophages associés aux zones hémorragiques sont caractérisés comme $CD163^{high}$ et $HLA\text{-}DR^{low}$ (antigène leucocytaire humain). De plus, en raison de l'augmentation de la clairance de l'Hb, les macrophages Mhem présentent une expression accrue de HO-1 et de FPN, ce qui pourrait faciliter le catabolisme de l'hème et réduire le fer libre intracellulaire.

La série d'expériences réalisée *in vitro* dans ce travail, montre que la surcharge cellulaire en fer diminue l'activité basale des macrophages M1, de la même manière, cette surcharge cellulaire en fer influence directement la réponse pro-inflammatoire des macrophages en réponse au LPS, avec une

diminution des marqueurs pro-inflammatoires et une inhibition de la translocation nucléaire du NFκB. D'ailleurs, dans le contexte tumoral, les études soutiennent un modèle dans lequel des niveaux élevés de fer sont associés à un risque plus élevé de croissance tumorale (Torti et Torti 2013). Cet effet pro-tumoral est en partie dû au rôle du fer dans les processus liés à la réplication et au maintien de l'intégrité génomique. Il est également lié aux changements que le fer implique dans plusieurs voies de signalisation importantes pour la croissance tumorale et les métastases, à savoir p53, Wnt, NF-κB, le facteur inductible par l'hypoxie (HIF), les cyclines et la régulation du cycle cellulaire, AKT, EGF, VEGF (Torti et Torti 2013 ; Zhang et Zhang 2015). Le rôle du fer sur les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) n'est pas tout à fait clair et reste à mieux caractériser. Les résultats présentés ici tendent à montrer que le fer favoriserait la polarisation M2 et ajouterait un élément possible de l'effet pro-tumoral attribué au fer par des mécanismes de reprogrammation interne des macrophages vers un profil M2.

Nous avons également examiné l'effet du fer sur l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine *in vitro* sur les BMDM, nos résultats montrent que contrairement à l'hepcidine qui ne répond pas à la surcharge cellulaire en fer, la ferroportine augmente en réponse à un apport intracellulaire en fer. Par ailleurs, l'induction au LPS est connue pour induire une augmentation du transcrit de l'hepcidine et une répression de celle de la ferroportine. De plus, la surcharge cellulaire en fer conduit à une réduction de l'expression de l'hepcidine et à la restauration de l'expression de la ferroportine dans les macrophages traités au LPS. L'infection et l'inflammation génèrent ensemble des signaux qui régulent à la hausse la synthèse et la libération de l'hepcidine, qui vise à limiter le flux de fer vers les microbes extracellulaires. Plusieurs mécanismes ont proposé l'augmentation de l'expression de l'hepcidine pendant l'infection et l'inflammation. Dans les hépatocytes, l'expression de l'hepcidine est particulièrement stimulée par la cytokine inflammatoire IL-6. L'augmentation des concentrations circulantes d'IL-6 stimule la transcription de l'hepcidine à travers divers facteurs de transcription dont principalement STAT3 et GATA6. En revanche, la stimulation des macrophages *in vitro* avec de telles cytokines n'induit pas cette expression, ce qui suggère que l'hepcidine est régulée différemment dans les macrophages et les hépatocytes (Mu *et al.* 2021).

Par ailleurs, nous avons remarqué lors de nos expériences *in vitro* que les macrophages différenciés en présence du GM-CSF se comportent comme macrophage M1. Certaines études rapportent en effet que les macrophages M2 différenciés *in vitro* avec du M-CSF présentent une expression plus prononcée de CD163, HO-1 et ferroportine que celle des macrophages M1 polarisés avec le GM-CSF (Sierra-Filardi *et al.* 2010).

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du fer, en recyclant le fer des globules rouges sénescents. De plus, en réponse à l'inflammation, la rétention de fer dans le système

réticulo-endothélial est considérée comme une stratégie de l'hôte pour se protéger contre les agents pathogènes envahisseurs. Cette séquestration du fer dans les macrophages est principalement due à l'interaction entre hepcidine et l'exportateur de fer, ferroportine. L'augmentation de l'hepcidne déclenchée par des cytokines inflammatoires, entraîne l'internalisation et la dégradation de la ferroportine, bloquant ainsi la libération du fer par les macrophages. Cependant, les signaux mis en place pour l'inhibition de la ferroportine dans les contextes inflammatoires restent à mieux définir.

b. Réponse immune aux helminthes et statut nutritionnel

Dans cette partie de travail, le modèle murin d'infection à *Nippostrongylus brasiliensis (N. brasiliensis)* a été utilisé afin de documenter les effets du statut physiopathologique du métabolisme du fer et ses implications avec la résistance et/ou la sensibilité aux infections parasitaires. Les infections helminthiques passent par deux phases, une pulmonaire caractérisée par une inflammation des poumons, et une autre intestinale, résultante du transit des larves immatures vers l'intestin grêle où ils acquièrent leurs formes matures pour se reproduire (Loukas *et al*. 2016).

Les résultats présentés ici indiquent que l'infection *N. brasiliensis* induit une hémorragie accompagnée d'un état modérément anémique chez la souris C57BL/6, due à la consommation d'hématie par le parasite hématophage, analogue à celle rapportée par l'infection à *Ancylostoma duodenale* & *Necator americanus* chez l'Homme (Loukas *et al.* 2016).

La documentation du processus d'érythropoïèse montre en effet une activation du processus d'érythropoïèse chez les souris infectées sous les régimes standard et déficient en fer, et pas chez les souris infectées sous les régimes modérément ou très enrichis en fer. De plus, nous avons démontré que l'infection réduit les niveaux de fer splénique, suggérant une diminution de l'activité érythrophagocytaire. Par ailleurs, l'infection *N. brasiliensis* induit une augmentation du taux de fer pulmonaire, avec une surcharge importante en fer des leucocytes présents au niveau des poumons. Ces résultats suggèrent un engloutissement des érythrocytes libérés probablement lors des événements hémorragiques dans les poumons. L'infection *N. brasiliensis* induit également de l'érythropoïèse extramédullaire avec plus d'activité érythropoïétique chez les animaux infectés sous un régime standard ou modérément enrichi en fer par rapport au régime déficient et fortement enrichi en fer. Ce résultat montre que l'infection induit une demande de synthèse d'érythrocytes pour compenser les pertes hémorragiques. De plus, l'alimentation indépendamment de l'infection induit des modifications dans le processus d'érythropoïèse, insinuant des différences dans la demande érythropoïétique interne.

Il est de plus en plus admis que le fer est un important régulateur de la production de cytokines, de la prolifération des cellules immunitaires, ainsi que de leurs fonctions effectrices. Notamment, l'étude présentée dans l'article 2 montre que le fer favorise une polarisation des macrophages vers un profil M2.

Il est également rapporté que la surcharge et la chélation du fer modulent le profil Th1/Th2 chez les souris exposées à différents agents pathogènes. Le fer affecte la fonction immunitaire antimicrobienne des macrophages *via* l'inhibition des voies effectrices inductibles par l'IFN-γ. Par ailleurs, le fer s'oppose à l'expression induite par l'IFN-γ, de l'iNOS et du TNF-α et déplace la réponse immune vers un profil 2. Par ailleurs, une étude ultérieure réalisée au laboratoire montre l'impact d'une transition alimentaire en fer sur les interactions hôtes- mycobactéries, tels que *M. tuberculosis* (Agoro *et al.* 2016). La réponse de type II est cruciale pour le contrôle de l'hôte à l'infection par *N. brasiliensis*, et est caractérisée par une polarisation des Th0 en Th2, sécréteurs d'IL-4, IL-5 et d'IL-13 et des macrophages M0 en M2 sécréteurs des mêmes cytokines. Il a en effet été rapporté que les cytokines de type 2 jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'inflammation pulmonaire induite par les helminthes, et améliore le processus de réparation (Chen *et al.* 2011).

Nous avons mis en évidence la réponse adaptative de type Th2 *via* l'étude de l'expression de la cytokine IL-13 et du facteur de transcription Gata-3, ainsi que l'analyse transcriptomique des gènes de la réponse anti-inflammatoire de type 2. Nos résultats montrent que les souris ayant reçu le régime modérément riche en fer secrètent plus de médiateurs immunitaires de type 2. A l'inverse, le régime déficient en fer semble abolir toute la réponse anti-inflammatoire. Ainsi, la teneur en fer de l'hôte à des répercussions sur le processus inflammatoire et la réponse immune mise en jeu. La réponse de type 2 étant la réponse adéquate face aux infections parasitaires. L'augmentation des médiateurs immunitaire de type 2 dans le groupe infecté sous le régime modérément enrichi en fer pourrait expliquer le meilleur contrôle des lésions pulmonaires et la réparation tissulaire. A l'inverse un régime carencé en fer a conduit à l'abolition de la réponse de type 2 et à l'exacerbation des lésions pulmonaires.

De plus, la phase intestinale de l'infection montre une présence moindre de vers parasitaires matures chez les animaux infectés sous les deux régimes, modérément et déficient, en fer comparés aux régimes standard et fortement enrichi en fer. Ce résultat peut probablement s'expliquer par la réponse immunitaire antiparasitaire mise en jeu par des apports modérés en fer. Cependant, il n'explique pas celui observé avec la carence. Ce dernier peut éventuellement être à l'origine d'une altération du développement des vers parasites dans un environnement carencé en fer. A savoir, que le ver parasite est étroitement dépendant du fer directement ou indirectement pour la fabrication de l'hème, qui est nécessaire à son développement. Dans un modèle d'infection par *A. ceylanicum*, une restriction alimentaire sévère en fer a réduit la charge des vers intestinaux, les auteurs suggèrent un défaut de développement des parasites du stade larvaire infectieux (L3) au stade adulte dans un environnement appauvri en fer (Held *et al.* 2006).

Le fer joue un rôle central dans la lutte des mammifères contre les agents pathogènes, ainsi que sur la prolifération de ces derniers. Chacun affichant un large éventail de mécanismes de contrôle de l'acquisition et de l'utilisation du fer. D'un côté, les micro-organismes ont développé un grand nombre de stratégies pour acquérir le fer de leur environnement. D'un autre côté, l'hôte afin de se défendre contre les agents

pathogènes met en place une stratégie visant à modifier la distribution tissulaire du fer pour le rendre moins accessible aux micro-organismes (Ward *et al.* 2011). Nos analyses histologiques ainsi que celles de l'expression de la ferritine suggèrent une régulation interne du métabolisme du fer au niveau intestinal lors de l'infection *N. brasiliensis*. En effet une forte libération du fer au niveau des villosités intestinales est observée. Cette régulation pourrait être attribuée à des changements de régulation de l'expression de la ferritine, ainsi qu'à des changements dans l'expression des protéines de transport du fer, cependant, d'autres analyses sont nécessaires pour le confirmer.

Cette augmentation de l'absorption du fer pourrait donc être une stratégie éventuelle conçue par l'hôte pour augmenter ses quantités de fer circulant nécessaire au processus d'érythropoïèse. Nos observations montrent une augmentation des niveaux de fer hépatique indiquant une rétention de fer dans le foie. Suggérant ainsi la possibilité que les infections parasitaires, en plus de l'anémie ferriprive signalée, induisent une anémie inflammatoire des maladies chroniques. Ce résultat ajoute ainsi un autre niveau de complexité aux infections helminthiques. Le suivi habituel est basé uniquement sur des tests de détection des paramètres du fer circulant et ne concluent pas sur le type d'anémie observée.

Il n'en est pas moins de citer que dans certaines régions, une co-infection ankylostome - paludisme peut survenir. Cette combinaison conduit à des épisodes anémiques encore plus sévères. L'anémie induite dans les deux cas suit des mécanismes différents. En effet, l'infection par l'ankylostome est causée par des saignements intestinaux, tandis que l'anémie induite par le paludisme résulte d'une hémolyse, d'une séquestration splénique et d'une activité érythropoïétique affaiblie. Il en est de même de la possibilité de la co-infection ankylostromes - schistosomes, l'anémie induite chez ces derniers résulte d'une inflammation chronique et d'une certaine perte de sang (Raso *et al.* 2006).

Il a récemment été proposé que les infections à l'ankylostome peuvent avoir des effets bénéfiques dans le traitement des maladies inflammatoires et protègent notamment contre l'apparition d'allergie. Cependant, les essais cliniques utilisant des helminthes iatrogènes pour traiter des maladies inflammatoires ont donné des résultats mitigés, en effet, certains modèles expérimentaux d'infection aux ankylostomes n'ont montré aucun effet sur l'asthme ou la rhinite allergique (Kremsner *et al.* 2002 ; Rook et Brunet 2005). De plus, un impact anti-tumoral, a également été rapporté. L'effet a été principalement attribué à l'induction de l'apoptose, à l'activation de la réponse immunitaire, à la prévention des métastases, de l'angiogenèse et à l'inhibition des signaux prolifératifs régulant les réponses inflammatoires qui favorisent ainsi un effet anti-tumoral. Cependant, les mécanismes exacts conduisant à ces effets bénéfiques restent inconnus.

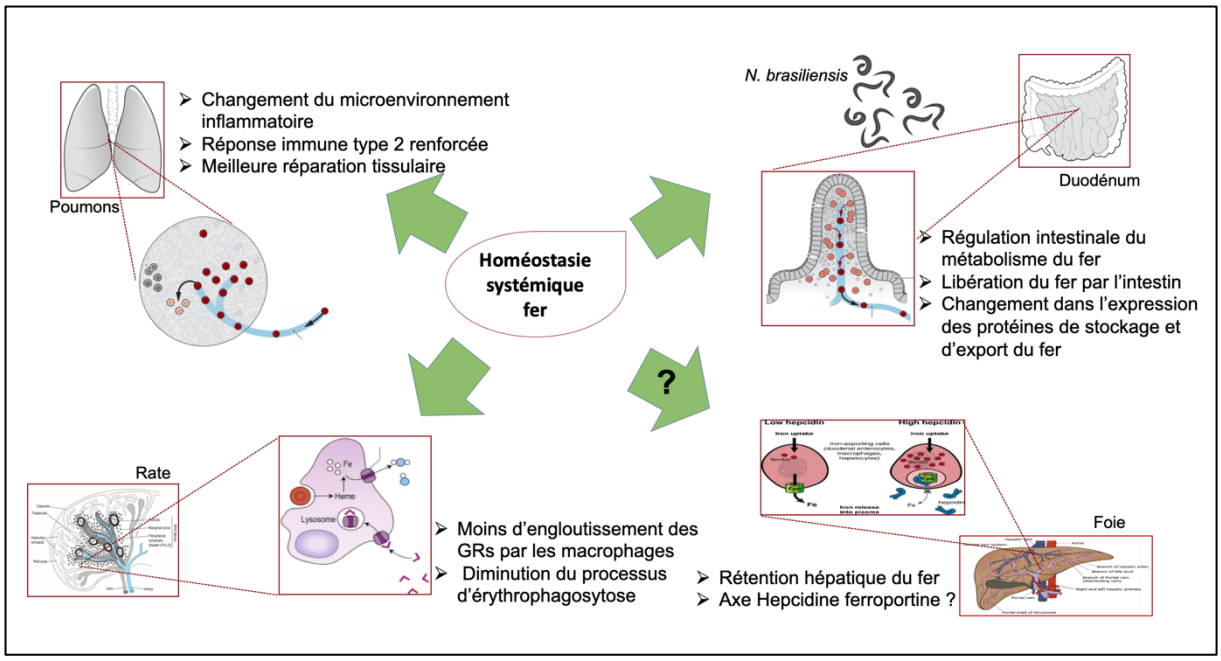


Figure 12. *Représentation schématique récapitulant les interactions entre métabolisme de fer et infection helminthe.*

Les interactions entre le métabolisme du fer et le système immunitaire ne sont plus à remettre en question. Nos expériences démontrent une régulation différentielle de l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine en fonction des taux de fer et du profil des macrophages. De plus, elles évoquent des conséquences majeures des variations nutritionnelles de la teneur en fer sur la réponse antiparasitaire.

Les données présentées dans cette thèse ouvrent donc de nouvelles interrogations notamment, sur les effets intrinsèques du fer sur la différenciation des cellules immunitaires, ainsi que les mécanismes déclenchant la régulation des messagers de l'hepcidine et de la ferroportine, les voies de signalisation susceptibles d'influencer leurs expressions, et leurs divers rôles au cours de l'inflammation. De ce fait, il serait nécessaire de caractériser davantage les liens entre modifications du métabolisme du fer, immunomodulation et effets cliniques.

Ainsi d'une part, le potentiel de régulation des apports ou de chélation/ déprivation en fer sur la polarisation des différents types des cellules immunitaires : M1/ M2s, LTs $CD4^+$, et ILCs, ainsi que sur l'effet cytotoxique des LT $CD8^+$ dans des modèles à la fois *in vivo* et *in vitro* pourrait être étudié. D'autre part, les voies de signalisation mise en jeu dans la régulation différentielle de l'hepcidine et de la ferroportine dans les deux contextes type 1/ type 2 en fonction de l'apport ou de la chélation du fer et *via* l'utilisation d'inhibiteurs seraient à préciser.

Les populations à haut risque d'infection sont souvent soumises à une supplémentation en fer, des études non invasives par dosage de protéines du fer (hepcidine, ferritine, transferrine) et des paramètres du fer (fer sérique, saturation de la transferrine, ferritinémie) dans les échantillons plasmatiques/

urinaires de ces personnes et la surveillance de leur profil anémique permettrait de valider nos résultats sur modèles murins.

La supplémentation en fer se révèle délétère ou bénéfique en fonction des niches microbiennes, il serait donc important de prendre en considération l'effet du fer dans son contexte inflammatoire 1 ou 2, à la fois dans des modèles d'apports de fer aiguës ou chroniques. En particulier, devant le manque de données bibliographiques sur l'effet du fer sur la réponse antihelminthique, il serait judicieux de développer de nouveaux modèles d'étude pour mieux caractériser les liens métabolisme du fer - réponse antiparasitaire qui constitue un problème de santé publique majeur. L'étude du modèle helminthique dans un environnement inflammatoire chronique de type tumoral par exemple permettrait de mieux caractériser l'influence sur la réponse immune anti-tumorale.

De telles études peuvent contribuer à la compréhension du métabolisme du fer dans les interactions hôte-pathogène et plus généralement la réponse inflammatoire et permettraient donc de proposer de nouvelles pistes pour améliorer la prise en charge des infections ou des inflammations chroniques.

Références bibliographiques

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, Shiv. (2009). Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique : Traduction de la 3e édition anglaise

Abboud, S., & Haile, D. J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(26), 19906-19912. https://doi.org/10.1074/jbc.M000713200

Agoro, R., Benmerzoug, S., Rose, S., Bouyer, M., Gozzelino, R., Garcia, I., Ryffel, B., Quesniaux, V. F. J., & Mura, C. (2017). An iron-rich diet decreases the mycobacterial burden and correlates with hepcidin upregulation, lower levels of proinflammatory mediators, and increased t-cell recruitment in a model of Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(7), 907-918. https://doi.org/10.1093/infdis/jix366

Agoro, R., & Mura, C. (2016). Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *61*, 16-25. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.07.006

Agoro, R., & Mura, C. (2019). Iron Supplementation Therapy, A friend and foe of mycobacterial infections. *Pharmaceuticals*, *12*(2), 75. https://doi.org/10.3390/ph12020075

Ajioka, R. S., Phillips, J. D., & Kushner, J. P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1763*(7), 723-736. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.005

Alkhateeb, A. A., Han, B., & Connor, J. R. (2013). Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. *Breast Cancer Research and Treatment*, *137*(3), 733-744. https://doi.org/10.1007/s10549-012-2405-x

Almeida, S. F. de, Fleming, J. V., Azevedo, J. E., Carmo-Fonseca, M., & Sousa, M. de. (2007). Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression. *The Journal of Immunology*, *178*(6), 3612-3619. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3612

Andriopoulos Jr, B., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S. A., Chen, S., Grgurevic, L., Knutson, M. D., Pietrangelo, A., Vukicevic, S., Lin, H. Y., & Babitt, J. L. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics*, *41*(4), 482-487. https://doi.org/10.1038/ng.335

Arezes, J., Jung, G., Gabayan, V., Valore, E., Ruchala, P., Gulig, P. A., Ganz, T., Nemeth, E., & Bulut, Y. (2015). Hepcidin-induced hypoferremia is a critical host defense mechanism against the siderophilic bacterium Vibrio vulnificus. *Cell Host & Microbe*, *17*(1), 47-57. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.001

Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., & Iwai, K. (2011). Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(10), 2040-2052. https://doi.org/10.1128/MCB.01437-10

Ashby, D. R., Gale, D. P., Busbridge, M., Murphy, K. G., Duncan, N. D., Cairns, T. D., Taube, D. H., Bloom, S. R., Tam, F. W. K., Chapman, R., Maxwell, P. H., & Choi, P. (2010). Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*, *95*(3), 505-508. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.013136

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *18*, 767-811. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767

Beaumont, C., & Canonne-Hergaux, F. (2005). [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*, *12*(2), 123-130. https://doi.org/10.1016/j.tracli.2005.04.017

Beaumont, C., Delaunay, J., Hetet, G., Grandchamp, B., de Montalembert, M., & Tchernia, G. (2006). Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload. *Blood*, *107*(10), 4168-4170. https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4269

Beguin, Y. (2002). Le métabolisme du fer. *Hématologie*, *8*(1), 7-12.

Bellelli, R., Federico, G., Matte', A., Colecchia, D., Iolascon, A., Chiariello, M., Santoro, M., De Franceschi, L., & Carlomagno, F. (2016). NCOA4 deficiency impairs systemic iron homeostasis. *Cell Reports*, *14*(3), 411-421. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.065

Bellmann-Weiler, R., Lanser, L., Barket, R., Rangger, L., Schapfl, A., Schaber, M., Fritsche, G., Wöll, E., & Weiss, G. (2020). Prevalence and predictive value of anemia and dysregulated iron homeostasis in patients with COVID-19 infection. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(8), 2429. https://doi.org/10.3390/jcm9082429

Bernstein, S. E. (1987). Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder resembling human atransferrinemia. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *110*(6), 690-705.

Bessman, N. J., Mathieu, J. R. R., Renassia, C., Zhou, L., Fung, T. C., Fernandez, K. C., Austin, C., Moeller, J. B., Zumerle, S., Louis, S., Vaulont, S., Ajami, N. J., Sokol, H., Putzel, G. G., Arvedson, T., Sockolow, R. E., Lakhal-Littleton, S., Cloonan, S. M., Arora, M., & Sonnenberg, G. F. (2020). Dendritic cell–derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to promote mucosal healing. *Science*, *368*(6487), 186-189. https://doi.org/10.1126/science.aau6481

Billesbølle, C. B., Azumaya, C. M., Kretsch, R. C., Powers, A. S., Gonen, S., Schneider, S., Arvedson, T., Dror, R. O., Cheng, Y., & Manglik, A. (2020). Structure of human ferroportin reveals molecular basis of iron homeostasis. *BioRxiv*, 2020.03.16.993006. https://doi.org/10.1101/2020.03.16.993006

Bisti, S., Konidou, G., Boelaert, J., Lebastard, M., & Soteriadou, K. (2006). The prevention of the growth of Leishmania major progeny in BALB/c iron-loaded mice : A process coupled to

increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. *Microbes and Infection*, *8*(6), 1464-1472. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.014

Bisti, S., Konidou, G., Papageorgiou, F., Milon, G., Boelaert, J. R., & Soteriadou, K. (2000). The outcome of Leishmania major experimental infection in BALB / c mice can be modulated by exogenously delivered iron. *European Journal of Immunology*, *30*(12), 3732-3740. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12<3732::AID-IMMU3732>3.0.CO;2-D

Bisti, S., & Soteriadou, K. (2006). Is the reactive oxygen species-dependent-NF-kappaB activation observed in iron-loaded BALB/c mice a key process preventing growth of Leishmania major progeny and tissue-damage? *Microbes and Infection*, *8*(6), 1473-1482. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.004

Bomford, A. B., & Munro, H. N. (1985). Transferrin and its receptor : Their roles in cell function. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *5*(5), 870-875. https://doi.org/10.1002/hep.1840050528

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S33-40. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017

Bosque, F., Belkaid, Y., Briend, E., Hevin, B., Lebastard, M., Soussi, N., & Milon, G. (1997). The biology of macrophages. *Pathologie-Biologie*, *45*(2), 103-109

Boyle, J. J., Harrington, H. A., Piper, E., Elderfield, K., Stark, J., Landis, R. C., & Haskard, D. O. (2009). Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *The American Journal of Pathology*, *174*(3), 1097-1108. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080431

Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases : Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology & Medicine*, *76*, 208-226. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046

Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., & Loréal, O. (2012). Non-transferrin bound iron : A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1820*(3), 403-410. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.014

Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A., & Locati, M. (2011). Iron trafficking and metabolism in macrophages : Contribution to the polarized phenotype. *Trends in Immunology*, *32*(6), 241-247. https://doi.org/10.1016/j.it.2011.03.007

Canali, S., Core, A. B., Zumbrennen-Bullough, K. B., Merkulova, M., Wang, C.-Y., Schneyer, A. L., Pietrangelo, A., & Babitt, J. L. (2016). Activin B induces noncanonical SMAD1/5/8 signaling via BMP type I receptors in hepatocytes : Evidence for a Role in Hepcidin Induction by Inflammation in Male Mice. *Endocrinology*, *157*(3), 1146-1162. https://doi.org/10.1210/en.2015-1747

Canali, S., Wang, C.-Y., Zumbrennen-Bullough, K. B., Bayer, A., & Babitt, J. L. (2017). Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *American Journal of Hematology*, *92*(11), 1204-1213. https://doi.org/10.1002/ajh.24888

Canonne-Hergaux, F., Donovan, A., Delaby, C., Wang, H., & Gros, P. (2006). Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *290*(1), G156-163. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00227.2005

Cao, Y., Cai, J., Li, X., Yuan, N., & Zhang, S. (2016). Autophagy governs erythroid differentiation both in vitro and in vivo. *Hematology*, *21*(4), 225-233. https://doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000027

Cardoso, E. M., Hagen, K., de Sousa, M., & Hultcrantz, R. (2001). Hepatic damage in C282Y homozygotes relates to low numbers of CD8+ cells in the liver lobuli. *European Journal of Clinical Investigation*, *31*(1), 45-53. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00744.x

Cazzola, M., & Beguin, Y. (1992). New tools for clinical evaluation of erythron function in man. *British Journal of Haematology*, *80*(3), 278-284. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb08133.x

Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J. F., Wynn, T. A., & Gause, W. C. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature Medicine*, *18*(2), 260-266. https://doi.org/10.1038/nm.2628

Chen, K., Liu, J., Heck, S., Chasis, J. A., An, X., & Mohandas, N. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(41), 17413-17418. https://doi.org/10.1073/pnas.0909296106

Chen, W., Paradkar, P. N., Li, L., Pierce, E. L., Langer, N. B., Takahashi-Makise, N., Hyde, B. B., Shirihai, O. S., Ward, D. M., Kaplan, J., & Paw, B. H. (2009). Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16263-16268. https://doi.org/10.1073/pnas.0904519106

Chepelev, N. L., & Willmore, W. G. (2011). Regulation of iron pathways in response to hypoxia. *Free Radical Biology and Medicine*, *50*(6), 645-666. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.023

Choi, J., Masaratana, P., Latunde-Dada, G. O., Arno, M., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2012). Duodenal reductase activity and spleen iron stores are reduced and erythropoiesis is abnormal in Dcytb knockout mice exposed to hypoxic conditions. *The Journal of Nutrition*, *142*(11), 1929-1934. https://doi.org/10.3945/jn.112.160358

Clegg, G. A., Fitton, J. E., Harrison, P. M., & Treffry, A. (1981). Ferritin : Molecular structure and iron-storage mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *36*, 53-86. https://doi.org/10.1016/0079-6107(81)90004-3

Collins, J. F., Wessling-Resnick, M., & Knutson, M. D. (2008). Hepcidin Regulation of Iron Transport. *The Journal of Nutrition*, *138*(11), 2284-2288. https://doi.org/10.3945/jn.108.096347

Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., Tagliafico, E., Bosurgi, L., Campanella, A., Brunelli, S., Manfredi, A. A., Apostoli, P., Silvestri, L., Camaschella, C., & Rovere-Querini, P. (2010). Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*, *95*(11), 1814-1822. https://doi.org/10.3324/haematol.2010.023879

Covell, A. M., Cragg, S. J., & Worwood, M. (1984). The metabolism of plasma ferritin. In H. Peeters (Éd.), *Protides of the Biological Fluids* (Vol. 31, p. 165-170). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-030764-0.50041-0

Craven, C. M., Alexander, J., Eldridge, M., Kushner, J. P., Bernstein, S., & Kaplan, J. (1987). Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse : A rodent model for hemochromatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(10), 3457-3461.

Crichton, R. (2016). *Iron Metabolism : From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences, 4th Edition. Wiley* ed

Cruz, E., Vieira, J., Almeida, S., Lacerda, R., Gartner, A., Cardoso, C. S., Alves, H., & Porto, G. (2006). A study of 82 extended HLA haplotypes in HFE-C282Y homozygous hemochromatosis subjects : Relationship to the genetic control of CD8+ T-lymphocyte numbers and severity of iron overload. *BMC Medical Genetics*, *7*, 16. https://doi.org/10.1186/1471-2350-7-16

Cruz, E., Vieira, J., Gonçalves, R., Alves, H., Almeida, S., Rodrigues, P., Lacerda, R., & Porto, G. (2004). Involvement of the major histocompatibility complex region in the genetic regulation of circulating CD8 T-cell numbers in humans. *Tissue Antigens*, *64*(1), 25-34. https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00245.x

Cruz, Eugénia, Melo, G., Lacerda, R., Almeida, S., & Porto, G. (2006). The CD8+ T-lymphocyte profile as a modifier of iron overload in HFE hemochromatosis : An update of clinical and immunological data from 70 C282Y homozygous subjects. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *37*(1), 33-39. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2006.04.004

Cullis, J. O. (2011). Diagnosis and management of anaemia of chronic disease : Current status. *British Journal of Haematology*, *154*(3), 289-300. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08741.x

Daldrup-Link, H. E. (2017). Ten things you might not know about iron oxide nanoparticles. *Radiology*, *284*(3), 616-629. https://doi.org/10.1148/radiol.2017162759

Dallman, P. R. (1987). Iron deficiency and the immune response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *46*(2), 329-334. https://doi.org/10.1093/ajcn/46.2.329

D'Anna, M. C., Veuthey, T. V., & Roque, M. E. (2009). Immunolocalization of Ferroportin in Healthy and Anemic Mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *57*(1), 9-16. https://doi.org/10.1369/jhc.2008.951616

De Almeida, S. F., Carvalho, I. F., Cardoso, C. S., Cordeiro, J. V., Azevedo, J. E., Neefjes, J., & de Sousa, M. (2005). HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway. *Blood*, *106*(3), 971-977. https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4640

De Domenico, I., Vaughn, M. B., Li, L., Bagley, D., Musci, G., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2006). Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *The EMBO Journal*, *25*(22), 5396-5404. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601409

Delaby, C., Pilard, N., Gonçalves, A. S., Beaumont, C., & Canonne-Hergaux, F. (2005). Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*, *106*(12), 3979-3984. https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2398

deLuca, L. S., & Gommerman, J. L. (2012). Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nature Reviews Immunology*, *12*(5), 339-351. https://doi.org/10.1038/nri3193

Denic, S., & Agarwal, M. M. (2007). Nutritional iron deficiency : An evolutionary perspective. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *23*(7-8), 603-614. https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.05.002

Deschemin, J.-C., Mathieu, J. R. R., Zumerle, S., Peyssonnaux, C., & Vaulont, S. (2017). Pulmonary iron homeostasis in hepcidin knockout mice. *Frontiers in Physiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00804

Díaz, V., Gammella, E., Recalcati, S., Santambrogio, P., Naldi, A. M., Vogel, J., Gassmann, M., & Cairo, G. (2013). Liver iron modulates hepcidin expression during chronically elevated erythropoiesis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *58*(6), 2122-2132. https://doi.org/10.1002/hep.26550

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis : An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*(5), 1060-1072. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042

Dongiovanni, P., Fracanzani, A. L., Fargion, S., & Valenti, L. (2011). Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome : A promising therapeutic target. *Journal of Hepatology*, *55*(4), 920-932. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.008

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T. C., Brugnara, C., Lux, S. E., Pinkus, G. S., Pinkus, J. L., Kingsley, P. D., Palis, J., Fleming, M. D., Andrews, N. C., & Zon, L. I. (2000). Positional cloning of

zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, *403*(6771), 776-781. https://doi.org/10.1038/35001596

Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. I., Robine, S., & Andrews, N. C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*, *1*(3), 191-200. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003

Drake, S. F., Morgan, E. H., Herbison, C. E., Delima, R., Graham, R. M., Chua, A. C. G., Leedman, P. J., Fleming, R. E., Bacon, B. R., Olynyk, J. K., & Trinder, D. (2007). Iron absorption and hepatic iron uptake are increased in a transferrin receptor 2 (Y245X) mutant mouse model of hemochromatosis type 3. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *292*(1), G323-328. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00278.2006

Drakesmith, H., & Prentice, A. (2008). Viral infection and iron metabolism. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*(7), 541-552. https://doi.org/10.1038/nrmicro1930

Du, X., She, E., Gelbart, T., Truksa, J., Lee, P., Xia, Y., Khovananth, K., Mudd, S., Mann, N., Moresco, E. M. Y., Beutler, E., & Beutler, B. (2008). The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5879), 1088-1092. https://doi.org/10.1126/science.1157121

Durai, V., & Murphy, K. M. (2016). Functions of murine dendritic cells. *Immunity*, *45*(4), 719-736. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.010

Eisenstein, R. S., & Blemings, K. P. (1998). Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *The Journal of Nutrition*, *128*(12), 2295-2298. https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2295

El Gendy, F. M., El-Hawy, M. A., Shehata, A. M. F., & Osheba, H. E. (2018). Erythroferrone and iron status parameters levels in pediatric patients with iron deficiency anemia. *European Journal of Haematology*, *100*(4), 356-360. https://doi.org/10.1111/ejh.13021

Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews*, *229*(1), 152-172. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x

El Marjou, F., Janssen, K.-P., Chang, B. H.-J., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., & Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *39*(3), 186-193. https://doi.org/10.1002/gene.20042

Espósito, B. P., Epsztejn, S., Breuer, W., & Cabantchik, Z. I. (2002). A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *304*(1), 1-18. https://doi.org/10.1006/abio.2002.5611

Fabio, G., Zarantonello, M., Mocellin, C., Bonara, P., Corengia, C., Fargion, S., & Fiorelli, G. (2002). Peripheral lymphocytes and intracellular cytokines in C282Y homozygous hemochromatosis

patients. *Journal of Hepatology*, *37*(6), 753-761. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00276-3

Fargion, S., Valenti, L., & Fracanzani, A. L. (2011). Beyond hereditary hemochromatosis : New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *43*(2), 89-95. https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.07.006

Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., … Wolff, R. K. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*, *13*(4), 399-408. https://doi.org/10.1038/ng0896-399

Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, *65*(0), 899-910. https://doi.org/10.1039/CT8946500899

Ferreira, C., Bucchini, D., Martin, M. E., Levi, S., Arosio, P., Grandchamp, B., & Beaumont, C. (2000). Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(5), 3021-3024. https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3021

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., Andrews, N. C., & Fleming, M. D. (2008). Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature Genetics*, *40*(5), 569-571. https://doi.org/10.1038/ng.130

Finkenstedt, A., Bianchi, P., Theurl, I., Vogel, W., Witcher, D. R., Wroblewski, V. J., Murphy, A. T., Zanella, A., & Zoller, H. (2009). Regulation of iron metabolism through GDF15 and hepcidin in pyruvate kinase deficiency. *British Journal of Haematology*, *144*(5), 789-793. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07535.x

Flannagan, R. S., Cosío, G., & Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews. Microbiology*, *7*(5), 355-366. https://doi.org/10.1038/nrmicro2128

Fleming, M. D., Trenor, C. C., Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., & Andrews, N. C. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics*, *16*(4), 383-386. https://doi.org/10.1038/ng0897-383

Folgueras, A. R., de Lara, F. M., Pendás, A. M., Garabaya, C., Rodríguez, F., Astudillo, A., Bernal, T., Cabanillas, R., López-Otín, C., & Velasco, G. (2008). Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*, *112*(6), 2539-2545. https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-149773

Frey, P. A., & Outten, C. E. (2011). Forging ahead : New mechanistic insights into iron biochemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, *15*(2), 257-259. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.022

Fuqua, B. K., Lu, Y., Frazer, D. M., Darshan, D., Wilkins, S. J., Dunn, L., Loguinov, A. V., Kogan, S. C., Matak, P., Chen, H., Dunaief, J. L., Vulpe, C. D., & Anderson, G. J. (2018). Severe iron metabolism defects in mice with double knockout of the multicopper ferroxidases hephaestin and ceruloplasmin. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *6*(4), 405-427. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.06.006

Gaetano, C., Massimo, L., & Alberto, M. (2010). Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica*, *95*(11), 1801-1803. https://doi.org/10.3324/haematol.2010.030239

Galy, B., Ferring, D., & Hentze, M. W. (2005). Generation of conditional alleles of the murine iron regulatory protein (IRP)-1 and -2 genes. *Genesis*, *43*(4), 181-188. https://doi.org/10.1002/gene.20169

Galy, B., Ferring-Appel, D., Kaden, S., Gröne, H.-J., & Hentze, M. W. (2008). Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metabolism*, *7*(1), 79-85. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.006

Ganz, T. (2009). Iron in innate immunity : Starve the invaders. *Current Opinion in Immunology*, *21*(1), 63-67. https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.011

Ganz, T. (2013). Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews*, *93*(4), 1721-1741. https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2013

Ganz, T., & Nemeth, E. (2006). Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *290*(2), G199-203. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2005

Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1820*(3), 188-202. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.013

Goswami, T., & 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*(39), 28494-28498. https://doi.org/10.1074/jbc.C600197200

Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff : Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, *38*(12), 3257-3264. https://doi.org/10.1002/eji.200838855

Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A. O., Direnzo, C., Robine, S., & Andrews, N. C. (2005). Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(5), 1258-1266. https://doi.org/10.1172/JCI24356

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., & Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, *388*(6641), 482-488. https://doi.org/10.1038/41343

Gunshin, H., Starr, C. N., Direnzo, C., Fleming, M. D., Jin, J., Greer, E. L., Sellers, V. M., Galica, S. M., & Andrews, N. C. (2005). Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*, *106*(8), 2879-2883. https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0716

Haber, F., Weiss, J., & Pope, W. J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences*, *147*(861), 332-351. https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221

Haden, RL. Historical aspects of iron therapy in anemia: chairman's address. *jama.* 1938;111(12), 1059–1061. doi:10.1001/jama.1938.02790380001001

Han, O., & Kim, E.-Y. (2007). Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *101*(4), 1000-1010. https://doi.org/10.1002/jcb.21392

Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., & Winkelmann, G. (2003). Salmochelins, siderophores of Salmonella enterica and uropathogenic Escherichia coli strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3677-3682. https://doi.org/10.1073/pnas.0737682100

Harrington-Kandt, R., Stylianou, E., Eddowes, L. A., Lim, P. J., Stockdale, L., Pinpathomrat, N., Bull, N., Pasricha, J., Ulaszewska, M., Beglov, Y., Vaulont, S., Drakesmith, H., & McShane, H. (2018). Hepcidin deficiency and iron deficiency do not alter tuberculosis susceptibility in a murine M.tb infection model. *PLoS ONE*, *13*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191038

Harris, Z. L., Durley, A. P., Man, T. K., & Gitlin, J. D. (1999). Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(19), 10812-10817. https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10812

Harris, Z. L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R. T., & Gitlin, J. D. (1995). Aceruloplasminemia : Molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(7), 2539-2543. https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2539

Hayat, M. A. (2017). Chapter 1—Overview of Autophagy. In M. A. Hayat (Éd.), *Autophagy : Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* (p. 1-122). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812146-7.00001-9

Hebbert, F. J. (1950). Some historical aspects of iron therapy. *Glasgow Medical Journal*, *31*(11), 385-396.

Held, M. R., Bungiro, R. D., Harrison, L. M., Hamza, I., & Cappello, M. (2006). Dietary iron content mediates hookworm pathogenesis in vivo. *Infection and Immunity*, *74*(1), 289-295. https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.289-295.2006

Hellman, N. E., & Gitlin, J. D. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition*, *22*, 439-458. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457

Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango : Regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, *142*(1), 24-38. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.028

Herbison, C. E., Thorstensen, K., Chua, A. C. G., Graham, R. M., Leedman, P., Olynyk, J. K., & Trinder, D. (2009). The role of transferrin receptor 1 and 2 in transferrin-bound iron uptake in human hepatoma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *297*(6), C1567-C1575. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00649.2008

Hider, R. C. (2002). Nature of nontransferrin-bound iron. *European Journal of Clinical Investigation*, *32*(s1), 50-54. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.0320s1050.x

Iancu, T. C. (1992). Ferritin and hemosiderin in pathological tissues. *Electron Microscopy Reviews*, *5*(2), 209-229. https://doi.org/10.1016/0892-0354(92)90011-e

Ibrahim, A. S., Gebermariam, T., Fu, Y., Lin, L., Husseiny, M. I., French, S. W., Schwartz, J., Skory, C. D., Edwards, J. E., & Spellberg, B. J. (2007). The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(9), 2649-2657. https://doi.org/10.1172/JCI32338

Iolascon, A., d'Apolito, M., Servedio, V., Cimmino, F., Piga, A., & Camaschella, C. (2006). Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SCL11A2). *Blood*, *107*(1), 349-354. https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2477

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, *327*(5963), 291-295. https://doi.org/10.1126/science.1183021

Jabara, H. H., Boyden, S. E., Chou, J., Ramesh, N., Massaad, M. J., Benson, H., Bainter, W., Fraulino, D., Rahimov, F., Sieff, C., Liu, Z.-J., Alshemmari, S. H., Al-Ramadi, B. K., Al-Dhekri, H., Arnaout, R., Abu-Shukair, M., Vatsayan, A., Silver, E., Ahuja, S., … Geha, R. S. (2016). A missense mutation in TFRC, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency. *Nature Genetics*, *48*(1), 74-78. https://doi.org/10.1038/ng.3465

James, P. T., Ali, Z., Armitage, A. E., Bonell, A., Cerami, C., Drakesmith, H., Jobe, M., Jones, K. S., Liew, Z., Moore, S. E., Morales-Berstein, F., Nabwera, H. M., Nadjm, B., Pasricha, S.-R., Scheelbeek, P., Silver, M. J., Teh, M. R., & Prentice, A. M. (2020). Could nutrition modulate COVID-19 susceptibility and severity of disease? A systematic review. *MedRxiv*, 2020.10.19.20214395. https://doi.org/10.1101/2020.10.19.20214395

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *54 Pt 1*, 1-13. https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003

Jiang, B., Liu, G., Zheng, J., Chen, M., Maimaitiming, Z., Chen, M., Liu, S., Jiang, R., Fuqua, B. K., Dunaief, J. L., Vulpe, C. D., Anderson, G. J., Wang, H., & Chen, H. (2016). Hephaestin and ceruloplasmin facilitate iron metabolism in the mouse kidney. *Scientific Reports*, *6*(1), 39470. https://doi.org/10.1038/srep39470

Jiang, L., Wang, J., Wang, K., Wang, H., Wu, Q., Yang, C., Yu, Y., Ni, P., Zhong, Y., Song, Z., Xie, E., Hu, R., Min, J., & Wang, F. (2021). RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by modulating ferroportin degradation. *Blood*, *blood.2020008986*. https://doi.org/10.1182/blood.2020008986

James, P. T., Ali, Z., Armitage, A. E., Bonell, A., Cerami, C., Drakesmith, H., Jobe, M., Jones, K. S., Liew, Z., Moore, S. E., Morales-Berstein, F., Nabwera, H. M., Nadjm, B., Pasricha, S.-R., Scheelbeek, P., Silver, M. J., Teh, M. R., & Prentice, A. M. (2020). Could nutrition modulate COVID-19 susceptibility and severity of disease? A systematic review. *MedRxiv*, 2020.10.19.20214395. https://doi.org/10.1101/2020.10.19.20214395

Jr, Andriopoulos, B., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S., Chen, S., Grgurevic, L., Knutson., A, Pietrangelo, A., Vukicevic, S., Lin, H.Y., & Babitt, J.L. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics*, *41*(4), 482-487. https://doi.org/10.1038/ng.335

Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8 + T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, *12*(11), 749-761. https://doi.org/10.1038/nri3307

Kämmerer, L., Mohammad, G., Wolna, M., Robbins, P. A., & Lakhal-Littleton, S. (2020). Fetal liver hepcidin secures iron stores in utero. *Blood*, *136*(13), 1549-1557. https://doi.org/10.1182/blood.2019003907

Kautz, L., Jung, G., Valore, E. V., Rivella, S., Nemeth, E., & Ganz, T. (2014). Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics*, *46*(7), 678-684. https://doi.org/10.1038/ng.2996

Kautz, L., Meynard, D., Monnier, A., Darnaud, V., Bouvet, R., Wang, R.-H., Deng, C., Vaulont, S., Mosser, J., Coppin, H., & Roth, M.-P. (2008). Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, *112*(4), 1503-1509. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143354

Kawabata, H., Yang, R., Hirama, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., & Koeffler, H. P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 20826-20832. https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20826

Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblaugh, S., Kingsley, P. D., Domenico, I. D., Vaughn, M. B., Kaplan, J., Palis, J., & Abkowitz, J. L. (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*, *319*(5864), 825-828. https://doi.org/10.1126/science.1151133

Kenawi, M., Rouger, E., Island, M.-L., Leroyer, P., Robin, F., Rémy, S., Tesson, L., Anegon, I., Nay, K., Derbré, F., Brissot, P., Ropert, M., Cavey, T., & Loréal, O. (2019). Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload : Lessons from a new rat model of hereditary

aceruloplasminemia. *FASEB Journal*, *33*(12), 13492-13502. https://doi.org/10.1096/fj.201901106R

Kollara, A., & Brown, T. J. (2012). Expression and function of nuclear receptor co-activator 4 : Evidence of a potential role independent of co-activator activity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *69*(23), 3895-3909. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1000-y

Kono, S., Yoshida, K., Tomosugi, N., Terada, T., Hamaya, Y., Kanaoka, S., & Miyajima, H. (2010). Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin-mediated internalization of ferroportin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1802*(11), 968-975. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.011

Kotas, M. E., & Locksley, R. M. (2018). Why innate lymphoid cells?. *Immunity*, *48*(6), 1081-1090. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.002

Krause, A., Neitz, S., Mägert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., & Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, *480*(2-3), 147-150. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01920-7

Kvarnhammar, A. M., & Cardell, L. O. (2012). Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology*, *136*(1), 11-20. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03556.x

Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(3), 181-189. https://doi.org/10.1038/nri1312

Lane, D. J. R., & Richardson, D. R. (2014). Chaperone turns gatekeeper : PCBP2 and DMT1 form an iron-transport pipeline. *The Biochemical Journal*, *462*(1), e1-3. https://doi.org/10.1042/BJ20140720

Lawaczeck, R. (2020). COVID-19 and body iron : A survey on phenomenological and genetic correlations. *ACS Chemical Neuroscience*, *11*(24), 3996-4000. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00572

Layoun, A., Samba-Mondonga, M., Fragoso, G., Calvé, A., & Santos, M. M. (2018). MyD88 adaptor protein is required for appropriate hepcidin induction in response to dietary iron overload in mice. *Frontiers in Physiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00159

Lee, J. J., Jacobsen, E. A., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., Condjella, R. M., Doyle, A. D., Luo, H., Zellner, K. R., Protheroe, C. A., Willetts, L., Lesuer, W. E., Colbert, D. C., Helmers, R. A., Lacy, P., Moqbel, R., & Lee, N. A. (2012). Human versus mouse eosinophils : « that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(3), 572-584. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.025

Lee, Jw., Yong, S.S., Choi J., Lee S., Kim B., Park C., Lee J., Lin C., Dickson R., & Bae D. (2005). Increased expression of matriptase is associated with histopathologic grades of cervical neoplasia. *Human Pathology*, *36*(6), 626-633. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.03.003

Lee, P. (2009). Role of Matriptase-2 (TMPRSS6) in Iron Metabolism. *Acta Haematologica*, *122*(2-3), 87-96. https://doi.org/10.1159/000243792

Lee, P. L., Beutler, E., Rao, S. V., & Barton, J. C. (2004). Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis : Mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin. *Blood*, *103*(12), 4669-4671. https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0072

Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., Wang, L., & Beutler, E. (2005). Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(6), 1906-1910. https://doi.org/10.1073/pnas.0409808102

Lee, Y.S., Kim, Y.H., Jung, Y. S., Kim, K.S., Kim, D.K., Na, S.Y., Lee, J.M., Lee, C.H., & Choi, H.-S. (2017). Hepatocyte toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced hepcidin expression. *Experimental & Molecular Medicine*, *49*(12), e408-e408. https://doi.org/10.1038/emm.2017.207

Levi, S., Girelli, D., Perrone, F., Pasti, M., Beaumont, C., Corrocher, R., Albertini, A., & Arosio, P. (1998). Analysis of ferritins in lymphoblastoid cell lines and in the lens of subjects with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood*, *91*(11), 4180-4187.

Levi, Sonia, & Arosio, P. (2004). Mitochondrial ferritin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(10), 1887-1889. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.020

Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., & Andrews, N. C. (1999). Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature Genetics*, *21*(4), 396-399. https://doi.org/10.1038/7727

Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C., & Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1823*(9), 1491-1508. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.009

Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes : Components and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*(1), 457-486. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104538

Liu, Q., Davidoff, O., Niss, K., & Haase, V. H. (2012). Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(12), 4635-4644. https://doi.org/10.1172/JCI63924

Liu, X., & Theil, E. C. (2005). Ferritins : Dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Accounts of Chemical Research*, *38*(3), 167-175. https://doi.org/10.1021/ar0302336

Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D., & 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*(37), 13612-13617. https://doi.org/10.1073/pnas.0606424103

Loréal, O., Gosriwatana, I., Guyader, D., Porter, J., Brissot, P., & Hider, R. C. (2000). Determination of non-transferrin-bound iron in genetic hemochromatosis using a new HPLC-based method. *Journal of Hepatology*, *32*(5), 727-733. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)80240-8

Loréal, O., Turlin, B., Pigeon, C., Moisan, A., Ropert, M., Morice, P., Gandon, Y., Jouanolle, A.-M., Vérin, M., Hider, R. C., Yoshida, K., & Brissot, P. (2002). Aceruloplasminemia : New clinical, pathophysiological and therapeutic insights. *Journal of Hepatology*, *36*(6), 851-856. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00042-9

Loukas, A., Hotez, P. J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J. S., Correa-Oliveira, R., Croese, J., & Bethony, J. M. (2016). Hookworm infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*(1), 1-18. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.88

Luria-Pérez, R., Helguera, G., & Rodríguez, J. A. (2016). Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells. *Boletin Medico Del Hospital Infantil De Mexico*, *73*(6), 372-379. https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2016.11.004

Lv, Y., Chen, L., Liang, X., Liu, X., Gao, M., Wang, Q., Wei, Q., & Liu, L. (2020). Association between iron status and the risk of adverse outcomes in COVID-19. *Clinical Nutrition*, *0*(0). https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.033

Ma, Z., & Damania, B. (2016). The cGAS-STING defense pathway and its counteraction by viruses. *Cell Host & Microbe*, *19*(2), 150-158. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.010

Maines, M. D. (1997). The heme oxygenase system : A regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *37*(1), 517-554. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517

Malafaia, G., Marcon, L. de N., Pereira, L. de F., Pedrosa, M. L., & Rezende, S. A. (2011). Leishmania chagasi : Effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, *127*(3), 719-723. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.010

Malerba, M., & Peyssonnaux, C. (2020). Rôle de l'hepcidine dans les infections cutanées. *médecine/sciences*, *36*(3), 222-224. https://doi.org/10.1051/medsci/2020037

Mancias, J. D., Wang, X., Gygi, S. P., Harper, J. W., & Kimmelman, A. C. (2014). Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, *509*(7498), 105-109. https://doi.org/10.1038/nature13148

Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., & Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today*, *13*(7), 265-270. https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90008-U

Mantovani, A., & Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer : Balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*, *22*(2), 231-237. https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.009

Manz, D. H., Blanchette, N. L., Paul, B. T., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2016). Iron and cancer : Recent insights. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1368*(1), 149-161. https://doi.org/10.1111/nyas.13008

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : Time for reassessment. *F1000prime Reports*, *6*, 13. https://doi.org/10.12703/P6-13

Mastrogiannaki, M., Matak, P., Delga, S., Deschemin, J.-C., Vaulont, S., & Peyssonnaux, C. (2012). Deletion of HIF-2α in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood*, *119*(2), 587-590. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-380337

Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M. C., Vaulont, S., & Peyssonnaux, C. (2009). HIF-2α, but not HIF-1α, promotes iron absorption in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(5), 1159-1166. https://doi.org/10.1172/JCI38499

Mburu, A. S. W., Thurnham, D. I., Mwaniki, D. L., Muniu, E. M., Alumasa, F., & de Wagt, A. (2008). The influence and benefits of controlling for inflammation on plasma ferritin and hemoglobin responses following a multi-micronutrient supplement in apparently healthy, HIV+ kenyan adults. *The Journal of Nutrition*, *138*(3), 613-619. https://doi.org/10.1093/jn/138.3.613

McKie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T. J., Raja, K. B., Shirali, S., Hediger, M. A., Farzaneh, F., & Simpson, R. J. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (New York, N.Y.)*, *291*(5509), 1755-1759. https://doi.org/10.1126/science.1057206

McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., Hediger, M. A., Hentze, M. W., & Simpson, R. J. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, *5*(2), 299-309. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80425-6

McKie, Andrew T. (2008). The role of Dcytb in iron metabolism : An update. *Biochemical Society Transactions*, *36*(6), 1239-1241. https://doi.org/10.1042/BST0361239

McKnight, G. S., Lee, D. C., Hemmaplardh, D., Finch, C. A., & Palmiter, R. D. (1980). Transferrin gene expression. Effects of nutritional iron deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*(1), 144-147.

McLean, E., Cogswell, M., Egli, I., Wojdyla, D., & de Benoist, B. (2009). Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutrition*, *12*(4), 444-454. https://doi.org/10.1017/S1368980008002401

Mellman, I., & Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells : Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, *106*(3), 255-258. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00449-4

Mencacci, A., Cenci, E., Boelaert, J. R., Bucci, P., Mosci, P., Fè d'Ostiani, C., Bistoni, F., & Romani, L. (1997). Iron overload alters innate and T helper cell responses to Candida albicans in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, *175*(6), 1467-1476. https://doi.org/10.1086/516481

Merryweather-Clarke, A. T., Pointon, J. J., Shearman, J. D., & Robson, K. J. (1997). Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *Journal of Medical Genetics*, *34*(4), 275-278. https://doi.org/10.1136/jmg.34.4.275

Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., & Roth, M.-P. (2009). Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nature Genetics*, *41*(4), 478-481. https://doi.org/10.1038/ng.320

Meyron-Holtz, E. G., Ghosh, M. C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U. V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P., & Rouault, T. A. (2004). Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *The EMBO Journal*, *23*(2), 386-395. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600041

Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells : Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, *7*(7), 673-682. https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733

Miller, H. K., Schwiesow, L., Au-Yeung, W., & Auerbuch, V. (2016). Hereditary hemochromatosis predisposes mice to Yersinia pseudotuberculosis infection even in the absence of the type III secretion system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00069

Mims, M. P., Guan, Y., Pospisilova, D., Priwitzerova, M., Indrak, K., Ponka, P., Divoky, V., & Prchal, J. T. (2005). Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood*, *105*(3), 1337-1342. https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2966

Miret, S., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annual Review of Nutrition*, *23*(1), 283-301. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073139

Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 823-830. https://doi.org/10.1038/ncb0910-823

Mok, H., Jelinek, J., Pai, S., Cattanach, B. M., Prchal, J. T., Youssoufian, H., & Schumacher, A. (2004). Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development*, *131*(8), 1859-1868. https://doi.org/10.1242/dev.01081

Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44 : More than a mere stem cell marker. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *81*, 166-173. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009

Mortensen, M., Ferguson, D. J. P., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M., & Simon, A. K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(2), 832-837. https://doi.org/10.1073/pnas.0913170107

Mortensen, Monika, Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Glanville, J., Knight, S., W. Jacobsen, S.-E., Kranc, K. R., & Simon, A. K. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(3), 455-467. https://doi.org/10.1084/jem.20101145

Moya-Alvarez, V., Bodeau-Livinec, F., & Cot, M. (2016). Iron and malaria : A dangerous liaison? *Nutrition Reviews*, *74*(10), 612-623. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw021

Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Hentze, M. W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual Review of Nutrition*, *28*(1), 197-213. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521

Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., & Galy, B. (2017). A red carpet for iron metabolism. *Cell*, *168*(3), 344-361. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034

Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., & Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *The EMBO Journal*, *22*(18), 4815-4825. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg446

Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeki, H., Nishioka, K., Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., Minegishi, Y., Yonekawa, H., & Karasuyama, H. (2005). Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*, *23*(2), 191-202. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.011

Müller, S., Sindikubwabo, F., Cañeque, T., Lafon, A., Versini, A., Lombard, B., Loew, D., Wu, T.-D., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Durand, A., Vallot, C., Baulande, S., Servant, N., & Rodriguez, R. (2020). CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nature Chemistry*, *12*(10), 929-938. https://doi.org/10.1038/s41557-020-0513-5

Mu, Q., Chen, L., Gao, X., Shen, S., Sheng, W., Min, J., & Wang, F. (2021). The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease. *Science Bulletin*. https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.02.010

Nairz, M., Dichtl, S., Schroll, A., Haschka, D., Tymoszuk, P., Theurl, I., & Weiss, G. (2018). Iron and innate antimicrobial immunity—Depriving the pathogen, defending the host. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *48*, 118-133. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.03.007

Nairz, M., Schroll, A., Haschka, D., Dichtl, S., Tymoszuk, P., Demetz, E., Moser, P., Haas, H., Fang, F. C., Theurl, I., & Weiss, G. (2017). Genetic and dietary iron overload differentially affect the course of Salmonella typhimurium infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00110

Nakajima, O., Okano, S., Harada, H., Kusaka, T., Gao, X., Hosoya, T., Suzuki, N., Takahashi, S., & Yamamoto, M. (2006). Transgenic rescue of erythroid 5-aminolevulinate synthase-deficient mice results in the formation of ring sideroblasts and siderocytes. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *11*(6), 685-700. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00973.x

Napier, I., Ponka, P., & Richardson, D. R. (2005). Iron trafficking in the mitochondrion : Novel pathways revealed by disease. *Blood*, *105*(5), 1867-1874. https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3856

Neckers, L. M., & Cossman, J. (1983). Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(11), 3494-3498. https://doi.org/10.1073/pnas.80.11.3494

Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., & Kaplan, J. (2004). Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, *306*(5704), 2090-2093. https://doi.org/10.1126/science.1104742

Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., & Ganz, T. (2004). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation*, *113*(9), 1271-1276. https://doi.org/10.1172/JCI20945

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., & Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(15), 8780-8785. https://doi.org/10.1073/pnas.151179498

Niu, Q., Li, S., Chen, D., Chen, Q., & Chen, J. (2016). Iron acquisition in Leishmania and its crucial role in infection. *Parasitology*. https://doi.org/10.1017/S0031182016000858

Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages : From mechanisms to therapy. *Immunity*, *41*(1), 49-61. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010

Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., & Fleming, M. D. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genetics*, *37*(11), 1264-1269. https://doi.org/10.1038/ng1658

Ohnmacht, C., & Voehringer, D. (2009). Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood*, *113*(12), 2816-2825. https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-154773

Olive, J. A., & Cowan, J. A. (2018). Role of the HSPA9/HSC20 chaperone pair in promoting directional human iron-sulfur cluster exchange involving monothiol glutaredoxin 5. *Journal of inorganic biochemistry*, *184*, 100-107. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.04.007

O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, *16*(9), 553-565. https://doi.org/10.1038/nri.2016.70

Pandolfo, M., & Pastore, A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *Journal of Neurology*, *256 Suppl 1*, 9-17. https://doi.org/10.1007/s00415-009-1003-2

Papanikolaou, G., Samuels, M. E., Ludwig, E. H., MacDonald, M. L. E., Franchini, P. L., Dubé, M.-P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., Nemeth, E., Thompson, J., Risler, J. K., Zaborowska, C., Babakaiff, R., Radomski, C. C., Pape, T. D., Davidas, O., Christakis, J.,

… Goldberg, Y. P. (2004). Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nature Genetics*, *36*(1), 77-82. https://doi.org/10.1038/ng1274

Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2009). Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(4), 1007-1016. https://doi.org/10.1128/MCB.01685-08

Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., & Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(11), 7806-7810. https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200

Pérez-Aguilar, F., Burguera, J. A., Benlloch, S., Berenguer, M., & Rayón, J. M. (2005). Aceruloplasminemia in an asymptomatic patient with a new mutation. Diagnosis and family genetic analysis. *Journal of Hepatology*, *42*(6), 947-949. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.02.013

Perls, M. (1867). Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, *39*(1), 42-48. https://doi.org/10.1007/BF01878983

Petrat, F., Groot, H. de, Sustmann, R., & Rauen, U. (2002). *The chelatable iron pool in living cells : A Methodically Defined Quantity*. *383*(3-4), 489-502. https://doi.org/10.1515/BC.2002.051

Peyssonnaux, C., Zinkernagel, A. S., Datta, V., Lauth, X., Johnson, R. S., & Nizet, V. (2006). TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, *107*(9), 3727-3732. https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2259

Peyssonnaux, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V. H., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(7), 1926-1932. https://doi.org/10.1172/JCI31370

Pierre, J. L., & Fontecave, M. (1999). Iron and activated oxygen species in biology : The basic chemistry. *Biometals*, *12*(3), 195-199. https://doi.org/10.1023/A:1009252919854

Pietrangelo, A. (2005). Non-HFE hemochromatosis. *Seminars in Liver Disease*, *25*(4), 450-460. https://doi.org/10.1055/s-2005-923316

Pietrangelo, A., & Trautwein, C. (2004). Mechanisms of disease : The role of hepcidin in iron homeostasis--implications for hemochromatosis and other disorders. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*, *1*(1), 39-45. https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0019

Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., & Loréal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(11), 7811-7819. https://doi.org/10.1074/jbc.M008923200

Pinto, J. P., Dias, V., Zoller, H., Porto, G., Carmo, H., Carvalho, F., & de Sousa, M. (2010). Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology*, *130*(2), 217-230. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x

Poss, K. D., & Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(20), 10919-10924. https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10919

Punnonen, K., Irjala, K., & Rajamäki, A. (1994). Iron-deficiency anemia is associated with high concentrations of transferrin receptor in serum. *Clinical Chemistry*, *40*(5), 774-776.

Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S. H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M. H., & Goldman, I. D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, *127*(5), 917-928. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.041

Quenee, L. E., Hermanas, T. M., Ciletti, N., Louvel, H., Miller, N. C., Elli, D., Blaylock, B., Mitchell, A., Schroeder, J., Krausz, T., Kanabrocki, J., & Schneewind, O. (2012). Hereditary hemochromatosis restores the virulence of plague vaccine strains. *The Journal of Infectious Diseases*, *206*(7), 1050-1058. https://doi.org/10.1093/infdis/jis433

Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., & Abkowitz, J. L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell*, *118*(6), 757-766. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.014

Raja, K. B., Simpson, R. J., Pippard, M. J., & Peters, T. J. (1988). In vivo studies on the relationship between intestinal iron (Fe3+) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse. *British Journal of Haematology*, *68*(3), 373-378. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1988.tb04217.x

Rajagopal, A., Rao, A. U., Amigo, J., Tian, M., Upadhyay, S. K., Hall, C., Uhm, S., Mathew, M. K., Fleming, M. D., Paw, B. H., Krause, M., & Hamza, I. (2008). Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*, *453*(7198), 1127-1131. https://doi.org/10.1038/nature06934

Raso, G., Vounatsou, P., Singer, B. H., N′Goran, E. K., Tanner, M., & Utzinger, J. (2006). An integrated approach for risk profiling and spatial prediction of Schistosoma mansoni–hookworm coinfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(18), 6934-6939. https://doi.org/10.1073/pnas.0601559103

Recalcati, S., Gammella, E., & Cairo, G. (2019). Ironing out macrophage immunometabolism. *Pharmaceuticals*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/ph12020094

Recalcati, S., Locati, M., Marini, A., Santambrogio, P., Zaninotto, F., De Pizzol, M., Zammataro, L., Girelli, D., & Cairo, G. (2010). Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *European Journal of Immunology*, *40*(3), 824-835. https://doi.org/10.1002/eji.200939889

Reuben, A., Chung, J. W., Lapointe, R., & Santos, M. M. (2017). The hemochromatosis protein HFE 20 years later : An emerging role in antigen presentation and in the immune system. *Immunity, Inflammation and Disease*, *5*(3), 218-232. https://doi.org/10.1002/iid3.158

Richter, G. W. (1978). The iron-loaded cell—The cytopathology of iron storage. A review. *The American Journal of Pathology*, *91*(2), 362-404.

Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D., & Camaschella, C. (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nature Genetics*, *33*(1), 21-22. https://doi.org/10.1038/ng1053

Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*, *18*(6), 263-266. https://doi.org/10.1016/s0167-5699(97)80019-9

Rook, G. a. W., & Brunet, L. R. (2005). Old friends for breakfast. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *35*(7), 841-842. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02112.x

Rotaru, I., Gaman, A., & Gaman, G. (2014). Secondary haemochromatosis in a patient with thalassemia intermedia. *Current Health Sciences Journal*, *40*(1), 67-70. https://doi.org/10.12865/CHSJ.40.01.13

Rouault, T. A., Stout, C. D., Kaptain, S., Harford, J. B., & Klausner, R. D. (1991). Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase : Functional implications. *Cell*, *64*(5), 881-883. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90312-m

Rouault, Tracey A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chemical Biology*, *2*(8), 406-414. https://doi.org/10.1038/nchembio807

Roy, S., Leidal, A. M., Ye, J., Ronen, S. M., & Debnath, J. (2017). Autophagy-Dependent Shuttling of TBC1D5 Controls Plasma Membrane Translocation of GLUT1 and Glucose Uptake. *Molecular Cell*, *67*(1), 84-95.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.020

Sabelli, M., Montosi, G., Garuti, C., Caleffi, A., Oliveto, S., Biffo, S., & Pietrangelo, A. (2017). Human macrophage ferroportin biology and the basis for the ferroportin disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *65*(5), 1512-1525. https://doi.org/10.1002/hep.29007

Sadik, C. D., Kim, N. D., & Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, *32*(10), 452-460. https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.008

Saito, H. (2014). Metabolism of iron stores. *Nagoya Journal of Medical Science*, *76*(3-4), 235-254.

Sakamori, R., Takehara, T., Tatsumi, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., & Hayashi, N. (2010). STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *Journal of Gastroenterology*, *45*(2), 244-248. https://doi.org/10.1007/s00535-009-0159-y

Schaer, C. A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G., & Schaer, D. J. (2008). Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, *83*(2), 325-333. https://doi.org/10.1189/jlb.0407226

Shah, A., Frost, J. N., Aaron, L., Donovan, K., Drakesmith, H., McKechnie, S. R., Stanworth, S. J., & Collaborators. (2020). Systemic hypoferremia and severity of hypoxemic respiratory failure in COVID-19. *Critical Care*, *24*(1), 320. https://doi.org/10.1186/s13054-020-03051-w

Shah, Y. M., Matsubara, T., Ito, S., Yim, S.-H., & Gonzalez, F. J. (2009). Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metabolism*, *9*(2), 152-164. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.012

Shaw, G. C., Cope, J. J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G. E., Gwynn, B., Lambert, A. J., Wingert, R. A., Traver, D., Trede, N. S., Barut, B. A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M. J., Peters, L. L., … Paw, B. H. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, *440*(7080), 96-100. https://doi.org/10.1038/nature04512

Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F. E., Hider, R. C., Frazer, D. M., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, *122*(5), 789-801. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.025

Shi, H., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L., & Philpott, C. C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5880), 1207-1210. https://doi.org/10.1126/science.1157643

Sierra-Filardi, E., Vega, M. A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A. L., & Puig-Kröger, A. (2010). Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology*, *215*(9-10), 788-795. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.020

Silva-Gomes, S., Vale-Costa, S., Appelberg, R., & Gomes, M. S. (2013). Iron in intracellular infection : To provide or to deprive? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00096

Smith, C. L., Arvedson, T. L., Cooke, K. S., Dickmann, L. J., Forte, C., Li, H., Merriam, K. L., Perry, V. K., Tran, L., Rottman, J. B., & Maxwell, J. R. (2013). IL-22 regulates iron availability in vivo through the induction of hepcidin. *The Journal of Immunology*, *191*(4), 1845-1855. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202716

Smith, S. R., Ghosh, M. C., Ollivierre-Wilson, H., Hang Tong, W., & Rouault, T. A. (2006). Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *36*(2), 283-287. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.006

Soares, M. P., & Hamza, I. (2016). Macrophages and iron metabolism. *Immunity*, *44*(3), 492-504. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.016

Soteriadou, K., Papavassiliou, P., Voyiatzaki, C., & Boelaert, J. (1995). Effect of iron chelation on the in-vitro growth of Leishmania promastigotes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *35*(1), 23-29. https://doi.org/10.1093/jac/35.1.23

Sousa Gerós, A., Simmons, A., Drakesmith, H., Aulicino, A., & Frost, J. N. (2020). The battle for iron in enteric infections. *Immunology*, *161*(3), 186-199. https://doi.org/10.1111/imm.13236

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells—A proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, *13*(2), 145-149. https://doi.org/10.1038/nri3365

Spits, H., & Di Santo, J. P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells : Regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature Immunology*, *12*(1), 21-27. https://doi.org/10.1038/ni.1962

Starks, A. M., Schoeb, T. R., Tamplin, M. L., Parveen, S., Doyle, T. J., Bomeisl, P. E., Escudero, G. M., & Gulig, P. A. (2000). Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of Vibrio vulnificus in iron-dextran-treated mice. *Infection and Immunity*, *68*(10), 5785-5793. https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5785-5793.2000

Stefanova, D., Raychev, A., Arezes, J., Ruchala, P., Gabayan, V., Skurnik, M., Dillon, B. J., Horwitz, M. A., Ganz, T., Bulut, Y., & Nemeth, E. (2017). Endogenous hepcidin and its agonist mediate resistance to selected infections by clearing non-transferrin-bound iron. *Blood*, *130*(3), 245-257. https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-772715

Su, M. A., Trenor, C. C., Fleming, J. C., Fleming, M. D., & Andrews, N. C. (1998). The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, *92*(6), 2157-2163.

Taube, J. M., Galon, J., Sholl, L. M., Rodig, S. J., Cottrell, T. R., Giraldo, N. A., Baras, A. S., Patel, S. S., Anders, R. A., Rimm, D. L., & Cimino-Mathews, A. (2018). Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Modern Pathology*, *31*(2), 214-234. https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.156

Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology*, *137*(6), 899-917. https://doi.org/10.1017/S0031182009991880

Thomas, C., & Oates, P. S. (2004). Ferroportin/IREG-1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes. *Gut*, *53*(1), 44-49.

Thompson, K., Menzies, S., Muckenthaler, M., Torti, F. M., Wood, T., Torti, S. V., Hentze, M. W., Beard, J., & Connor, J. (2003). Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a protein profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, *71*(1), 46-63. https://doi.org/10.1002/jnr.10463

Thurnham, D. I., McCabe, L. D., Haldar, S., Wieringa, F. T., Northrop-Clewes, C. A., & McCabe, G. P. (2010). Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency : A meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *92*(3), 546-555. https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29284

Torti, S. V., & Torti, F. M. (2013). Iron and cancer : More ore to be mined. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(5), 342-355. https://doi.org/10.1038/nrc3495

Trenor, C. C., Campagna, D. R., Sellers, V. M., Andrews, N. C., & Fleming, M. D. (2000). The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood*, *96*(3), 1113-1118.

Turnbull, A., Cleton, F., & Finch, C. A. (1962). Iron absorption. IV. The absorption of hemoglobin iron. *The Journal of Clinical Investigation*, *41*, 1897-1907. https://doi.org/10.1172/JCI104646

Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(7), 492-502. https://doi.org/10.1038/nri3244

Vale-Costa, S., Gomes-Pereira, S., Teixeira, C. M., Rosa, G., Rodrigues, P. N., Tomás, A., Appelberg, R., & Gomes, M. S. (2013). Iron overload favors the elimination of Leishmania infantum from mouse tissues through interaction with reactive oxygen and nitrogen species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(2), e2061. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002061

van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system : A new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, *46*(6), 845-852.

Vernet, M., Corberand, J., David, V., Deugnier, Y., Frey, J., Giraudet, P., Renversez, J. C., Sebahoun, G., & Groupe de travail SFBC Arbres décisionnels pour les pathologies du métabolisme du fer. (2001). Recommended algorithms of prescription in the diagnosis of iron deficiency and overload. *Annales De Biologie Clinique*, *59*(2), 149-155.

Vezzoni, P., Levi, S., Gabri, E., Pozzi, M. R., Spinazze, S., & Arosio, P. (1986). Ferritins in malignant and non-malignant lymphoid cells. *British Journal of Haematology*, *62*(1), 105-110. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1986.tb02905.x

Vinchi, F., Muckenthaler, M. U., Da Silva, M. C., Balla, G., Balla, J., & Jeney, V. (2014). Atherogenesis and iron : From epidemiology to cellular level. *Frontiers in Pharmacology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00094

Voehringer, D. (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(5), 362-375. https://doi.org/10.1038/nri3427

Vulpe, C. D., Kuo, Y. M., Murphy, T. L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., & Anderson, G. J. (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genetics*, *21*(2), 195-199. https://doi.org/10.1038/5979

Wallace, D. F., Summerville, L., Lusby, P. E., & Subramaniam, V. N. (2005). First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut*, *54*(7), 980-986. https://doi.org/10.1136/gut.2004.062018

Wallace, Daniel F, & Subramaniam, V. N. (2007). Non-HFE haemochromatosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *13*(35), 4690-4698. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i35.4690

Wallace, Daniel F., Summerville, L., & Subramaniam, V. N. (2007). Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. *Gastroenterology*, *132*(1), 301-310. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.028

Wang, F., Paradkar, P. N., Custodio, A. O., McVey Ward, D., Fleming, M. D., Campagna, D., Roberts, K. A., Boyartchuk, V., Dietrich, W. F., Kaplan, J., & Andrews, N. C. (2007). Genetic variation in Mon1a affects protein trafficking and modifies macrophage iron loading in mice. *Nature Genetics*, *39*(8), 1025-1032. https://doi.org/10.1038/ng2059

Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L., & Deng, C.-X. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, *2*(6), 399-409. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.10.010

Ward, R. J., Crichton, R. R., Taylor, D. L., Della Corte, L., Srai, S. K., & Dexter, D. T. (2011). Iron and the immune system. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *118*(3), 315-328. https://doi.org/10.1007/s00702-010-0479-3

Weinberg, E. D. (1975). Nutritional immunity. Host's attempt to withold iron from microbial invaders. *JAMA*, *231*(1), 39-41. https://doi.org/10.1001/jama.231.1.39

Weinberg, Eugene D. (2009). Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1790*(7), 600-605. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.002

Weinstein, D. A., Roy, C. N., Fleming, M. D., Loda, M. F., Wolfsdorf, J. I., & Andrews, N. C. (2002). Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia : Implications for the anemia of chronic disease. *Blood*, *100*(10), 3776-3781. https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1260

Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia : O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. *The FASEB Journal*, *16*(10), 1151-1162. https://doi.org/10.1096/fj.01-0944rev

Winn, N. C., Volk, K. M., & Hasty, A. H. (s. d.). Regulation of tissue iron homeostasis : The macrophage "ferrostat". *JCI Insight*, *5*(2). https://doi.org/10.1172/jci.insight.132964

Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., & Koizumi, S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, *103*(1), 129-135.

Yamamoto, M., & Nakajima, O. (2000). Animal models for X-linked sideroblastic anemia. *International Journal of Hematology*, *72*(2), 157-164.

Yanatori, I., & Kishi, F. (2019). DMT1 and iron transport. *Free Radical Biology & Medicine*, *133*, 55-63. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.020

Yang, L., & Lewis, K. (2020). Erythroid lineage cells in the liver : Novel immune regulators and beyond. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *8*(2), 177-183. https://doi.org/10.14218/JCTH.2019.00031

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W.,

Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, *156*(1-2), 317-331. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., & van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5567), 490-494. https://doi.org/10.1126/science.296.5567.490

Yoon, D., Pastore, Y. D., Divoky, V., Liu, E., Mlodnicka, A. E., Rainey, K., Ponka, P., Semenza, G. L., Schumacher, A., & Prchal, J. T. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(35), 25703-25711. https://doi.org/10.1074/jbc.M602329200

Yoshii, S. R., Kuma, A., Akashi, T., Hara, T., Yamamoto, A., Kurikawa, Y., Itakura, E., Tsukamoto, S., Shitara, H., Eishi, Y., & Mizushima, N. (2016). Systemic analysis of Atg5-null mice rescued from neonatal lethality by transgenic ATG5 expression in neurons. *Developmental Cell*, *39*(1), 116-130. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.001

Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J. S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L. M., & Daldrup-Link, H. E. (2016). Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, *11*(11), 986-994. https://doi.org/10.1038/nnano.2016.168

Zhang, C., & Zhang, F. (2015). Iron homeostasis and tumorigenesis : Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Protein & Cell*, *6*(2), 88-100. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0119-z

Zhang, D.-L., Hughes, R. M., Ollivierre-Wilson, H., Ghosh, M. C., & Rouault, T. A. (2009). A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metabolism*, *9*(5), 461-473. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.03.006

Zhang, D.-L., Wu, J., Shah, B. N., Greutélaers, K. C., Ghosh, M. C., Ollivierre, H., Su, X.-Z., Thuma, P. E., Bedu-Addo, G., Mockenhaupt, F. P., Gordeuk, V. R., & Rouault, T. A. (2018). Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6383), 1520-1523. https://doi.org/10.1126/science.aal2022

Zhang, Z., Zhang, F., An, P., Guo, X., Shen, Y., Tao, Y., Wu, Q., Zhang, Y., Yu, Y., Ning, B., Nie, G., Knutson, M. D., Anderson, G. J., & Wang, F. (2011). Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses. *Blood*, *118*(7), 1912-1922. https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330324

Zhou, J., Ye, S., Fujiwara, T., Manolagas, S. C., & Zhao, H. (2013). Steap4 plays a critical role in osteoclastogenesis in vitro by regulating cellular iron/Reactive Oxygen Species (ROS) levels and cAMP Response Element-binding Protein (CREB) activation. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(42), 30064-30074. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478750

Zhou, Y., Que, K., Zhang, Z., Yi, Z. J., Zhao, P. X., You, Y., Gong, J., & Liu, Z. (2018). Iron overloaded polarizes macrophage to proinflammation phenotype through ROS/acetyl-p53 pathway. *Cancer Medicine*, *7*(8), 4012-4022. https://doi.org/10.1002/cam4.1670

Figures réalisées avec BioRender (https://biorender.com/).

Meriem TALEB

Apport dans le métabolisme du fer du modèle murin macrophage autophagie déficient & relations fer – inflammation

Résumé :

Le fer est indispensable à toute forme de vie. Chez les mammifères, le fer constitue le site actif de l'hémoglobine contenu dans les globules rouges dont la fonction principale est le transport d'oxygène dans le sang. Le corps n'ayant pas la capacité de produire le fer, son apport se fait uniquement par voie alimentaire. Ce dernier est absorbé au niveau des intestins, transporté par des protéines spécifiques vers le plasma, afin d'être utilisé dans les différents organes cibles dont la moelle osseuse qui produit les globules rouges. Les mammifères ne peuvent pas éliminer l'excès de fer présent dans l'organisme. Chez l'homme, une carence tout comme une surcharge en fer peuvent entraîner des conséquences pathologiques. Ainsi, des mécanismes bien précis veillent à son équilibre systémique et cellulaire. Les mécanismes moléculaires qui régulent le métabolisme du fer ont été clarifiés avec l'identification récente de nombreuses protéines, dont l'hepcidine, hormone responsable de la régulation de l'entrée dans l'organisme du fer alimentaire. Dans le corps, cette hormone est régulée par plusieurs facteurs, dont principalement l'activité érythropoïétique, la quantité de fer de réserve et la réponse immune. Le fer est également au centre d'une bataille pour les ressources nutritionnelles entre les agents pathogènes et leurs organismes hôtes. En effet, le fer est aussi important pour les activités biologiques des agents pathogènes que celles de l'hôte mammifère. De fait, le statut en fer de l'hôte infecté affecte la pathogénicité de nombreux agents. L'hôte se défend en redistribuant son fer dans les différents compartiments du corps. Les objectifs de cette thèse visent à comprendre les voies de régulation de la distribution du fer dans l'organisme et les interactions avec la réponse immune lors des infections. De telles recherches sont nécessaires pour inspirer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur le contrôle de la physiologie du fer.

Mots clés : Fer, Macrophage, autophagie, infection, hepcidine, ferroportine.

Macrophage mouse model deficient in autophagy in iron metabolism insight & iron - inflammation relationships.

Summary:

Iron is essential for all living organisms. In mammals, iron constitutes the active site of hemoglobin contained in red blood cells, whose main function is the transport of oxygen in the blood. The body does not have the capacity to produce iron; the body is supplied on iron only by food intake. Iron is absorbed in the intestines, transported by specific proteins to the plasma, to be used in the different organs including the bone marrow, which produces red blood cells. Mammals cannot eliminate excess iron from the body. In humans, both a deficiency and an iron overload can lead to pathological manifestations. Thus, very specific mechanisms ensure its systemic and cellular balance. The molecular mechanisms that regulate iron metabolism have been clarified with the recent identification of many proteins, including hepcidin, a hormone responsible for regulating the entry of iron into the body. This hormone is controlled by several factors, including mainly erythropoietic activity, the amount of iron stock and the immune response. Iron is also at the center of a battle for nutritional resources between pathogens and their host organisms. Indeed, iron is as important for the biological activities of pathogens as for those of the mammalian hosts. In fact, the iron status of the infected host affects the pathogenicity of many agents. The host redistributes iron as a strategy of defense. The objectives of my phD are to understand the regulatory pathways for iron distribution in the body and the interactions with the immune response during infections. Such researches are important to inspire new therapeutic strategies based on the control of the physiology of iron.

Keywords: Iron, macrophage, autophagy, infection, hepcidin, ferroportin.

Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires UMR7355

UNIVERSITE D'ORLEANS

inem

cnrs