



HAL
open science

Rôles de l'axe hepcidine-fer dans l'immunité innée au travers de deux contextes pathologiques : l'hémochromatose héréditaire et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Cyril Renassia

► **To cite this version:**

Cyril Renassia. Rôles de l'axe hepcidine-fer dans l'immunité innée au travers de deux contextes pathologiques : l'hémochromatose héréditaire et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5211 . tel-04414518

HAL Id: tel-04414518

<https://theses.hal.science/tel-04414518v1>

Submitted on 24 Jan 2024

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.

THÈSE DE DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Laboratoire Institut Cochin

INSERM U1016

Rôles de l'axe hepcidine-fer dans l'immunité innée au
travers de deux contextes pathologiques :
l'hémochromatose héréditaire et les maladies inflammatoires
chroniques de l'intestin

Par Cyril RENASSIA

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 26 juin 2020

Président : Dr. Jamel EL-BENNA, Université de Paris
Rapporteurs : Pr. Edouard BARDOU-JACQUET, Université de Rennes
Dr. Benoît MARTEYN, Université de Strasbourg
Examineurs : Pr. Harry SOKOL, Université Pierre et Marie Curie
Dr. Frédérique VERDIER, Université de Paris
Directrice de thèse : Dr. Carole PEYSSONNAUX, Université de Paris

*A la Science;
Aux Explorations;
Aux Expériences Personnelles, Rationnelles et Sincères;
Aux Petites et Grandes Découvertes.*

*"Chaque instant m'éloignait du mauvais temps; le ciel s'éclaircissait.
En vue de Naples, je redescendis vers 1500 mètres. Je survolais le Vésuve en pensant : je suis le
premier homme qui le voit ainsi"*

Mémoires, Roland Garros

Table des matières

RESUME	4
ABSTRACT	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
LISTE DES ANNEXES	16
INTRODUCTION	18
CHAPITRE 1 : LE FER EN PHYSIOLOGIE	18
1. LE FER EN BIOCHIMIE	18
1.1 PREAMBULE	18
1.2 ROLES DU FER DANS L'ORGANISME : LES METALLOPROTEINES	21
2. L'HOMÉOSTASIE DU FER	24
2.1. ABSORPTION DU FER	24
2.2. TRANSPORT ET STOCKAGE DU FER	28
2.3. RECYCLAGE DU FER	32
2.3. REGULATION CELLULAIRE DE L'HOMÉOSTASIE DU FER	34
3. L'HEPCIDINE, REGULATEUR CLE DE L'HOMÉOSTASIE DU FER	38
3.1. LA REGULATION SYSTEMIQUE DU FER	38
3.2. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'HEPCIDINE	40
CHAPITRE 2 : SYSTEME IMMUNITAIRE INNE, LES NEUTROPHILES COMME PREMIERE REPONSE A L'INFECTION	46
1. LES NEUTROPHILES : GRANULOPOÏÈSE, SORTIE DE LA MOELLE OSSEUSE ET DUREE DE VIE	48
1.1. GENERALITES	48
1.2. GRANULOPOÏÈSE DANS LA MOELLE OSSEUSE	50
1.3. RETENTION ET SORTIE DES NEUTROPHILES DE LA MOELLE OSSEUSE	52
1.4. VIE DES NEUTROPHILES DANS LA CIRCULATION SANGUINE	54
1.5. FIN DE VIE ET ELIMINATION DES NEUTROPHILES	57
2. MODE D'ACTION DES NEUTROPHILES EN REPONSE A L'INFLAMMATION ET L'INFECTION	59
2.1. LA NETOSE	60
2.2. LA PHAGOCYTOSE	61
2.3. LA DEGRANULATION ET REPONSE OXYDATIVE	62
PREMIERE PARTIE : PROJET PRINCIPAL – ETUDE DU ROLE DE L'AXE HEPcidINE-FER SUR LA FONCTION DES NEUTROPHILES DANS L'HEMOCHROMATOSE HEREDITAIRE	70
1. CONTEXTE DE L'ETUDE	71
2. L'HEMOCHROMATOSE HEREDITAIRE	71
2.1. GENERALITES	71
2.2. DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE	74

2.3. SYMPTOMES.....	75
2.4. PRISE EN CHARGE.....	76
3. LES HEMOCHROMATOSES SECONDAIRES.....	77
4. FER ET IMMUNITE INNEE.....	79
5. RESUME DE L'ETUDE.....	83
6. PUBLICATION – BLOOD 2019 – EN REVISION	85
7. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	121

DEUXIEME PARTIE : PROJET SECONDAIRE – ETUDE DU ROLE DE L'AXE HEPCIDINE-FER DANS L'IMMUNITE INTESTINALE EN CONDITIONS DE MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (MICIS) **126**

1. CONTEXTE DE L'ETUDE	126
1.1. LES MICIS.....	127
1.2. LE MICROENVIRONNEMENT INTESTINAL	129
1.3. HISTOLOGIE DE LA BARRIERE INTESTINALE.....	132
1.4. LE DEVELOPPEMENT DES MICIS	137
2. RESUME DE L'ETUDE SUR LE ROLE DE L'HEPCIDINE EXPRIMEE PAR LES CELLULES DENDRIQUES INTESTINALES..	140
3. PUBLICATION – SCIENCE 2019 – EN REVISION	143
4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION	193
4.1. ETUDE DU ROLE DE L'HEPCIDINE DANS DES MODELES DE COLITE INDUITE AU DSS.....	196
4.2. ETUDE DE L'INTERACTION HOTE PATHOGENE DANS LA COLITE INDUITE PAR INFECTION AU <i>CITROBACTER RODENTIUM</i>	201
5. CONCLUSIONS.....	223

REFERENCES..... **220**

ANNEXES **233**

RESUME

Titre :

Rôles de l'axe hepcidine-fer dans l'immunité innée au travers de deux contextes pathologiques : l'hémochromatose héréditaire et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Résumé :

Le fer est essentiel à toute forme de vie, comme co-facteur dans des processus biologiques majeurs tels que le transport d'oxygène, la fonction mitochondriale, la prolifération cellulaire et la réplication de l'ADN. Le régulateur clé de l'homéostasie du fer est l'hepcidine qui agit comme un répresseur de l'export cellulaire du fer. L'hémochromatose héréditaire est l'anomalie génétique la plus fréquente en Occident touchant de 1/200 à 1/2000 personnes en France suivant la géolocalisation. Les mutations génétiques majoritairement retrouvées dans cette pathologie affectent la voie de production de l'hepcidine. On observe dans plus de 90% des cas une mutation du régulateur HFE entraînant sa perte de fonction résultant en une absorption incontrôlée du fer. Ce fer se dépose dans de nombreux organes induisant des dommages tissulaires et cellulaires. Cependant, si l'effet de la surcharge en fer a pu être mis en évidence comme néfaste sur la fonction du système immunitaire inné, et particulièrement les neutrophiles, rien n'est à ce jour connu quant à l'état des neutrophiles dans l'Hémochromatose Héréditaire. A travers ce travail de thèse, nous proposons une caractérisation de l'homéostasie du fer des neutrophiles, et réalisons une comparaison de leur capacités à défendre l'hôte dans deux contextes de surcharge en fer : une surcharge en fer génétiquement induite par l'absence d'hepcidine et une surcharge en fer expérimentalement induite par augmentation de l'apport en fer alimentaire. Ces deux contextes diffèrent par l'absence ou la présence de l'hepcidine. Nous mettons en évidence que l'absence d'hepcidine protège le neutrophile d'une accumulation de fer intracellulaire et des dysfonctions qu'elle entraîne. De plus, nous avons identifié une augmentation de l'activité des neutrophiles issus de notre modèle murin d'hémochromatose héréditaire et issus de patients atteints d'hémochromatose héréditaire mutés HFE.

De part l'identification initiale de l'hepcidine comme peptide antimicrobien, j'ai investigué dans une seconde partie de ma thèse sa participation au développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) à travers son rôle sur l'homéostasie du fer locale et son action sur le système immunitaire. Nous mettons en évidence que la régulation du fer local, en particulier par l'hepcidine exprimée par les cellules dendritiques, impacte la régénération tissulaire en agissant sur la séquestration du fer des phagocytes et en modifiant le microbiote intestinal dans différents modèles de colites. De plus, l'hepcidine est fortement exprimée par l'épithélium intestinal dans des phases aiguës de colite. Nous tentons donc de comprendre son rôle dans la réponse aux bactéries de type *E. coli* adhérentes tels que *C. rodentium*. Nous mettons en évidence que si l'hepcidine ne semble pas agir comme bactéricide direct, elle participe à la régulation de l'immunité mucoale dans les MICIs.

Mots clefs :

hepcidine - fer - hémochromatose - neutrophile - MICI - maladies inflammatoires chroniques de l'intestin - colite - immunité innée

ABSTRACT

Title :

Roles of hepcidin-iron axis on innate immunity in two pathological contexts: the Hereditary Hemochromatosis and the Inflammatory Bowel Diseases

Abstract :

Iron is essential for all living organisms, as co-factor for major biological processes such as oxygen transportation, mitochondrial function, cell proliferation and DNA replication. The key iron regulator hepcidin acts as a repressor of both cellular iron export and intestinal iron absorption. The Hereditary Hemochromatosis (HH) is the most frequent genetic disorder in Occident, affecting between 1/200 to 1/2000 in France depending on the geographic area. Mutations involved in Hereditary Hemochromatosis impair hepcidin production. In more than 90% cases, the loss of function of HFE regulator leads to uncontrolled iron absorption. Thus, iron deposit in organs damages tissues and cells. However, iron overload has been linked to impaired immune functions, particularly affecting neutrophils but nothing is known about the neutrophil functions in Hereditary Hemochromatosis. This study characterizes the iron homeostasis in neutrophils and compares the capacity of neutrophils to defend the host in two different iron overload contexts: the genetic iron overload without hepcidin production and the experimentally-induced iron overload with strong hepcidin expression. We show that lack of hepcidin protects neutrophils from iron accumulation and consecutive dysfunctions. Moreover, we identified an hyperactivation state of neutrophils isolated from both HH mouse model and patients mutated on HFE.

As hepcidin has been first identified as an antimicrobial peptide, I investigated, in the second part of my thesis, its role in the development of Inflammatory Bowel Diseases (IBDs) via a role both as local iron regulator and immunomodulator. We demonstrated that Dendritic Cell-derived hepcidin induces the iron sequestration in intestinal phagocytes resulting in modification of intestinal healing as well as microbiota diversity and richness in experimental models of colitis. Moreover, we found that hepcidin is highly expressed by intestinal epithelial cells (IEC) Crohn's and Ulcerative Colitis patients. We aimed to understand the role of this IEC-derived hepcidin in response to adherent bacteria like *C. rodentium*. We observed that hepcidin doesn't display direct bactericidal activity but participates to the regulation of mucosal immunity in IBDs.

Keywords :

hepcidin - iron - hemochromatosis - neutrophil - IBD - inflammatory Bowel Diseases - colitis - innate immunity

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN = Acide Désoxyribonucléique
ARN = Acide Ribonucléique
ATP = Adénosine Triphosphate
Bach1 = BTB and CNC homology 1
BMP = Bone Morphogenic Protein
BMPR = Bone Morphogenic Protein Receptor
C/EBP = CCAAT-enhancer-binding protein
CARD = Caspase recruitment domain-containing protein
CCR = C-C chemokine receptor
CD = Cluster of Differentiation
CFU = Colony forming unit
CMP = Common myeloid progenitor
CR = Complement Receptor
CREB/H = CAMP-Responsive Element-Binding Protein
CS-Tf = Coefficient de saturation de la Transferrine
CXCL = Chimiokine à motif C-X-C
CXCR = Récepteur pour Chimiokine à motif C-X-C
DC = Dendritic Cell
DCYTB = Duodenal cytochrome B
DMT1 = Divalent Metal Transporter
DSS = Dextran Sodium Sulfate
ECG = Electrocardiogramme
EGF = Epidermal Growth Factor
EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor
EHEC = Enterohemorragic *Escherichia Coli*
ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOPS = Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique
EPEC = Enteropathogenic *Escherichia Coli*
EPO = Erythropoietin
EPO-R = Erythropoietin Receptor
ERFE = Erythroferrone
ERK = Extracellular signal-Regulated Kinase
fMLF = N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FPN = Ferroportin ou ferroportine
G-CSF = Granulocyte-Colony Stimulating Factor
G-CSFR = Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor
GATA-1 = GATA-binding factor 1
GDF15 = Growth/Differentiation Factor 15
Gfi-1 = Growth Factor Independent 1
GM-CSF = Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP = Granulocyte-Macrophage Progenitor
HAMP = Hecpidin AntiMicrobial Peptide

HCP1 = Heme Carrier Protein 1
HFE = High FE²⁺ protein
HH = Hémochromatose Héritaire
HJV = Hemojuvelin
HLA = Human Leukocyte Antigen
HMOX = Heme Oxygenase
HRG1 = Heme-Responsive Gene 1
IBD = Inflammatory Bowel Disease
ICAM = Intercellular Adhesion Molecule
IFN = Interferon
Ig = Immunoglobuline
IL = Interleukine
IRE = Iron Responsive Element
IRP = Iron Regulatory Protein
JAK = Janus Kinase
JAM-A = Junctional Adhesion Molecule-A
KC/gro = Keratinocyte Chemoattractant/human Growth-Regulated Oncogene
KO = Knock Out
LCN-2 = Lipocalin-2
LEAP-1 = Liver Expressed Antimicrobial Peptide 1
LEE = Locus of enterocyte Effacement
LFA-1 = Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LPS = Lipopolysaccharides
Mac-1 = Macrophage-1 antigen
MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinase
MICI = Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MIP = Macrophage Inflammatory Proteins
MPO = Myeloperoxydase
MTOC = Microtubule organization center
NADH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NET = Neutrophil Extracellular Traps
NFS = Numération Formule Sanguine
NGAL = Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NLRP3 = NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NOD = Nucleotide binding Oligomerization Domain containing
NOX = NADPH Oxidase
NRAMP = Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins
OD = Optical Density
PAF = Platelet-Activating Factor
PAMP = Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCBP2 = Poly(rC)-Binding Protein 2
PD-L1 = Programmed Death-Ligand 1
PDGF = Platelet-Derived Growth Factor
PDGF-R = Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PECAM = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PKC = Protein Kinase C
PMA = Phorbol 12-myristate 13-Acetate

PRR = Pattern Recognition Receptor
PS = Phosphatidylsérine
PSGL-1 = P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
ROS = Reactive Oxygen Species
SCF = Stem Cell Factor
SDF = Stromal Cell-Derived Factor
SFB = Segmented Filamentous Bacteria
SH3 = SRC Homology 3 Domain
SNAP = Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein
SNARE = Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
SPF = Sans Pathogène Fixe
STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription
STEAP = Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
Tf = Transferrin
TfR = Transferrin Receptor
TGF = Transforming growth factor
TLR = Toll-Like Receptor
TNF = Tumor Necrosis Factor
TPO = Thyroid Peroxidase
TWSG1 = Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1
UC = Ulcerative Colitis
USF2 = Upstream Stimulatory Factor 2
UTR = Untranslated Region
VCAM = Vascular Cell Adhesion Molecule
ZO-1 = Zonula Occludens 1

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Réseau des réactions de synthèse et décomposition de précurseurs universels du métabolisme biologique facilitées par le fer ferreux. Tiré de Muchowska et al., 2019.

Figure 2. Les évolutions conjointes de l'atmosphère et de la biosphère. La chimie des eaux océaniques et des événements terrestres à travers les trois étapes de l'oxygénation des océans et de l'atmosphère (1, 2, 3). Tiré de Pufahl et al., 2012.

Figure 3. Le fer dans les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Suite de complexes protéiques au niveau de la membrane interne de la mitochondrie permettant la synthèse d'ATP. La présence de fer dans chaque complexe a été inscrite. Adapté de Harbeby, 2011.

Figure 4. Mécanismes de l'absorption du fer dans le duodénum des mammifères. Un entérocyte est dépeint avec sa machinerie de transport permettant l'assimilation du fer alimentaire. Le fer alimentaire est absorbé par les entérocytes au niveau du duodénum. L'hème de fer traverse la membrane apicale des cellules probablement au travers d'un transporteur, potentiellement HCP-1. Le fer non-héminique est réduit par DCYTB et importé sous sa forme ferreuse par DMT1. Dans le cytosol, le fer peut être stocké grâce à la ferritine ou exporté via la ferroportine. Le fer libéré est ensuite oxydé par l'hephaestine pour faciliter sa liaison avec la transferrine. Adapté de Gulec et al., 2014.

Figure 5. Import du fer plasmatique lié à la transferrine. L'endocytose du complexe Tf-TfR est suivi d'une acidification du pH de l'endosome permettant la libération du fer lié à la Tf. Il est ensuite réduit par les STEAPs en fer ferreux puis exporté par DMT1 hors de l'endosome. Adapté de Johnsen et al., 2019.

Figure 6. Principales voies d'entrée et de trafic intracellulaire du fer dans les macrophages. Les macrophages acquièrent le fer héminique par ingestion des érythrocytes sénescents et par une internalisation médiée par récepteur de l'hème libre (interaction hemopexine et CD91) ou de l'hémoglobine (interaction haptoglobine avec CD163). Les hèmes sont ensuite dégradés par l'hème oxygénase (HO-1) pour libérer du monoxyde de carbone CO, de la biliverdine et du fer qui est accompagné jusqu'à la ferritine par des protéines de la famille des PCBP. Une partie de l'hème peut être exporté via FLVCR1. Les macrophages peuvent aussi obtenir le fer depuis la transferrine par endocytose du complexe TfR1-Tf-Fe. Le fer libéré est ensuite réduit par STEAP-3 et transporté au travers de la membrane endosomale par DMT1. Les macrophages peuvent aussi acquérir le fer grâce au récepteur à la lipocaline (Lcn-2) et ainsi le fer lié au sidérophore capturé par Lcn-2. L'excès de fer est expulsé majoritairement par la ferroportine sous forme Fe^{2+} qui sera oxydé par la cerruloplasmine en Fe^{3+} et lié à la transferrine. La sécrétion de ferritine liée au fer peut représenter une voie alternative de libération du fer. Tiré de Gamella et al., 2014.

Figure 7. Principaux IRE reconnus par les IRPs sur les ARNm liés à l'homéostasie du fer. A gauche, les ARNm possédant un IRE situé en 5'-UTR conduisant à un blocage de la traduction. A droite, les ARNm possédant un IRE en 3'-UTR conduisant à une augmentation de la stabilité de l'ARNm. Tiré de Kühn, 2015.

Figure 8. Fonctionnement de la régulation des ARNm possédant un IRE par l'aconitase cytosolique IRP1, en présence et absence de fer. Lorsqu'elle lie l'IRE, IRP1 réprime la traduction des transcrits contenant un IRE en 5'-UTR et stabilise les transcrits contenant un IRE en 3'-UTR en les protégeant d'une dégradation endonucléolytique. Tiré de Rouault and Maio, 2017.

Figure 9. IRP1, IRP2, FBXL5 et CIA (cytosolic Fe-S cluster assembly) assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire du fer de façon coordonnée. A. La diminution du fer cytosolique induit le changement de rôle de l'aconitase en IRP1 et son action sur les ARNm liés à l'homéostasie du fer. B. L'augmentation du fer cytosolique favorise l'association de IRP1 avec le fer la faisant passer dans son rôle d'aconitase et supprimant

son action sur les ARNm liés à l'homéostasie du fer. Tiré de l'article de Mushegian à propos de Johnson et al., 2017.

Figure 10. Modélisation de la structure de la ferroportine humaine et du site de fixation de l'hepcidine. A, la conformation est ouverte vers l'intérieur de la cellule. B, la conformation est ouverte vers l'extérieur de la cellule. Tiré de Tortosa et al., 2017.

Figure 11. Structure de l'hepcidine. A, séquence d'acides aminés codant pour les trois formes de 25, 22 et 20 acides aminés. B, Modélisation des deux feuillets β de l'hepcidine 25, stabilisés par les quatre ponts disulfure en jaune. C, Modélisation de la répartition des charge de l'hepcidine 25. En bleu sont modélisés les résidus cationiques et en blanc les résidus hydrophobes. Tiré de (Poli et al., 2014).

Figure 12. Schéma synthétique des régulateurs positifs et négatifs de l'hepcidine. Tiré de Rishi et al., 2015. En haut, les régulateurs positifs de l'expression de l'hepcidine. En bas, les régulateurs négatifs de l'expression de l'hepcidine. BMP6, bone morphogenetic protein 6; BMPR-I, bone morphogenetic protein receptor-I; BMPR-II, bone morphogenetic protein receptor-II; CREB/H, cAMP response-element binding protein/H; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; EPO, erythropoietin; EPOR, erythropoietin receptor; ERF, erythroferrone; GDF15, growth differentiation factor 15; HFE, hemochromatosis protein; HIF, hypoxia-inducible factor; HJV, hemojuvelin; IL6, interleukin 6; IL-6R, interleukin 6 receptor; JAK, Janus kinase; PDGF-BB, platelet-derived growth factor-BB; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; SMAD1/5/8, sma and mothers against decapentaplegic homologue 1/5/8 complex; SMAD4, sma and mothers against decapentaplegic homologue 4; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TFR1, transferrin receptor 1; TFR2, transferrin receptor 2; TWSG1, twisted gastrulation BMP signaling modulator 1.

Figure 13. La hiérarchie hématopoïétique classique. Les cellules souches hématopoïétiques à long-terme (LT-HSC) génèrent des cellules souches hématopoïétiques à court-terme (ST-HSC) qui se différencieront en progéniteurs multipotents (MPP). Le destin du progéniteur multipotent est contrôlé par les facteurs environnants pour favoriser la différenciation vers un précurseur commun de type myéloïde (CMP) ou lymphoïde (CLP). A son tour, le CMP pourra générer des précurseurs de type mégacaryocyte-érythrocyte (MEP) ou de type granulocyte-macrophage (GMP) sous le contrôle notamment du GM-CSF.

Figure 14. Régulation transcriptionnelle de l'engagement du progéniteur myéloïde commun (CMP). Le CMP peut se différencier aussi bien en précurseur pour les lignages granulocytique et monocytique/macrophagique (GMP) ou pour les lignages érythroïde et mégacaryocytique (EMP). La double expression de PU.1 et GATA-1 conduit la cellule souche hématopoïétique (HSC) à se différencier en CMP. Puis l'expression dominante de PU.1 ou GATA-1 conduira le CMP en GMP ou EMP respectivement. Tiré de Zhu et Emerson, 2002.

Figure 15. La granulopoïèse terminale dans la moelle osseuse. La granulopoïèse terminale se caractérise par la formation séquentielle des différents granules. La segmentation du noyau débute au stade myéloblaste/promyélocyte pour finir au neutrophile mature. Les granules ont un contenu bien spécifique permettant de les classer en différents types de granules. La séquence de déroulement de la granulopoïèse terminale est régulée par les principaux facteurs de transcription inscrits en haut de la figure. Adapté de Fiedler et Brunner, 2012.

Figure 16. Modèle du tir à la corde du recrutement des neutrophiles depuis la moelle osseuse. La balance entre les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL12 permet de réguler la sortie du neutrophile de la moelle osseuse. En condition basale, l'expression abondante de CXCL12 par les cellules stromales de la moelle osseuse induit la rétention des neutrophiles dans la moelle, par l'activation de CXCR4. Au contraire, en condition de recrutement des neutrophiles, la forte quantité de CXCL1 et CXCL2 (principalement) sécrétée par les cellules endothéliales en réponse notamment au G-CSF, permet d'atténuer le signal de rétention et de conduire à la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse. Tiré de Eash et al., 2010.

Figure 17. Migration d'un neutrophile au travers de l'endothélium sinusoidal observé au microscope électronique à transmission. La moelle osseuse du fémur d'un rat a été infusée pendant 10 min avec Mip-2. A, grossissement x25000. B, grossissement x 17500. Tiré de Burdon et al., 2008.

Figure 18. La cascade d'adhésion des leucocytes. Les trois étapes principales sont notées en gras, elles sont médiées par les sélectines et l'activation des cellules induite par les chimiokines, puis l'arrêt induit par les intégrines. Tiré de Ley et al., 2007.

Figure 19. L'étape de transmigration des leucocytes. La migration au travers de la paroi des vaisseaux implique de pénétrer dans la barrière formée par les cellules endothéliales. a. Extension des protrusions des leucocytes dans le corps de la cellule endothéliale pour faciliter le passage dans la jonction intercellulaire. Cette étape est déclenchée par l'interaction de ICAM-1 et Mac-1. b. Migration paracellulaire médiée par PECAM-1 et potentiellement JAM-A. c. La migration transcellulaire apparaît dans les parties fines de l'endothélium. Cette étape est régulée par ICAM-1. d. Migration au travers des espaces entre les péricytes adjacents. Cette étape est facilitée par les Matrix Metalloprotéases (MMPs) et l'élastase. Tiré de Ley et al., 2007.

Figure 20. Le phénotype des neutrophiles âgés. A la sortie de la moelle osseuse, un neutrophile jeune exprime CD62L et CXCR4. Après plusieurs heures dans la circulation sanguine (4-6h), l'expression des molécules de surface change. Ce nouveau phénotype décrit comme "phénotype âgé" induit une signature propice à leur élimination de la circulation sanguine en migrant dans les tissus ou en retournant à la moelle osseuse. Tiré de Rosales, 2018.

Figure 21. Les mécanismes antimicrobiens des neutrophiles. Lorsqu'un neutrophile reconnaît un organisme pathogène, il déploie différentes fonctions pour le détruire. La phagocytose comprend l'ingestion du pathogène dans une vacuole de phagocytose qui, après maturation, devient un phagolysosome. Les enzymes de dégradation et le burst oxydatif contribuent à sa destruction. Les neutrophiles peuvent aussi relarguer leurs granules dans l'environnement extérieur ou former des pièges extracellulaires (NETs) en libérant leur ADN associé à des protéines issues des granules. Tiré de Rosales, 2018.

Figure 22. Morphologie du neutrophile observé au microscope électronique. Les neutrophiles sont isolés du sang périphérique humain pour analyse par microscopie électronique. Le cytosol est rempli de vésicules, dont les granules primaires de couleur foncée (P), les granules secondaires (S) et les granules tertiaires (T). Les vésicules sécrétoires (SV) se situent proches de l'appareil de Golgi (G). On peut aussi observer plusieurs mitochondries (M). A, grossissement 9100. B, grossissement 27600. Tiré de Sheshachalam et al., 2014.

Figure 23. Composition des granules de neutrophiles. Les neutrophiles sont équipés d'un grand nombre de granules, leur conférant le nom de granulocytes. Ces granules peuvent être répartis en trois principaux sous-groupes : primaires, secondaires, et tertiaires qui sont générés durant les stades promyélocytiques, myélocytiques et métamyélocytiques respectivement. Les neutrophiles contiennent aussi des vésicules sécrétoires qui permet, lorsqu'elles sont exocytées, d'induire une rapide augmentation des molécules d'adhésion à leur membrane facilitant l'adhérence sur les cellules endothéliales lors de l'extravasation. La sensibilité à l'exocytose de chaque granule est inversement corrélé avec son stade de production: les plus précoces dégranulent moins facilement que le plus tardifs. Tiré de Vols et al., 2017.

Figure 24. La NADPH oxydase dans un neutrophile au repos, primé ou activé et la production de réactifs oxydants potentiels consécutifs. Au repos, la NADPH oxydase est désassemblée et ses composants sont séparés spatialement. Le priming de la NADPH oxydase induit la translocation des composants cytosoliques, des phosphorylations partielles de la sous-unité p47phox et des modifications conformationnelles la préparant à répondre à une stimulation. Dans son état activé, la NADPH oxydase s'assemble rapidement pour permettre la formation des réactifs oxydants. La production des réactifs oxydants peut-être complétée et modulée par la Nitric Oxyde Synthase (NOS) et la MyeloPerOxydase (MPO) aboutissant à un très large panel de réactifs puissants pour détruire le pathogène, notamment les formes réactives de l'oxygène ROS et de l'azote RNS. Adapté de El-Benna et al., 2016 et Hampton et al., 1998.

Figure 25. La régulation de la production d'hepcidine par les hépatocytes. BMP6 est produite par les cellules non parenchymateuses du foie en réponse au fer stocké. La liaison de BMP6 sur son récepteur, alors complexé avec HJV induit l'activation des SMAD1/5/8 et de SMAD4 qui stimule la transcription de l'hepcidine. HJV est stabilisé par la Néogénine et clivé par la matriptase 2 (MT-2) permettant une régulation fine de la voie de signalisation de BMP6. La voie d'activation des SMADs est aussi régulée par Tfr2 en association avec HFE et HJV. HFE interagit avec Tfr1 entrant en compétition avec l'holo-Tf. En conséquence, lorsque l'apport en fer est élevé, HFE est déplacé de Tfr1 permettant son association avec Tfr2, ce qui résulte en l'activation de la

voie SMAD et l'induction de la transcription et de l'expression de l'hepcidine. En conditions inflammatoires, l'IL-6 se lie à son récepteur induisant l'activation des JAK1 et 2 et consécutivement de STAT3. Cette activation résulte en l'augmentation de l'expression de l'hepcidine. Enfin, lors d'une production érythroïde accrue, le besoin en fer pour l'érythropoïèse conduit ces cellules à exprimer l'érythroferrone (ERFE) qui inhibe l'expression de l'hepcidine par un mécanisme encore mal compris à ce jour. Tiré de Crielgaard et al., 2017.

Figure 26. Résumé graphique de l'étude. La présence ou l'absence d'hepcidine est un élément décisif pour le bon fonctionnement des neutrophiles en condition de surcharge en fer systémique. A, dans le modèle de surcharge en fer expérimentalement induite, l'excès de fer systémique conduit à une augmentation de l'hepcidine, qui empêche l'export du fer des neutrophiles conduisant à une accumulation de fer intracellulaire. L'augmentation du fer intracellulaire affecte le bon fonctionnement des neutrophiles. B, dans l'hémochromatose héréditaire la déficience en hepcidine protège les neutrophiles de la surcharge en fer intracellulaire. La surcharge en fer systémique induit une augmentation des niveaux plasmatiques de TNF α , de ICAM-1 et VCAM-1, pouvant participer à l'activation des neutrophiles.

Figure 27. Morphologie de l'intestin chez l'Homme.

Source : www.organsofthebody.com, consulté le 9 décembre 2019.

Figure 28. Surface d'absorption intestinale. L'empilement de structures de plus en plus petites multiplie par 600 la capacité totale d'absorption de l'intestin grêle. Tiré de Alder et al., 2006.

Figure 29. Composantes de la digestion colique. Le colon est séparé en deux parties : proximale à la sortie de l'iléon; et distale, côté anus. Ces deux parties ont des rôles distincts dans la fermentation, la réabsorption de l'eau et des électrolytes, la formation et enfin l'expulsion des fèces. Tiré de Les fondamentaux de la pathologie digestive, 2014.

Figure 30. Modélisation de la structure de la paroi digestive chez l'Homme. Tiré de Alder et al., 2006.

Figure 31. La barrière épithéliale du petit intestin. Les cellules épithéliales de l'intestin (IECs) forment une barrière biochimique et physique qui maintient une ségrégation entre le microbiote luminal et le système immunitaire muco-sal. La niche des cellules souches épithéliales intestinales (IESC) contient des cellules épithéliales, stromales et hématopoïétique. Cette niche contrôle le renouvellement continu de la couche de cellules épithéliales. Les IECs différenciées, à l'exception des cellules de Paneth, migrent en dehors de la crypte, vers la villosité dans le sens indiqué par les flèches. Les cellules de Goblet secrète le mucus et les cellules de Paneth les peptides antimicrobiens (AMPs) pour garder la surface de l'épithélium stérile, en association avec la libération des IgA. Les dendrites des cellules dendritiques (DC) passent au travers de l'épithélium ce qui permet le transport d'antigènes. Tiré de Peterson et Artis, 2014.

Figure 32. La barrière épithéliale du colon. Dans cette partie de l'intestin, l'épithélium est plus épais et les villosités n'existent plus, seules les cryptes résident. La présence massive de bactéries dans cette zone conduit à la production d'une seconde couche de mucus. Les cellules entéroendocrines sont absentes de cette zone de l'intestin. Tiré de Peterson et Artis, 2014.

Figure 33. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) sont des désordres multifactoriels. Le développement et l'évolution des MICIs sont affectés par de nombreux facteurs qui incluent la susceptibilité génétique de l'hôte, le microbiote intestinal, les facteurs environnementaux et le système immunitaire de l'hôte. Ces facteurs s'influencent mutuellement de façon étroite. Les gènes associés aux MICIs sont résumés ici. Les désordres génétiques spécifiquement associés à la maladie de Crohn sont écrits en magenta tandis que ceux spécifiques de la rectocolite ulcéreuse hémorragique sont écrits en bleu. Les gènes pouvant être associés aux deux sont écrits en noir. HSP : heat shock protein; MHC : major histocompatibility complex; NSAIDs : non-steroidal anti-inflammatory drugs; PRR : pattern-recognition receptor; RA : retinoic acid; ROS : reactive oxygen species; TSLP : thymic stromal lymphopoietin. Tiré de Kaser et al., 2010.

Figure 34. Résumé graphique de l'étude : l'hepcidine exprimée par les cellules dendritiques (DC) séquestre le fer du microbiote pour promouvoir la régénération muco-sale. Nous avons mécaniquement défini une nouvelle voie de régénération de la muqueuse de l'intestin des mammifères. En bref, les saignements et la modification du microbiote résultants de dommages intestinaux active la production d'hepcidine par les DC. L'hepcidine exprimée par les DC cible la ferroportine exprimée par les macrophages et les neutrophiles du gros

intestin afin de bloquer le relargage du fer intracellulaire favorisant la colonisation par des bactéries protectrices de la muqueuse telles que les Bifidobacteria. De plus, cette séquestration limite la colonisation des microbes infiltrant le tissu à la suite des dommages intestinaux, facilitant ainsi une régénération optimale de la muqueuse intestinale.

Figure 35. L'hepcidine est exprimée par l'intestin et dans les MICs. En haut, gradient d'expression d'hepcidine évalué par RT-qPCR à partir d'extraits des différents segments intestinaux enrichis en cellules épithéliales intestinales. N=3. Au milieu, évaluation de l'expression de l'hepcidine dans des échantillons de patients atteints de Crohn ou de rectocolite hémorragique (UC) en comparaison avec des tissus sains. N>15. En bas, marquage immunohistochimique avec amplification de l'hepcidine sur des échantillons de patients atteints de Crohn ou de rectocolite hémorragique. On observe une expression de l'hepcidine en rouge de part et d'autre de l'épithélium. Contre coloration hémalun. Grossissement 20X.

Figure 36. L'hepcidine hépatique n'est pas impliquée dans la régénération tissulaire après dommage au DSS 2,5%. En haut à gauche, suivi du poids des animaux au cours de l'expérience. En haut au milieu, mesure de la taille du colon à J12. En haut à droite, quantification colorimétrique du fer plasmatique à l'état basal et à J12. En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARNs issus du colon des animaux étudiés. Trois marqueurs représentatifs de la réponse inflammatoire sont présentés. Contrôles N=4; *Hamp1Δ^{liver}* N=6.

Figure 37. L'hepcidine des cellules épithéliales intestinales (IEC) n'est pas impliquée dans la régénération tissulaire après dommage au DSS 2,5%. En haut, vérification de l'absence d'expression de l'hepcidine par RT-qPCR dans les différents segments intestinaux enrichis en IEC chez des animaux contrôles (N=3) ou *Hamp1Δ^{IEC}* (N=3). Au milieu à gauche, suivi du poids des animaux issus d'une animalerie EOPS. Au milieu à droite, mesure de la taille du colon à J12 issu d'une animalerie EOPS. Au milieu bas à gauche, suivi du poids des animaux issus d'une animalerie conventionnelle. Au milieu bas à droite, mesure de la taille du colon à J12 des animaux issus d'une animalerie conventionnelle. En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARNs issus du colon des animaux étudiés issus de l'animalerie conventionnelle. Trois marqueurs représentatifs de la réponse inflammatoire sont présentés. Contrôles N=4; *Hamp1Δ^{IEC}* N=65.

Figure 38. L'hepcidine des cellules épithéliales intestinales participe à la réponse immunitaire face à l'infection au *Citrobacter rodentium*. En haut, cinétique d'infection du tractus gastrique chez la souris. Adapté de James W. Collins, et al 2014; Alexander R. C. Wong et al 2011; Siouxsie Wiles et al., 2004 et Caroline Mullineaux-Sanders et al 2017. Au milieu haut à gauche, suivi du poids des animaux lors de l'infection. Au milieu haut à gauche, évaluation de la quantité de bactéries en CFU/g de fèces au cours de l'infection. En bas, évaluation de la quantité de bactéries en CFU/G d'organe ou de fèces chez les animaux contrôles (N=4) ou *Hamp1Δ^{IEC}* (N=6) dans le contenu du caecum, du colon, le tissu du caecum, du colon et les organes cibles de la dissémination du *Citrobacter rodentium*.

Figure 39. Résumé graphique des modes d'action possibles de l'hepcidine dans la réponse à l'infection par *Citrobacter rodentium*. 1) L'hepcidine peut avoir des propriétés d'action antimicrobienne directe par ses similarités avec les Beta-défensines. 2) L'hepcidine peut agir en tant qu'immunomodulateur par ses propriétés de peptide antimicrobien (chimioattraction et immunomodulation) ou en modifiant les quantités de fer intracellulaire des phagocytes de la lamina propria. 3) L'hepcidine peut moduler la composition du microbiote et ainsi favoriser les défenses de l'hôte contre l'infection au *Citrobacter rodentium*.

Figure 40. Les différentes formes de l'hepcidine ne possèdent pas d'activité bactériostatique directe sur la croissance du *C. rodentium*. A gauche, cinétique de croissance du *C. rodentium* en présence de chaque forme de l'hepcidine en comparaison avec la présence de Pénicilline/streptomycine (P/S) à pH=7. A droite, cinétique de croissance du *C. rodentium* en présence de chaque forme de l'hepcidine en comparaison avec la présence de Pénicilline/streptomycine (P/S) à pH=5.

Figure 41. L'hepcidine semble impliquée dans l'intégrité de la barrière intestinale à J14 en réponse à l'infection par *C. rodentium*. En haut, RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux issus du caecum des animaux contrôles ou *Hamp1Δ^{IEC}* à J14. En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux issus du colon distal des animaux contrôles ou *Hamp1Δ^{IEC}* à J14. Contrôle N= 3; *Hamp1Δ^{IEC}* N= 3.

Figure 42. L'hepcidine participe à la réponse immunitaire systémique lors de l'infection par *Citrobacter rodentium*. En haut, numération sanguine en conditions basales ou à J14 post-infection chez des animaux

contrôles (N>4) ou *Hamp1* Δ^{IEC} (N>4). Au milieu, numération sanguine en conditions basales ou à J5 post-infection chez des animaux contrôles (N=4) ou *Hamp1* Δ^{IEC} (N=4). En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux issus du caecum des animaux contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} à J5. Contrôle N= 4; *Hamp1* Δ^{IEC} N= 4.

Figure 43. L'hepcidine exprimée par les cellules épithéliales influence les défenses immunitaires de l'épithélium intestinal. Evaluation par RT-qPCR des marqueurs d'intégrité et de défense de l'épithélium intestinal dans des extraits d'ARN totaux issus organoïdes intestinaux. Les organoïdes ont été générés à partir de cryptes du petit intestin d'animaux contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} cultivés en matrigel en présence de facteurs de croissance. Expérience représentative de deux expériences indépendantes, N=3 dans chaque groupe.

Figure 44. Les animaux *Hamp1* Δ^{IEC} présentent une dysbiose en comparaison aux animaux contrôles. En haut, évaluation de l'alpha diversité de la richesse du microbiote par les index de Shannon et de Simpson sur des échantillons de contenu intestinal de l'iléon et du colon. En bas, analyse comparative de l'enrichissement dans chaque phylum de bactéries retrouvés chez les animaux *Hamp1* Δ^{IEC} en comparaison aux contrôles. N=4.

Figure 45. Le microbiote des animaux *Hamp1* Δ^{IEC} n'est pas suffisant pour induire une diminution de la régénération tissulaire post-DSS 2,5%. Transplantation fécale de la flore des animaux contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} dans des animaux contrôles déplétés de leur flore par traitement aux antibiotiques. En haut à gauche, suivi du poids des animaux étudiés. En haut à droite, mesure de la taille du colon à J14. En bas, numération sanguine des animaux contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} à J14. Contrôles N=7 ; *Hamp1* Δ^{IEC} N=7.

Tableau 1. Les paramètres biologiques et cliniques de l'hémochromatose de type 1 pour la classification de la maladie. Source : hémochromatose.org, consulté le 5 décembre 2019, document validé par le Collège de la Haute Autorité de Santé en mars 2011.

Tableau 2. Changements dans la composition du microbiote chez des patients atteints de MICIs sélectionnés et dans des modèles murins de MICIs. DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis; DSS, dextran sodium sulfate; FISH, fluorescence in situ hybridization. Tiré de Kaser et al., 2010.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 – Matériel et méthode supplémentaire

Annexe 2 – Revue – Current Opinion in Hematology publiée en 2019

New insights into the links between hypoxia and iron homeostasis

Cyril Renassia, Carole Peyssonnaud
DOI:10.1097/MOH.0000000000000494

Introduction

Chapitre 1 : Le fer en physiologie

1. Le fer en biochimie

1.1 Préambule

Le fer est un élément essentiel pour la grande majorité des organismes vivants. Seules quelques bactéries utilisent le manganèse à la place du fer, et ce dans des contextes physico-chimiques bien particuliers. Le fer pourrait être à la base même de la création du vivant en catalysant spontanément des réactions cruciales à la vie, sans même besoin d'enzyme. Muchowska, Varma et Moran ont décrit en 2019 qu'à partir uniquement de deux intermédiaires bien connus du cycle de Krebs : le glyoxalate et le pyruvate, ils étaient capables par simple ajout de fer de générer 9 des 11 éléments du cycle de Krebs (Muchowska et al., 2019)(figure 1).

Les mécanismes cellulaires ont bien évolué depuis, mais le fer semble être resté un élément primordial à la vie. En ce qui concerne les mammifères et particulièrement l'Homme, parmi les 115 éléments connus du tableau périodique des éléments, on considère que seulement 19 sont absolument essentiels pour l'Homme. On retrouve notamment le carbone, l'azote, l'oxygène et le fer. Mais pourquoi ce fer est-il si indispensable ? C'est principalement dû à son potentiel redox lui permettant d'alterner entre sa forme réduite Fe^{3+} et sa forme oxydée Fe^{2+} : $E^0 \text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+} = 0,77 \text{ V}$. Ce potentiel est bien plus grand que celui du cuivre par exemple $E^0 \text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+ = 0,159$, ce qui lui permet de faciliter les échanges d'électrons lorsqu'il rencontre un autre couple oxydant réducteur,

nombreuses enzymes impliquées dans des processus biologiques essentiels tels que la réplication et la réparation de l'ADN, la phosphorylation oxydative mitochondriale ou la synthèse ribosomale (Kaplan et al., 2006; White and Dillingham, 2012; Ye and Rouault, 2010).

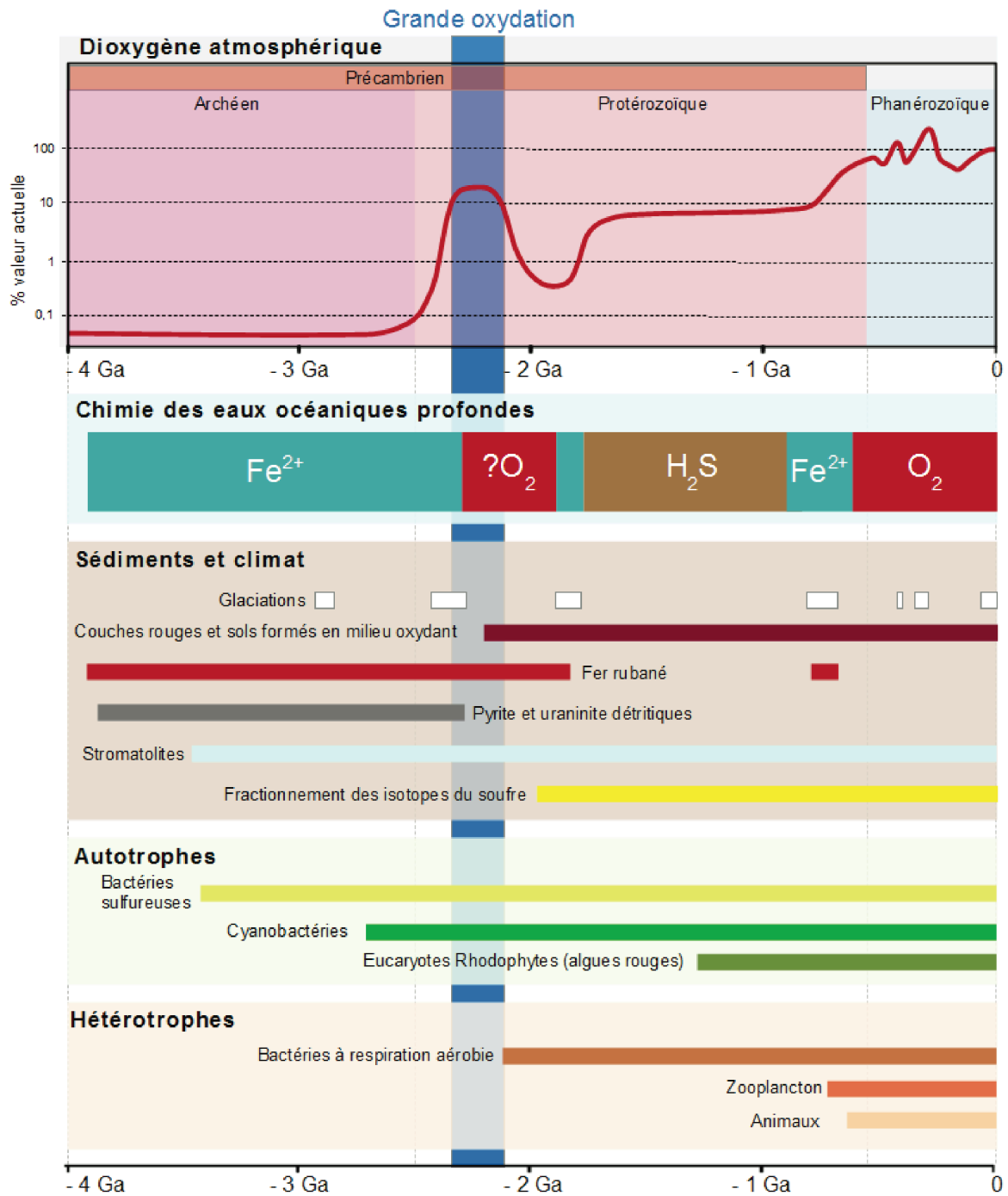


Figure 2. Les évolutions conjointes de l'atmosphère et de la biosphère. La chimie des eaux océaniques et des événements terrestres à travers les trois étapes de l'oxygénation des océans et de l'atmosphère (1, 2, 3). Tiré de Pufahl et al., 2012.

1.2 Rôles du fer dans l'organisme : les métalloprotéines

De nombreuses protéines, dont beaucoup sont des enzymes, possèdent un atome de métal. Ces métalloprotéines peuvent contenir un atome de Cuivre, de Nickel, de Fer etc. (Raab, 2002). Chez l'Homme, le fer total présent dans l'organisme varie entre 3 et 5 grammes pour un individu de 70kg, tandis que la quantité de cuivre avoisine les 70 milligrammes. Dans le cas des métalloprotéines à Fer, l'atome de fer contenu peut se présenter sous deux structures différentes : l'hème de fer, ou le centre fer-soufre. L'hème de fer est une porphyrine, macrostructure cyclique associée à un atome de fer au niveau de sa cavité centrale.

Les protéines héminiques

Une protéine héminique bien connue est l'hémoglobine, essentielle pour le transport l'oxygène par le globule rouge. L'hémoglobine humaine est un tétramère constitué de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes α et deux chaînes β , possédant au total quatre hèmes de Fer. Dans un globule rouge on trouve environ 30% d'hémoglobine, et chacun des quatre cations Fe^{2+} centraux peut se lier de façon covalente et réversible avec un atome d'oxygène. En plus de permettre le transport de l'oxygène, l'hème est capable de réguler la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des globines, en se liant au facteur Bach1 lors de l'érythropoïèse (Igarashi and Sun, 2006; Taketani, 2005).

Les protéines à centre fer-soufre

Un autre type d'utilisation du fer par une protéine est le centre Fe-S. Bien qu'il existe de nombreux types de centre Fe-S, on retrouve dans la grande majorité des cas des centres de type [2Fe-2 S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] (Beinert et al., 1997). On retrouve ces centres Fe-S

liés de façon covalente à la protéine par les groupements thiols portés le plus fréquemment par des cystéines.

Ces protéines sont impliquées dans des processus variés, de la régulation génique au transfert d'électrons. Plus de la moitié de ces protéines permettent les transferts d'électrons. En effet, les atomes de fer du centre ont la capacité de passer d'un état réduit (Fe^{2+}) à un état oxydé (Fe^{3+}), et ceci de façon réversible, de façon à accepter ou donner un ou plusieurs électrons suivant le nombre d'atomes de fer dans le centre. Ce transfert d'électrons peut intervenir de façon intramoléculaire ou intermoléculaire. Ainsi on retrouve ces protéines impliquées dans de nombreux processus biologiques impliquant des oxydo-réductions. Un exemple caractéristique est la Ribonucléotide réductase de classe I, enzyme tétramérique indispensable à la synthèse et à la réparation de l'ADN (P. Reichard, 1993; P Reichard, 1993; Stubbe et al., 2001). Cette enzyme utilise le Fer pour catalyser la modification des ribonucléotides en déoxyribonucléotides, qui seront alors disponibles pour la synthèse d'ADN.

De nombreuses autres enzymes utilisant le Fer sont impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, notamment des hélicases, des nucléases et des glycosylases.

Exemple de rôle biologique du fer: la chaîne respiratoire mitochondriale humaine

Le fer est aussi essentiel dans la chaîne respiratoire mitochondriale, où il est utilisé dans la majorité des complexes. Le premier complexe à l'utiliser est la NADH déshydrogénase (aussi appelé Complexe I). Cette protéine transmembranaire est la première étape de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Elle lie le NADH pour récupérer 2 électrons et les transmettre via de nombreux centres Fe-S jusqu'au coenzyme Q_{10} pour former l'ubiquinol (Q_{10}H_2) tout en générant un gradient de protons, grâce au passage de 4H^+ vers l'espace inter membranaire.

Le second point d'entrée des électrons est la Succinate déshydrogénase (Complexe II) qui se lie au FADH_2 pour récupérer à nouveau 2 électrons qu'elle transmet via des centres Fe-S au coenzyme Q_{10} formant à nouveau de l'ubiquinol.

L'ubiquinol généré par ces deux complexes se déplace au sein de la membrane interne de la mitochondrie jusqu'à la rencontre de la Coenzyme Q - cytochrome C oxydoréductase (Complexe III). Ce complexe catalyse l'oxydation de l'ubiquinol et la réduction de l'hème de fer de deux cytochromes C (1 électron par cytochrome C) en deux étapes libérant à chaque étape 2H^+ dans l'espace inter membranaire.

Quatre cytochromes C ainsi réduits transitent vers le dernier complexe de la chaîne respiratoire, la cytochrome C oxydase (Complexe IV) où ils libèrent leurs électrons par oxydation. Ces électrons sont récupérés par deux hèmes de Fer. La réaction finale

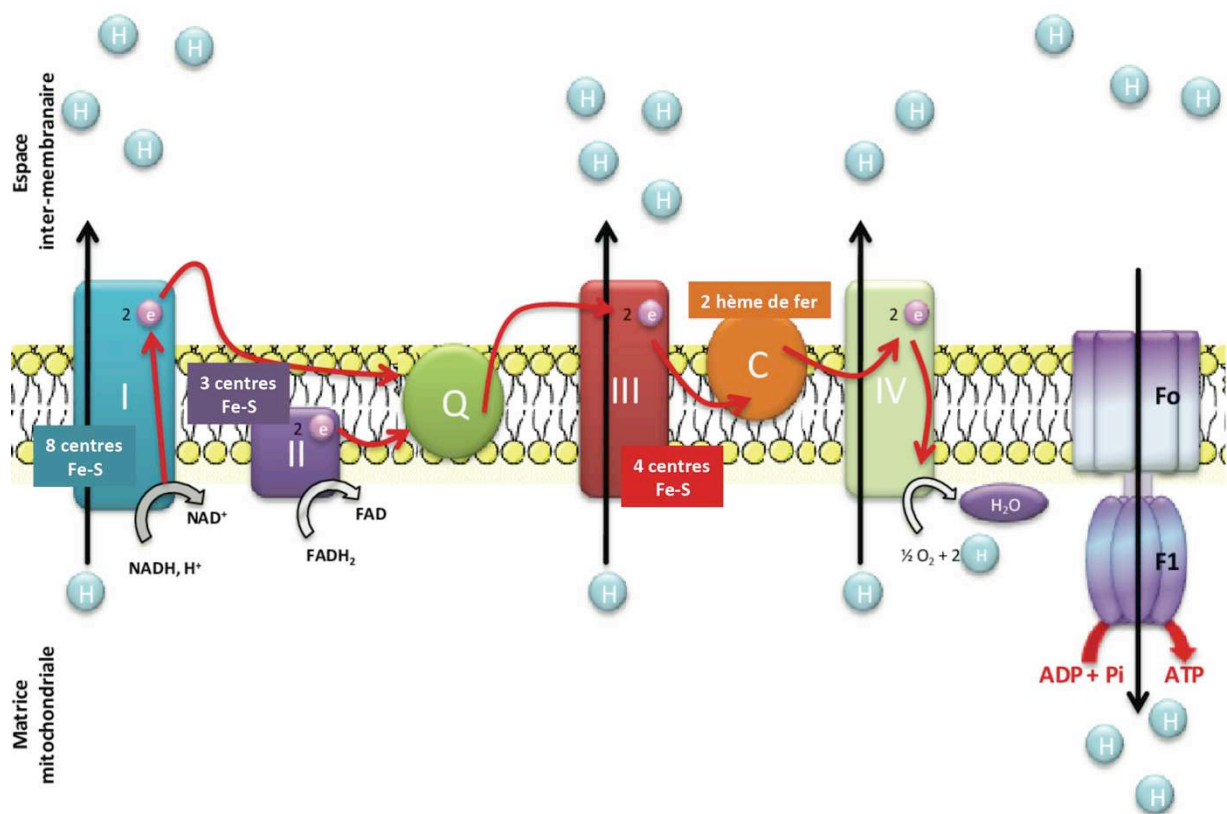


Figure 3. Le fer dans les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Suite de complexes protéiques au niveau de la membrane interne de la mitochondrie permettant la synthèse d'ATP. La présence de fer dans chaque complexe a été inscrite. Adapté de Harbey, 2011.

catalysée par cette enzyme utilise l'oxygène pour former deux molécules de H₂O et faire à nouveau passer 4H⁺ dans l'espace inter membranaire.

Dans le cas de l'entrée d'électrons par le NADH, le bilan est un gain de 10 protons dans l'espace inter membranaire qui pourront retourner vers la matrice mitochondriale via l'ATP synthétase en formant ainsi (de façon théorique) 3 molécules d'ATP. Dans le cas où le FADH₂ est le donneur initial, le gain de protons est seulement de 6, engendrant une formation théorique de 2ATP (figure 3).

La chaîne respiratoire mitochondriale est un système extrêmement complexe faisant intervenir de nombreux centres Fe-S ainsi que des hèmes de Fer. Il illustre donc parfaitement l'importance du fer pour le bon fonctionnement de l'organisme.

2. L'homéostasie du fer

Le fer dans l'organisme fonctionne en cycle fermé, il n'existe aucun système d'excrétion du fer connu à ce jour. Le fer est absorbé tout au long de l'embryogenèse, puis, après naissance, de l'enfance jusqu'à l'âge adulte, il reste ensuite piégé au sein du corps humain. Il devrait donc théoriquement être inutile de continuer d'absorber du fer au cours de notre vie adulte.

Mais la desquamation, l'exfoliation et les sécrétions des épithélia (peau, muqueuses...) ainsi que les saignements (blessures, menstruations...) conduisent à des pertes de fer. Ces pertes représentent 1 à 2 mg par jour, soit environ 0,05% de la quantité totale de fer dans l'organisme. Ainsi, des systèmes ont été sélectionnés pour permettre un import du fer alimentaire.

2.1. Absorption du fer

Le fer est absorbé par l'organisme uniquement depuis l'alimentation. Le fer est présent dans la nourriture animale ou végétale, avec une biodisponibilité plus grande pour le fer

d'origine animale. On définit comme biodisponibilité la proportion d'un nutriment/élément (ici le fer) présent dans un type de nourriture que le corps peut absorber ou utiliser de façon fonctionnelle. En effet, on retrouve le fer héminique exclusivement dans la nourriture animale (viande rouge, volaille, poisson, fruits de mer, œufs, lait...), dont environ 25% est assimilable par l'organisme (Carpenter and Mahoney, 1992) à la différence du fer non-héminique (aussi bien présent dans la nourriture d'origine animale que dans les plantes, les graines, les légumes...). L'assimilation du fer non-héminique est comprise entre 5 et 10% notamment dû à son insolubilité, mais certains facteurs comme l'acide ascorbique (vitamine C) peuvent améliorer son assimilation en augmentant sa solubilité (Gulec et al., 2014; Lynch and Cook, 1980).

Lors de la prise alimentaire, le fer présent dans la nourriture se situe du côté luminal du petit intestin. Il est donc nécessaire que le fer passe la barrière intestinale. A ce jour, cette absorption est connue pour se passer exclusivement au niveau des entérocytes du duodénum, partie proximale du petit intestin. Une des particularités de l'entérocyte est sa polarisation, on distingue donc son côté apical avec sa bordure en brosse (côté lumen de l'intestin) de son côté baso-latéral (côté lamina propria/côté hôte).

Selon le type de fer présent dans l'alimentation, deux voies semblent coexister pour faciliter son entrée dans l'entérocyte. En effet, le fer héminique (exclusivement issu des protéines animales) semble passer cette membrane grâce à un transporteur d'hème, HCP1 (pour heme carrier protein 1) (Le Blanc et al., 2012; Shayeghi et al., 2005). Initialement identifié chez le porc en 1979 (Gräsbeck et al., 1979), cette protéine transmembranaire est située au niveau duodéal du côté apical. Cependant, les mécanismes par lesquels HCP1 importe l'hème de fer restent inconnus à ce jour et il semble qu'il puisse aussi fonctionner comme transporteur de folate (Qiu et al., 2006). Une fois dans le cytoplasme, le fer contenu dans l'hème est dissocié grâce à une réaction catalysée par les Hème Oxygénases 1 et 2 (HMOX1/2) libérant un ion Fe^{2+} ainsi que du monoxyde de carbone CO et de la biliverdine. En parallèle, le fer alimentaire non-héminique Fe^{3+} emprunte une voie d'entrée différente. Il

doit tout d'abord être réduit en Fe^{2+} pour être importé comme un ion divalent. Cette réduction est réalisée grâce à un cytochrome B de classe b561, à la membrane apicale de l'entérocyte du duodénum, DCYTB (pour Duodenal cytochrome B, voir cette revue pour plus d'informations sur sa fonction et ses régulations : (Lane et al., 2015). Il semblerait qu'en conditions physiologiques d'autres ferroréductases puissent intervenir dans la réduction du fer en vue de son import, notamment les protéines STEAPs (pour Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate) (Gunshin et al., 2005; Ohgami et al., 2006). Ainsi réduit, le fer peut être alors importé grâce au co-transporteur DMT1 (pour Divalent Metal Transporter 1), lui aussi présent côté apical de la membrane de l'entérocyte. Ce transporteur facilite le passage du Fe^{2+} en même temps qu'un proton qui retournera dans le lumen grâce à un échangeur antiport Na^+/H^+ (NHE). Il a été montré que la ferritine alimentaire pouvait être absorbée par l'entérocyte et participer au stock de Fe^{2+} cellulaire suite à une dégradation lysosomale mais les mécanismes de son importation sont à ce jour inconnus (Theil et al., 2012).

Le stock de fer libre Fe^{2+} ainsi constitué au sein de l'entérocyte aura deux destins possibles en fonction des besoins. Il est soit pris en charge par la ferritine, protéine de stockage du fer intracellulaire en vue d'une utilisation future; soit transporté par la ferroportine (FPN), le seul exporteur de fer connu à ce jour, qui se situe sur le côté baso-latéral de la membrane entérocytaire pour rejoindre la circulation sanguine afin de subvenir aux besoins des autres organes. Trop peu d'informations sont disponibles sur la manière dont le fer intracellulaire rejoint son exporteur. Il a cependant été montré que la protéine chaperonne PCBP2 (pour poly(rC)-binding protein 2) est capable d'interagir avec la région N-ter de DMT1 côté apical et FPN côté baso-latéral, suggérant un rôle de navette dans le transit du fer (Yanatori et al., 2014). Identifié par plusieurs groupes à la même période (Abboud and Haile, 2000; Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000), la ferroportine (FPN) est un transporteur transmembranaire de 62,5 kDa (pouvant porter des glycosylations induisant des modifications de son poids moléculaire)(Canonne-Hergaux et al., 2006; Drakesmith et al.,

2015; Ross et al., 2017) composé de douze segments organisés en deux unités fonctionnelles. Chaque unité contient 6 hélices, connectées entre elles par une large boucle cytoplasmique entre les segments transmembranaires 6 et 7. A ce jour, le mécanisme exact par lequel la FPN laisse passer le fer est encore mal connu ; il est proposé que la FPN fonctionne en interrupteur ouvert/fermé, laissant d'abord entrer le Fe^{2+} dans une cavité ayant des affinités pour cet ion divalent, dans une conformation ouverte côté cytoplasmique; puis lorsque le fer s'est lié, il induit des modifications de conformation conduisant à l'inversion de l'interrupteur, qui s'ouvre du côté extracellulaire (Drakesmith et al., 2015). Il a récemment été montré que le calcium est un cofacteur important pour le transport du fer par la FPN (Deshpande et al., 2018). La FPN fonctionne en association avec une ferroxidase, pouvant être ancrée dans la membrane plasmique côté baso-latérale par une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol). Au niveau du duodénum, cette ferroxidase est l'hephaestine qui limite la réactivité du fer Fe^{2+} en l'oxydant sous forme Fe^{3+} dès sa sortie de la cellule. Il semblerait que la présence d'une ferroxidase soit essentielle pour permettre la libération du fer et le retour de la FPN dans sa conformation initiale (Comme démontré dans des cellules astrocytaires - (De Domenico et al., 2007) De plus, il a été montré que la ferroxidase peut interagir directement avec la FPN afin de limiter au maximum la sortie d'ion Fe^{2+} extrêmement réactif, et donc réduire sa toxicité (Jeong and David, 2003). Le cation Fe^{3+} tout juste oxydé est alors pris en charge par la transferrine (Tf), protéine de transport du fer dans la circulation sanguine (figure 4).

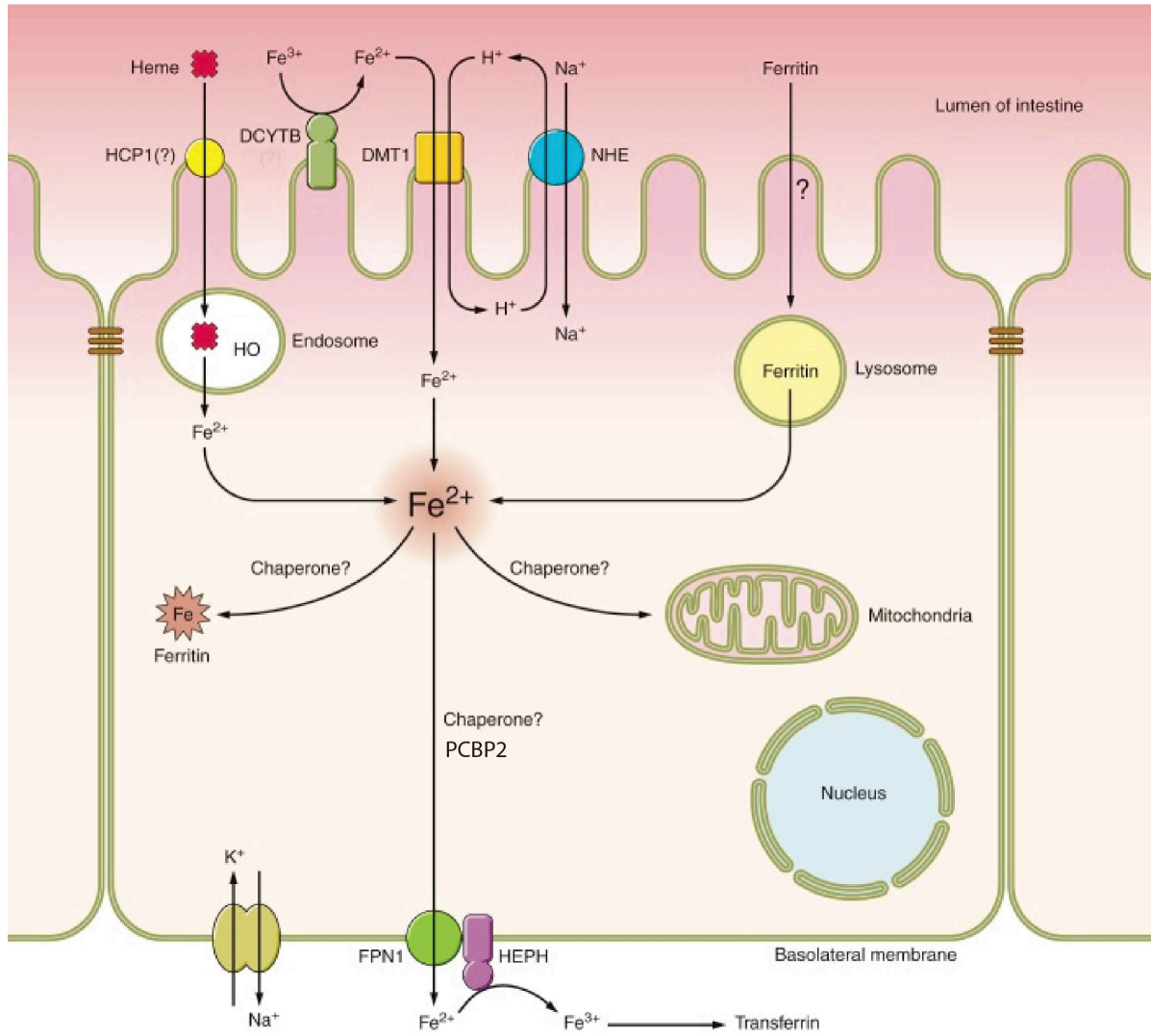


Figure 4. Mécanismes de l'absorption du fer dans le duodénum des mammifères. Un entérocyte est dépeint avec sa machinerie de transport permettant l'assimilation du fer alimentaire. Le fer alimentaire est absorbé par les entérocytes au niveau du duodénum. L'hème de fer traverse la membrane apicale des cellules probablement au travers d'un transporteur, potentiellement HCP-1. Le fer non-héminique est réduit par DCYTB et importé sous sa forme ferreuse par DMT1. Dans le cytosol, le fer peut être stocké grâce à la ferritine ou exporté via la ferroportine. Le fer libéré est ensuite oxydé par l'hephaestine pour faciliter sa liaison avec la transferrine. Adapté de Gulec et al., 2014.

2.2. Transport et stockage du fer

Une fois absorbé par l'entérocyte, puis libéré dans la circulation sanguine par le couple FPN/hephaestine, le fer circule majoritairement lié à la Tf. Cette protéine de transport du fer de 76kDa est synthétisée par le foie. Composée d'une seule chaîne polypeptidique, elle peut lier deux ions Fe^{3+} avec une grande affinité ($K_a = \sim 10^{22} \text{ M}^{-1}$). Cette liaison est réversible, permettant à la Tf de passer de son état libre, l'Apo-Tf, à son état lié au fer, l'Holo-Tf, et inversement en fonction notamment du pH (Aisen et al., 1978; Steere et al., 2012).

Un paramètre biologique régulièrement évalué est la saturation de la Tf, c'est le pourcentage réel d'occupation du fer sur la totalité des sites de fixation théoriques du fer de la Tf à l'instant du prélèvement. Ce paramètre permet d'évaluer notamment la charge en fer des tissus. Chez un individu sain, le taux de saturation de la Tf est d'environ 30%. On considère que jusqu'à 45% de saturation de la Tf, le taux est normal (en absence de signes cliniques additionnels) mais ce taux peut s'élever à 50-60% dans certaines pathologies de surcharge en fer, comme l'hémochromatose, voire même à 80% dans certains cas extrêmes.

La Tf circule dans le sang avec trois buts principaux : 1) assurer le transport de fer pour subvenir aux besoins des différents tissus; 2) maintenir le Fe^{3+} dans une forme soluble; 3) conserver le fer sous une forme inerte, minimisant ainsi la production de radicaux libres.

L'holo-Tf favorise l'apport en fer aux cellules qui le nécessitent, en se liant au Récepteur à la Transferrine (TfR) à la membrane extracellulaire (Jandl and Katz, 1963). Ce récepteur est composé de deux glycoprotéines transmembranaires liées en homodimère par des ponts disulfures. Ce récepteur est capable de lier une molécule de Tf sur chacune de ses sous-unités. Il existe deux récepteurs à la Tf, TfR1 et TfR2, partageant chez l'Homme 45% d'identité et 66% de similarité au niveau du domaine extracellulaire (Kawabata et al., 1999). TfR1 est exprimé de façon ubiquitaire tandis que TfR2 est exprimé par les tissus régulant

l'homéostasie du fer, particulièrement le foie, les érythroblastes et le petit intestin (Deaglio et al., 2002). TfR1 possède une très grande affinité pour l'holo-Tf (avec une constante d'affinité $K_a=1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ pour l'holo-Tf et $K_a=4.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour l'apo-Tf - (Young et al., 1984). A l'inverse TfR2 a une affinité 25 à 30 fois plus faible pour l'holo-Tf que son homologue TfR1 (Graham et al., 2008). La liaison du TfR1 à l'holo-Tf est donc bien plus favorable que la liaison de l'apo-Tf, en condition de suffisance en fer systémique. Cependant, dans certains contextes de déficience en fer, la saturation de la Tf peut être réduite entraînant une augmentation de la proportion d'apo-Tf circulante pouvant augmenter les chances d'interaction de l'apo-Tf avec le TfR1 (Brock, 1989).

Lorsque la liaison est établie, le complexe Tf-TfR1 est alors endocyté dans des vésicules par un système dépendant des clathrines. Cet endosome s'acidifie jusqu'à un pH de 5 grâce à des ATPases à protons (Núñez et al., 1990; Paterson et al., 1984; Yamashiro et al., 1983). Les modifications de conformations engendrées par l'interaction holo-Tf-TfR ainsi que l'acidification diminue l'affinité du fer pour la Tf dissociant ainsi le fer du complexe holo-Tf-TfR (Bali et al., 1991). Le fer libéré est réduit en Fe^{2+} par STEAP3 (Ohgami et al., 2005) puis exporté de l'endosome vers le cytosol de la même façon que dans l'intestin, grâce à DMT1 pour ensuite être pris en charge par sa protéine de stockage intracellulaire (Gkouvatsos et al., 2012). Le complexe apo-Tf-TfR retourne à la membrane grâce à des protéines de trafic intracellulaire, notamment sec1511 (Lim et al., 2005). Le récepteur se détache de la Tf insaturée (apo-Tf) qui est libérée dans la circulation sanguine (figure 5). En juillet 2019, une équipe de Curie s'apprêtait à publier un article décrivant un potentiel nouveau transporteur du fer, CD44, agissant de façon indépendante de TfR1 permettant l'import du fer lié à des hyaluronates dans des cellules tumorales lors de la transition epithelio-mésenchymateuse (Müller et al., 2019).

Lorsqu'il circule, le fer est donc hautement contrôlé pour réduire sa forte réactivité et éviter les dommages cellulaires. Afin d'assurer un contrôle parfait des niveaux de fer, il existe d'autres protéines pouvant transporter le fer comme l'haptoglobine qui peut lier

l'hémoglobine libre ou encore l'hémopexine liant les hèmes libres (Hvidberg et al., 2005; Kristiansen et al., 2001). S'il est nécessaire d'assurer un état inerte au fer lorsqu'il circule, il est aussi absolument indispensable de pouvoir le stocker au sein des cellules sans risque. Il existe pour cela une protéine spécialisée dans le stockage du fer, la ferritine. Chez l'Homme, cette protéine est constituée de 24 sous-unités de deux types : la ferritine H (pour heavy ou lourde) de 21 kDa et la ferritine L (pour light ou légère) de 19 kDa. Elle fonctionne en véritable éponge pouvant stocker jusqu'à 4500 atomes de fer. Les sous-unités H possèdent une activité ferroxidase permettant la stabilisation minérale de ce fer sous forme Fe^{3+} .

Le stockage du fer est centralisé au niveau du foie. Cet organe stocke environ 1g de fer, soit entre un cinquième et un tiers du fer total de l'organisme.

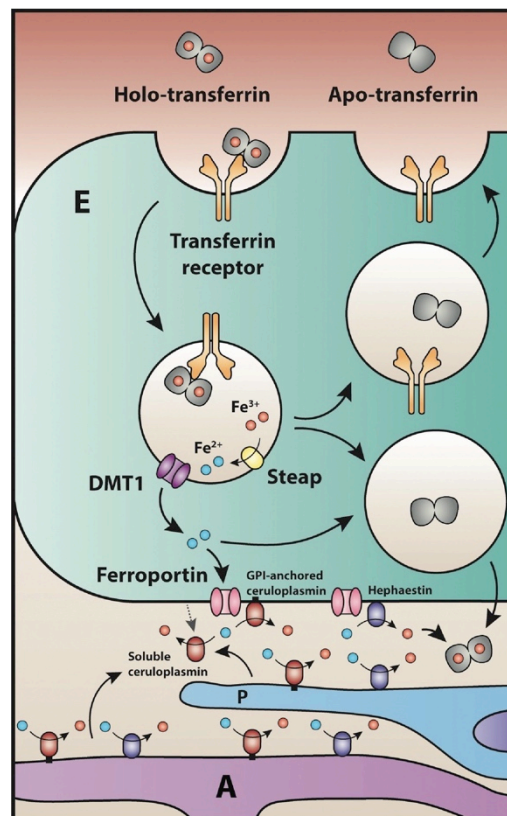


Figure 5. Import du fer plasmatis lié à la transferrine. L'endocytose du complexe Tf-TfR est suivi d'une acidification du pH de l'endosome permettant la libération du fer lié à la Tf. Il est ensuite réduit par les STEAPs en fer ferreux puis exporté par DMT1 hors de l'endosome. Adapté de Johnsen et al., 2019.

2.3. Recyclage du fer

Nous avons précédemment vu que le fer reste majoritairement en circuit fermé dans l'organisme. Le globule rouge est un grand consommateur de fer, avec environ 70% du fer total de l'organisme qui est utilisé par l'hémoglobine. Ayant une durée de vie autour de 120 jours (pouvant varier de plus ou moins 15% suivant les individus et l'âge - (Franco, 2012) chez une personne saine, le stock de globules rouges doit être renouvelé. En effet, chaque seconde, environ deux millions de nouveaux érythrocytes sont produits nécessitant un apport journalier de 20 à 30 mg de fer uniquement pour l'érythropoïèse (Ponka et al., 1998). Il est donc absolument indispensable de recycler le fer des globules rouges sénescents afin de permettre la synthèse de nouveaux érythrocytes fonctionnels.

Ce rôle est assuré par des cellules immunitaires spécialisées dans l'érythrophagocytose (la phagocytose des érythrocytes arrivés en fin de vie - (Beaumont and Delaby, 2009; Nairz et al., 2014) Ces cellules particulières sont les macrophages du système réticulo-endothélial, situés majoritairement dans la pulpe rouge de la rate (mais aussi en moindre proportion dans le foie ou la moelle osseuse). D'anciennes publications ont pu mettre en évidence que si le rôle de nettoyage du sang est assuré par la rate en condition physiologique, l'ablation de la rate n'induit pas une augmentation de la durée de vie des globules rouges, traduisant une rapide compensation par les autres tissus ayant des cellules du système réticulo-endothélial (Knutson and Wessling-Resnick, 2003).

Au cours de leur vie, les globules rouges passent de nombreuses fois par la pulpe rouge de la rate. Cette zone présente une structure particulière spécialisée dans la filtration du sang et la suppression des globules sénescents ou ne répondant pas à certains critères fonctionnels et structurels (Groom et al., 1991). En vieillissant ils présentent des changements morphologiques, de densité, d'activité métabolique et de molécules à leur surface. En effet, ils deviennent plus petits, plus denses, leur activité métabolique diminue et leur protéines de surface subissent des modifications (Arese et al., 2005; Boas et al.,

1998; Burger et al., 2012; Franco, 2009; Kay, 2005; Lutz, 2004; Piomelli and Seaman, 1993) engendrant une mort cellulaire de type erytose (Lang et al., 2005). Ces modifications sont reconnues comme des signaux de type "mangez-moi" par les macrophages érythrophagocytaires. Une fois ces signaux reconnus, ces macrophages vont alors phagocyter le globule rouge sénescant. Ils sont capables ensuite de dissocier l'hémoglobine, d'extraire l'hème de fer et de récupérer près d'un milliard d'atomes de fer par globule rouge ingéré (Bratosin et al., 1998; Knutson and Wessling-Resnick, 2003). La moyenne de phagocytose estimée est d'un globule rouge phagocyté par jour et par macrophage (Sibille et al., 1988).

Après reconnaissance et phagocytose du globule rouge sénescant, un panel d'enzymes hydrolytiques est sécrété dans le phagolysosome pour permettre la dégradation du globule rouge. S'ensuit une digestion protéolytique de l'hémoglobine libérant ainsi les hèmes de fer. De nombreuses publications ont démontré une sortie de l'hème du phagolysosome pour être ensuite dégradé dans le cytosol par les hèmes oxygénases (notamment l'inductible HMOX1 et la constitutivement exprimée HMOX2) libérant l'atome de fer de la protoporphyrine ainsi qu'une molécule de biliverdine et du monoxyde de carbone (Gottlieb et al., 2012; Yanatori et al., 2010; Yoshida and Sato, 1989). Des études plus récentes ont mis en évidence le rôle de la protéine HRG1 dans la sortie de l'hème du phagolysosome vers le cytosol (Delaby et al., 2012; White et al., 2013). A nouveau la ferritine et la FPN interviennent si le fer récupéré a besoin d'être stocké ou exporté respectivement. A la différence des entérocytes, l'oxydase associée à la FPN est ici la ceruloplasmine (Delaby et al., 2005; Harris et al., 1999; Knutson et al., 2005)(figure 6).

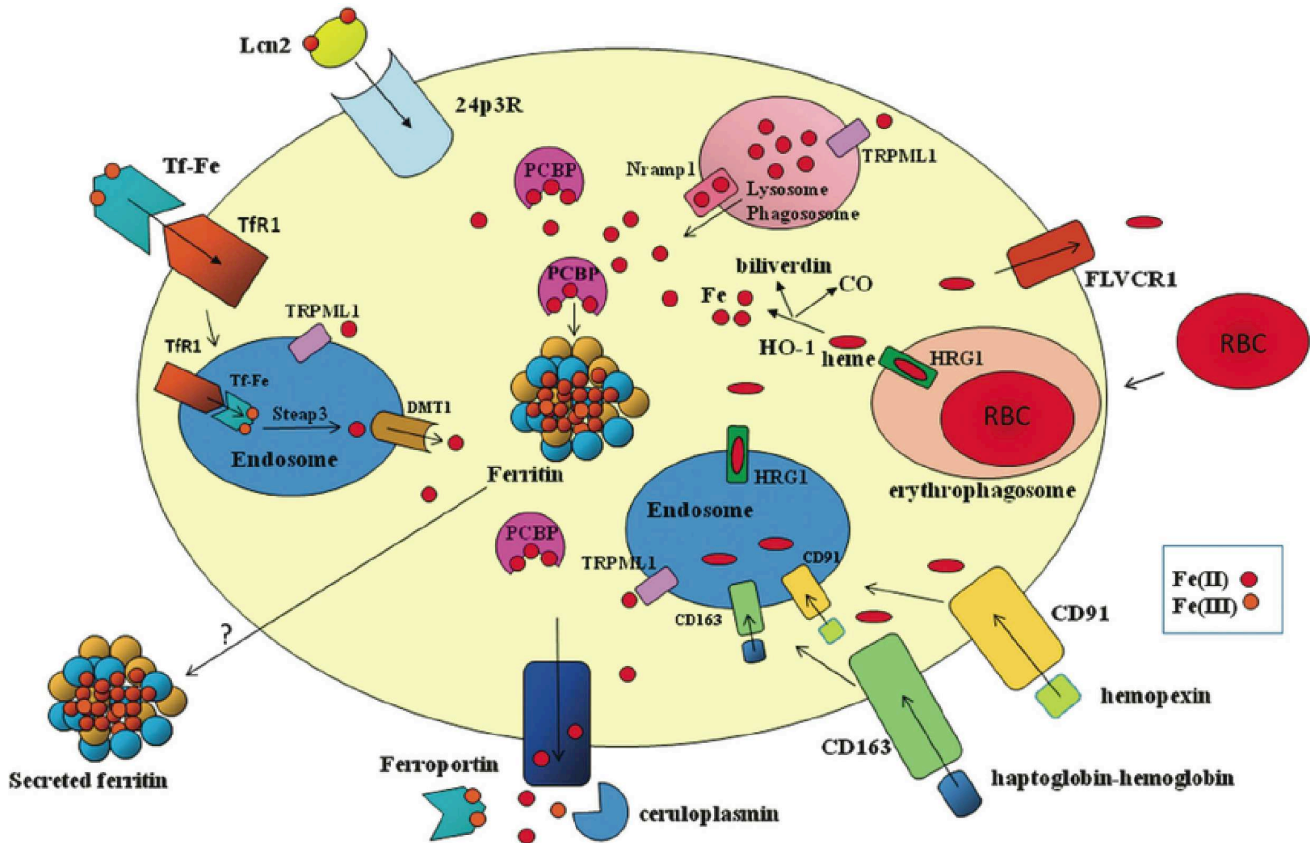


Figure 6. Principales voies d'entrée et de trafic intracellulaire du fer dans les macrophages. Les macrophages acquièrent le fer héminique par ingestion des érythrocytes sénescents et par une internalisation médiée par récepteur de l'hème libre (interaction hemoexine et CD91) ou de l'hémoglobine (interaction haptoglobine avec CD163). Les hèmes sont ensuite dégradés par l'hème oxygénase (HO-1) pour libérer du monoxyde de carbone, de la biliverdine et du fer qui est accompagné jusqu'à la ferritine par des protéines de la famille des PCBP. Une partie de l'hème peut être exporté via FLVCR1. Les macrophages peuvent aussi obtenir le fer depuis la transferrine par endocytose du complexe TfR1-Tf-Fe. Le fer libéré est ensuite réduit par STEAP-3 et transporté au travers de la membrane endosomale par DMT1. Les macrophages peuvent aussi acquérir le fer grâce au récepteur à la lipocaline (Lcn-2) et ainsi le fer lié au sidérophore capturé par Lcn-2. L'excès de fer est expulsé majoritairement par la ferroportine sous forme Fe^{2+} qui sera oxydé par la ceruloplasmine en Fe^{3+} et lié à la transferrine. La sécrétion de ferritine liée au fer peut représenter une voie alternative de libération du fer. Tiré de Gamella et al., 2014.

2.3. Régulation cellulaire de l'homéostasie du fer

Afin de réguler leurs niveaux de fer intracellulaire en fonction de leurs besoins, les cellules ont la capacité d'importer, d'exporter et de stocker le fer grâce aux différents systèmes évoqués précédemment. Cependant, il est nécessaire que toutes ces régulations soient orchestrées minutieusement. Il existe donc des systèmes d'évaluation des niveaux de fer intracellulaires pour réguler de façon post-transcriptionnelle l'expression des gènes participant à l'homéostasie du fer.

Cette régulation est possible grâce à des motifs IRE (pour Iron Responsive Element), séquences d'ARN consensus 5'-CAGUGN-3' (avec N=U/C/A) ayant une structure tige boucle situés en 5' ou en 3' des ARN messagers de certaines protéines régulant l'homéostasie cellulaire du fer (figure 7). Ce motif tige boucle est spécifiquement reconnu par les deux protéines IRP 1 et 2 (pour Iron Regulatory Protein). Ces protéines cytosoliques de la famille des isomérasas à centre fer-soufre (Frishman and Hentze, 1996) sont capables d'interagir avec les motifs IRE de façon dépendante du fer. IRP1 est présente dans la grande majorité des tissus et alterne entre deux états, liée au fer ou non, en fonction de la quantité de fer intracellulaire. Lorsque le fer est présent dans la cellule, son centre Fe-S est saturé empêchant son interaction avec le motif IRE et préservant son

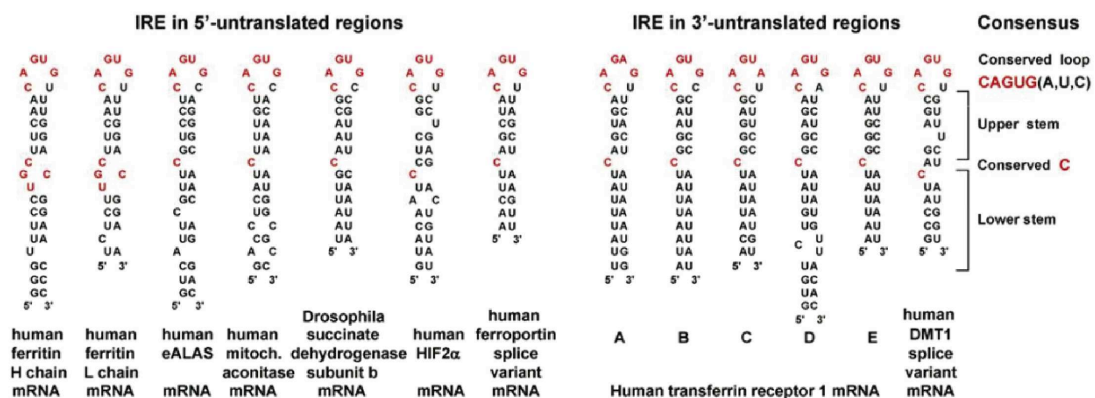


Figure 7. Principaux IRE reconnus par les IRPs sur les ARNm liés à l'homéostasie du fer. A gauche, les ARNm possédant un IRE situé en 5'-UTR conduisant à un blocage de la traduction. A droite, les ARNm possédant un IRE en 3'-UTR conduisant à une augmentation de la stabilité de l'ARNm. Tiré de Kühn, 2015.

activité enzymatique d'aconitase, elle catalyse alors la transformation du citrate en isocitrate (figure 8) (Haile et al., 1992; Lauble et al., 1992). En condition de carence en fer intracellulaire, son centre Fe-S est insaturé empêchant son activité enzymatique et permettant son interaction avec le motif IRE et la régulation de la traduction de l'ARN messenger ciblé. La protéine IRP2 ne possède pas d'activité enzymatique aconitase, bien qu'elle présente les structures protéiques nécessaires pour cela. Présente en moins grande quantité que l'IRP1, IRP2 semble avoir des affinités différentes pour certains motifs IRE (Henderson et al., 1996; Ke et al., 1998).

A la différence d'IRP1, lorsque la quantité de fer intracellulaire est suffisante, la protéine IRP2 est dégradée. Il a été montré que cette dégradation d'IRP2 et non pas d'IRP1 est médiée par FBXL5 via une séquence de 73 acides aminés présente sur l'IRP2 (Guo et al., 1995; Iwai et al., 1995; Moroishi et al., 2011). L'effet de l'IRP sur la régulation de la

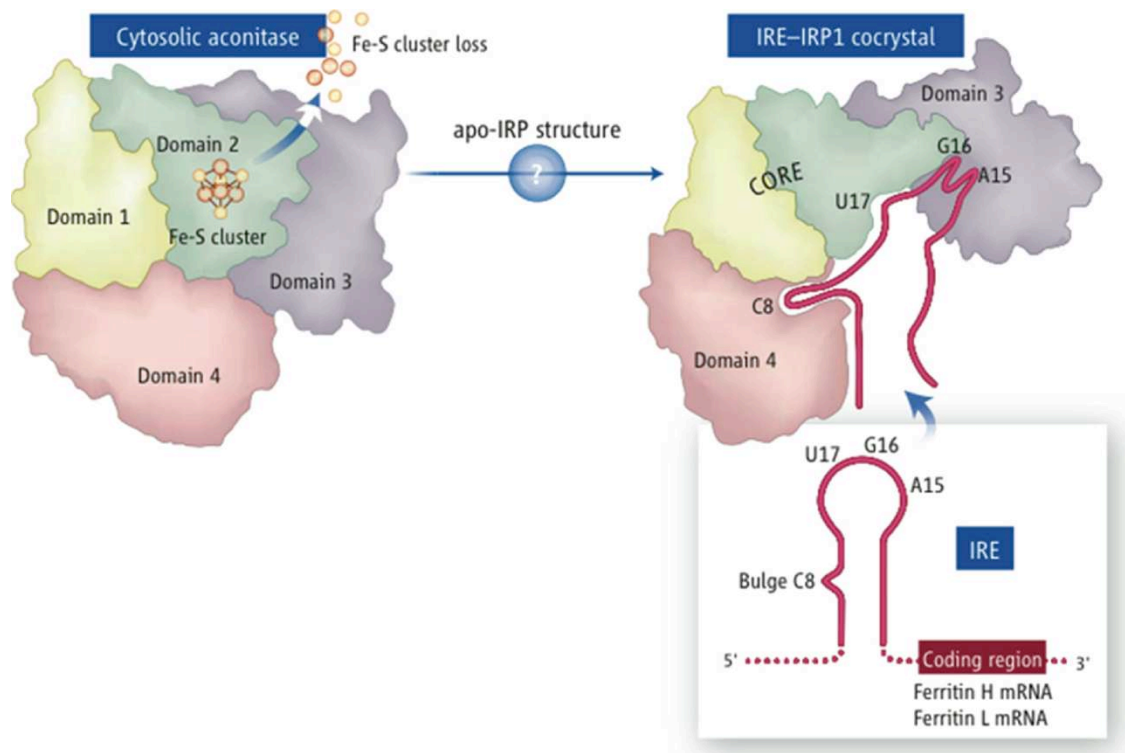


Figure 8. Fonctionnement de la régulation des ARNm possédant un IRE par l'aconitase cytosolique IRP1, en présence et absence de fer. Lorsqu'elle lie l'IRE, IRP1 réprime la traduction des transcrits contenant un IRE en 5'-UTR et stabilise les transcrits contenant un IRE en 3'-UTR en les protégeant d'une dégradation endonucléolytique. Tiré de Rouault and Maio, 2017.

traduction de l'ARN messenger cible va dépendre de la position du motif IRE sur l'ARN messenger.

Lorsque le motif est situé en 5' de la région codante de l'ARN messenger, l'interaction avec l'IRP va induire un encombrement stérique empêchant la fixation du ribosome et donc la traduction de l'ARN messenger. On retrouve un IRE en 5' des ARN messagers codants pour des protéines du stockage du fer (les sous-unités H et L de la ferritine par exemple)(Aziz and Munro, 1987; Hentze et al., 1987) ainsi que ceux codant pour des protéines d'export du fer (la FPN par exemple) (figure 9).

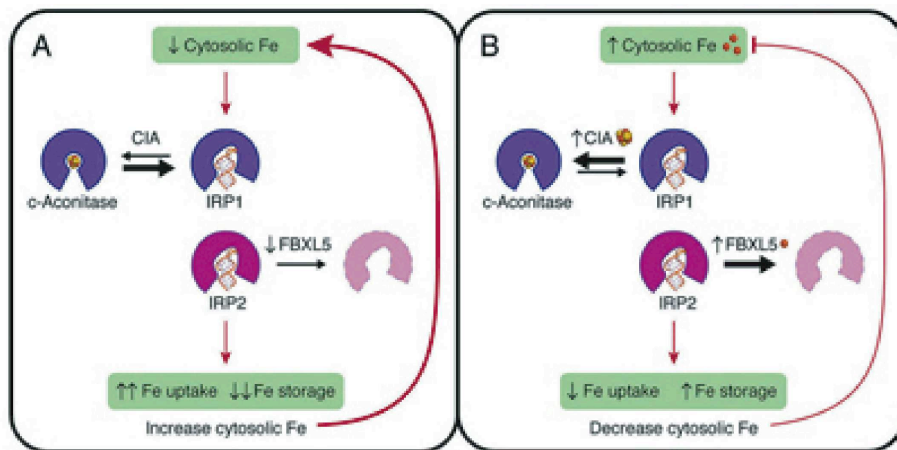


Figure 9. IRP1, IRP2, FBXL5 et CIA (cytosolic Fe-S cluster assembly) assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire du fer de façon coordonnée. A. La diminution du fer cytosolique induit le changement de rôle de l'aconitase en IRP1 et son action sur les ARNm liés à l'homéostasie du fer. B. L'augmentation du fer cytosolique favorise l'association de IRP1 avec le fer la faisant passer dans son rôle d'aconitase et supprimant son action sur les ARNm liés à l'homéostasie du fer. Tiré de l'article de Mushegian à propos de Johnson et al., 2017.

Lorsque le motif est situé en 3' de la région codante de l'ARN messenger, l'interaction avec l'IRP va induire une stabilisation de l'ARN messenger comme montré pour TfR1 (Müllner and Kühn, 1988). On retrouve un IRE en 3' UTR (untranslated region ou région non traduite) des ARN messagers codants pour des protéines impliquées dans l'import du fer, telles que DMT1 ou TfR1 par exemple. Il existe cependant un variant du transcrite de la FPN exprimé uniquement dans les érythrocytes et le duodénum qui ne possède pas d'IRE et échappe au contrôle par les IRP (Cianetti et al., 2005; Zhang et al., 2009). Pour plus d'informations sur le système IRE/IR et ses régulations, se référer à la revue de Lukas Kühn (Kühn, 2015).

3. L'hepcidine, régulateur clé de l'homéostasie du fer

3.1. La régulation systémique du fer

Le fer est absorbé au niveau de la partie proximale du petit intestin pour circuler de façon contrôlée, être stocké et délivré aux tissus en fonction des besoins. Mais tous ces échanges de fer entre les différents organes, son absorption et son recyclage nécessitent une régulation fine, de façon à éviter les excès ou les carences en fer. L'acteur peptidique clé de la régulation systémique du fer est l'hormone hepcidine. L'hepcidine fut initialement identifiée comme peptide antimicrobien par sa ressemblance avec les β -défensines et son activité bactéricide faible. Majoritairement sécrétée par le foie, elle fut d'abord nommée LEAP-1 pour Liver Expressed Antimicrobial Peptide 1 puis hepcidine pour hepatic bactericidal protein (Krause et al., 2000; Park et al., 2001). Cependant, si cette activité bactéricide est élevée chez les poissons (Lin et al., 2014), elle ne reste que très faible chez l'Homme et nécessite des doses très importantes pour être efficace. C'est en 2001 que des avancées importantes sont publiées sur les régulations et le rôle de l'hepcidine avec l'identification quasi simultanée par les équipes françaises d'Olivier Loréal et celle de Sophie Vaulont, de l'hepcidine comme acteur majeur de l'homéostasie du fer sécrété par le foie. La première publication a mis en évidence une surexpression hépatique d'un peptide 84 acides aminés similaire à l'hepcidine humaine chez des souris sous régime riche en fer en comparaison à des souris sous régime contrôle (Pigeon et al., 2001). La seconde publication a mis en évidence, au cours de l'étude d'un modèle murin Knock Out pour le gène USF2 (Upstream Stimulatory Factor 2), que l'expression de l'hepcidine était supprimée, dans le foie des animaux KO, conduisant à une sévère surcharge en fer chez les animaux, avec augmentation du fer hépatique et une diminution du stockage du fer dans la rate suggérant un rôle pour l'hepcidine dans l'absorption du fer et son stockage dans les macrophages de la rate (Nicolas et al., 2001). Ces observations ressemblaient

fortement à celles faites dans un modèle murin d'hémochromatose, les souris KO HFE. L'action de l'hepcidine sur l'absorption du fer est à nouveau confirmée par l'équipe de Sophie Vaulont dans un contexte d'anémie, grâce à des modèles murins surexprimant cette fois-ci l'hepcidine. Ces souris présentent une sévère anémie due à une forte insuffisance de l'absorption du fer (Nicolas et al., 2002). Le mode d'action de l'hepcidine a été mis en évidence par l'équipe de Tomas Ganz qui a montré que l'hepcidine peut réguler l'import et le recyclage du fer en se liant à la FPN, le seul exporteur de fer connu, pour induire son internalisation et sa dégradation par le lysosome (Nemeth et al., 2004b; Qiao et al., 2012). Cette dégradation permet la régulation du fer systémique en agissant au niveau des sites d'absorption du fer (duodénum intestinal) et de recyclage du fer (système réticulo-endothélial) (De Domenico et al., 2009; Nemeth et al., 2004b). Il a récemment été montré que si l'hepcidine peut induire la dégradation de la FPN, elle peut aussi jouer un rôle d'occlusion de la FPN, élargissant ainsi son rôle à l'inhibition de la sortie du fer intracellulaire de manière plus générale (figure 10) (Aschemeyer et al., 2018).

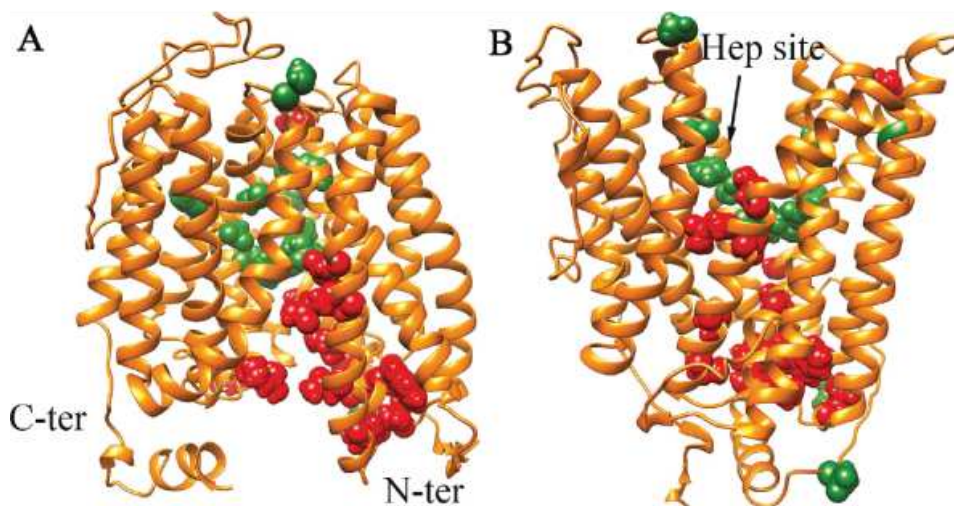


Figure 10. Modélisation de la structure de la ferroportine humaine et du site de fixation de l'hepcidine. A, la conformation est ouverte vers l'intérieur de la cellule. B, la conformation est ouverte vers l'extérieur de la cellule. Tiré de Tortosa et al., 2017.

3.2. La régulation de l'expression de l'hepcidine

L'hepcidine est majoritairement synthétisée par le foie. Le gène de l'hepcidine (HAMP) code pour un prépropeptide de 84 acides aminés qui nécessite une maturation pour libérer sa forme fonctionnelle de 25 acides aminés. La partie N-term du prépropeptide contient premièrement une séquence d'adressage au réticulum endoplasmique de 34 acides aminés, suivie d'une séquence consensus de reconnaissance par les furines pour permettre le clivage. Le premier clivage est essentiel à la libération de l'hormone tandis que le second semble plutôt permettre la maturation du peptide afin de le rendre fonctionnel (Valore and Ganz, 2008). Bien que la forme de 25 acides aminés soit la plus abondante et la seule identifiée comme fonctionnelle, il existe deux autres formes de 22 et 20 acides aminés, issus d'une protéolyse de 5 acides aminés en C-terminal de l'hepcidine 25, résultant en la suppression de la séquence essentielle à l'interaction de l'hepcidine avec la

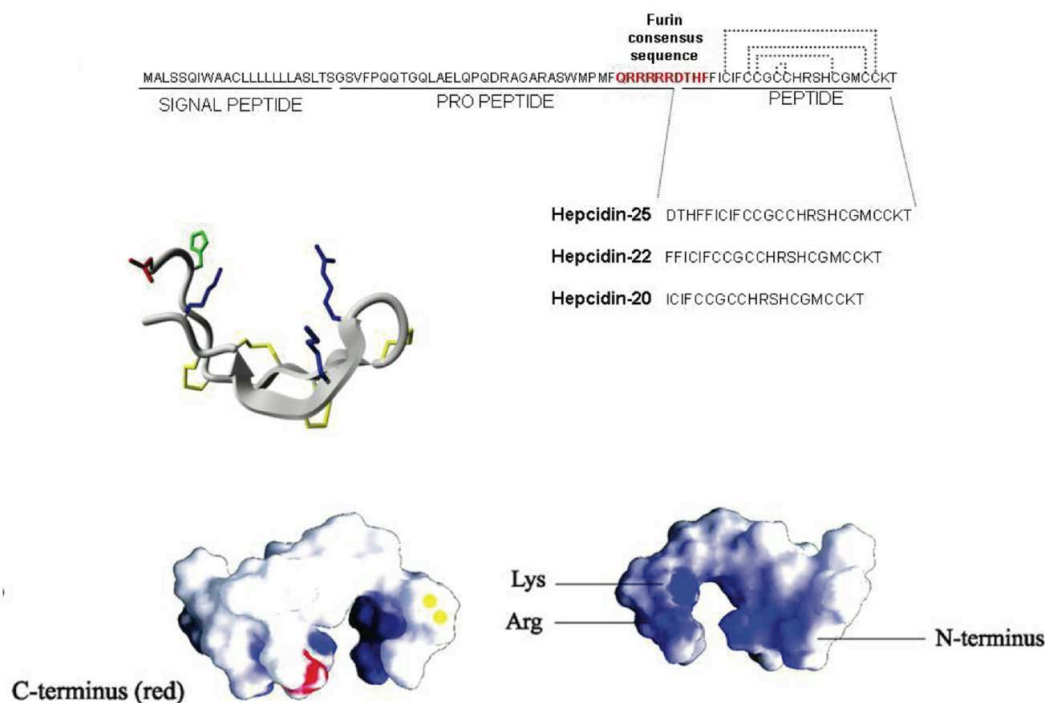


Figure 11. Structure de l'hepcidine. A, séquence d'acides aminés codant pour les trois formes de 25, 22 et 20 acides aminés. B, Modélisation des deux feuillets β de l'hepcidine 25, stabilisés par les quatre ponts disulfure en jaune. C, Modélisation de la répartition des charge de l'hepcidine 25. En bleu sont modélisés les résidus cationiques et en blanc les résidus hydrophobes. Tiré de Poli et al., 2014.

FPN (Nemeth et al., 2006). Le rôle de ces formes 22 et 20 n'a pas encore été défini à ce jour. Ces deux formes sont majoritairement retrouvées dans les urines et en faible quantité dans le sérum (Park et al., 2001). Il semble que la forme 22 soit rapidement dégradée en forme 20 tandis que la forme 25 reste, quant à elle, plus stable (Addo et al., 2016)(figure 11). Bien que d'autres tissus, puissent l'exprimer, notamment en réponse à l'infection, notre équipe a montré que l'hepcidine hépatique est suffisante pour contrôler l'homéostasie du fer systémique (Zumerle et al., 2014). Les voies de régulation de l'hepcidine sont principalement connues au niveau des hépatocytes. Dans ces cellules, l'expression de l'hepcidine est sous le contrôle de deux principaux stimuli externes : le statut en fer et l'inflammation. Ces stimuli empreignent les voies de signalisation canoniques BMP/SMAD et JAK/STAT et peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur la régulation de l'expression de l'hepcidine.

La régulation de l'hepcidine par le fer

Le fer circulant lié à la transferrine est reconnu par une plateforme moléculaire spécifique à la membrane cytoplasmique des hépatocytes. Cette plateforme est composée des récepteurs au Bone Morphogenetic Proteins I et II (BMPR-I/II), de la protéine hémophiline (HJV, nommée comme ceci car elle est mutée dans la majorité des cas d'hémochromatoses juvéniles), la protéine HFE (pour High Fe) et les deux récepteurs à la Transferrine (TfR1 et 2). Bien que toutes les subtilités de cette régulation ne soient pas élucidées à ce jour, il a pu être proposé que HFE interagisse avec TfR1, non lié à l'holo-Tf, et lorsque la saturation de la Tf augmente, l'interaction de l'holo-Tf avec TfR1 (qui a une bien plus grande affinité que l'interaction avec TfR2) induit la libération de HFE qui peut alors interagir avec TfR2 et induire la phosphorylation des SMAD 1/5/8 effectrices (Gao et al., 2009). Les SMADs ainsi phosphorylés interagissent avec la SMAD co-activatrice, SMAD4, et ce complexe protéique transloque alors vers le noyau pour activer la transcription de l'hepcidine (Wang et al., 2005). Indépendamment, il a été montré qu'une augmentation de

la quantité de fer était capable d'induire l'expression de certaines protéines de la famille du TGF- β , les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (Andriopoulos et al., 2009; Meynard et al., 2009). L'étude du KO BMP6 murin a permis d'identifier BMP6 comme acteur majeur (et ayant une fonction non redondante avec les autres BMPs) dans la régulation du fer. Cependant, la régulation des BMP par le fer seul n'est pas suffisante pour induire l'expression de l'hepcidine car il semblerait que les protéines HFE et HJV soient indispensables à l'augmentation transcriptionnelle de l'hepcidine par la voie BMP/SMAD. Depuis il a été montré que BMP2 est induit en réponse au fer et participe à l'augmentation de l'expression de l'hepcidine dans le foie (Canali et al., 2017). On observe notamment différentes formes d'hémochromatose héréditaires où HFE et HJV peuvent être mutées résultant en une absence d'augmentation de l'expression de l'hepcidine, soulignant le rôle essentiel de ces acteurs protéiques dans la régulation de l'hepcidine.

Lorsque le niveau de fer du corps est suffisant, ce système permet l'expression de l'hepcidine et donc la limitation de l'import du fer et de son recyclage. A l'inverse, lors d'un besoin accru en fer, pour soutenir l'érythropoïèse par exemple, le manque de fer ou l'hypoxie répriment l'expression de l'hepcidine de façon à augmenter l'absorption du fer et son recyclage.

La régulation de l'hepcidine par l'inflammation

Le statut en fer régule donc positivement la transcription de l'hepcidine par la voie BMP/SMAD mais ce n'est pas la seule voie capable d'agir positivement sur l'expression de l'hepcidine. L'inflammation est aussi capable d'induire l'hepcidine. En effet, lors de la mise en place du processus inflammatoire, il y a une augmentation de certains médiateurs tels que les cytokines. Il a été montré que l'augmentation de l'IL-6 ou l'IL-22 pouvaient induire l'expression de l'hepcidine par une voie JAK/STAT dans les hépatocytes (Nemeth et al., 2004a; Smith et al., 2013; Wrighting and Andrews, 2006). Cette régulation de l'hepcidine dans des contextes particuliers, tels que l'infection, l'inflammation ou la régénération

tissulaire semble s'étendre à de nombreux types cellulaires, soutenant l'hypothèse que l'hepcidine extra-hépatique pourrait avoir un rôle soit local sur la régulation du fer, soit un rôle immuno-modulateur comme décrit pour de nombreux peptides antimicrobiens (Lakhal-Littleton et al., n.d.; Malerba et al., 2020; Peyssonnaud et al., 2006; van Harten et al., 2018) (figure 12).

La régulation de l'hepcidine par l'érythropoïèse

Nous avons vu que le fer est majoritairement employé pour l'érythropoïèse, il est donc logique que cette voie de synthèse régule l'absorption du fer. En effet, lors d'une érythropoïèse accrue, l'expression de l'hepcidine est diminuée de manière à stabiliser la FPN, à la surface notamment des macrophages du système Réticulo Endothélial et des entérocytes du duodénum, afin de favoriser le relargage et l'absorption du fer respectivement. En condition d'anémie ou d'hypoxie, le taux du facteur stimulant de l'érythropoïèse, EPO pour érythropoïétine, augmente rapidement. Ce régulateur de l'érythropoïèse agit sur les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse et de la rate qui répondent en induisant rapidement, par une voie JAK2/STAT5, l'érythroferrone (ERFE) qui régule négativement l'expression de l'hepcidine (Kautz et al., 2014). A ce jour, le mode d'action de ERFE est encore mal connu et aucun récepteur n'a pu être identifié. Cependant, une récente étude suggère une action répressive d'ERFE sur l'expression de l'hepcidine médiée par la modulation des BMP, et notamment BMP6 (Arezes et al., 2018).

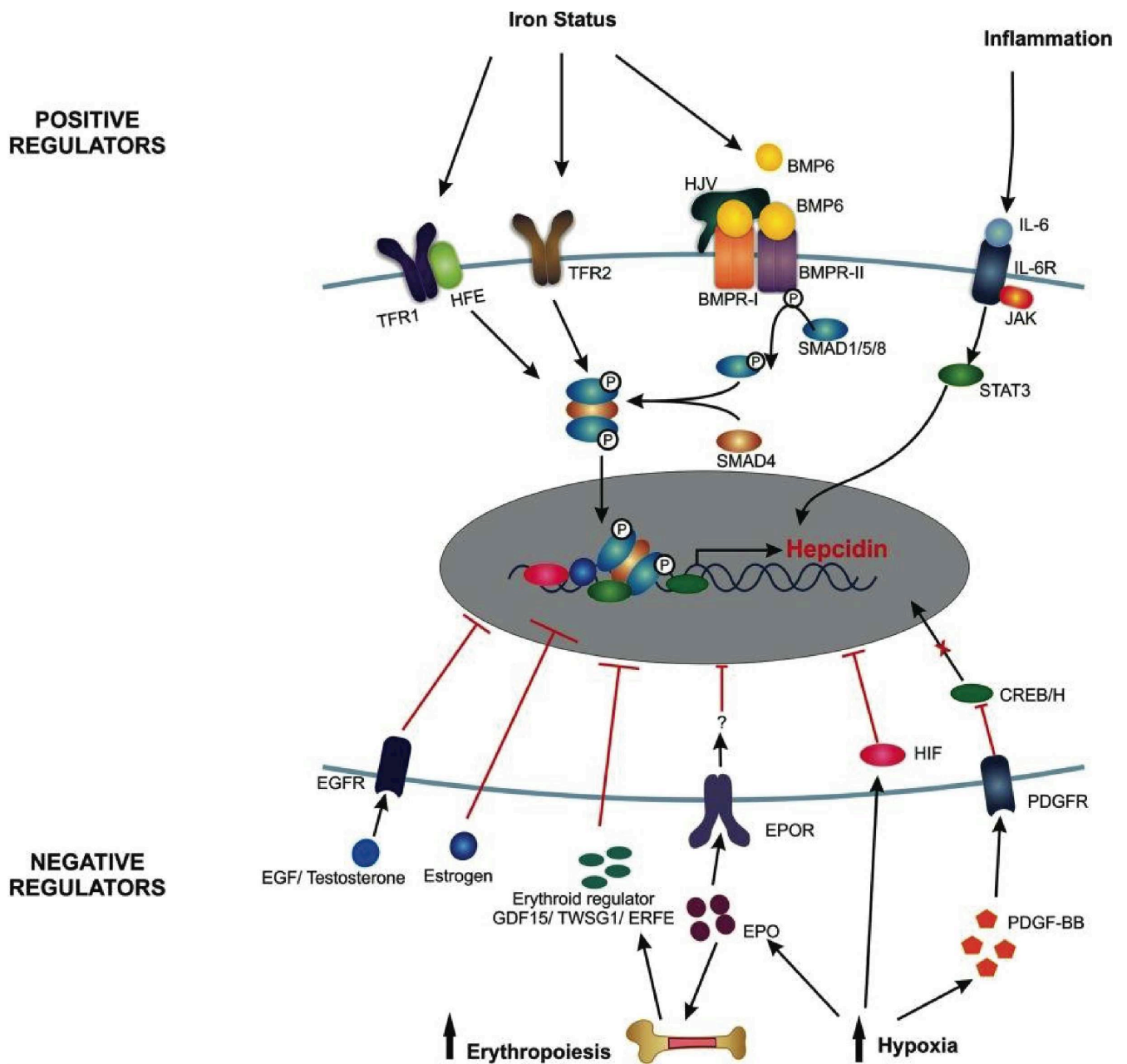


Figure 12. Schéma synthétique des régulateurs positifs et négatifs de l'hepcidine. Tiré de Rishi et al., 2015. En haut, les régulateurs positifs de l'expression de l'hepcidine. En bas, les régulateurs négatifs de l'expression de l'hepcidine. BMP6, bone morphogenetic protein 6; BMPR-I, bone morphogenetic protein receptor-I; BMPR-II, bone morphogenetic protein receptor-II; CREB/H, cAMP response-element binding protein/H; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; EPO, erythropoietin; EPOR, erythropoietin receptor; ERFE, erythropoietin receptor; GDF15, growth differentiation factor 15; HFE, hemochromatosis protein; HIF, hypoxia-inducible factor; HJV, hemojuvelin; IL6, interleukin 6; IL-6R, interleukin 6 receptor; JAK, Janus kinase; PDGF-BB, platelet-derived growth factor-BB; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; SMAD1/5/8, sma and mothers against decapentaplegic homologue 1/5/8 complex; SMAD4, sma and mothers against decapentaplegic homologue 4; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TFR1, transferrin receptor 1; TFR2, transferrin receptor 2; TWSG1, twisted gastrulation BMP signaling modulator 1.

Chapitre 2 : Système immunitaire inné, les neutrophiles comme première réponse à l'infection

Dans une lutte égoïste pour sa propre survie, pour son renouvellement et ses besoins nutritifs et énergétiques, l'hôte tout comme le pathogène vont se livrer un combat. En condition physiologique, les commensaux, pathogènes ou pathogènes facultatifs se développent à l'extérieur du corps, sur la peau ou dans le tractus intestinal par exemple. Si certains endroits sont plus propices au développement des bactéries, notamment les zones humides, chaudes et riches en métabolites comme l'intestin, les aisselles, l'aîne ou encore les pieds, les bactéries ne seront pas obligatoirement néfastes pour l'hôte. Ce n'est bien souvent qu'une fois dans un réservoir inapproprié que la pathogénicité s'exprime. Ainsi, avant de se retrouver dans la circulation sanguine ou dans les organes riches en fer, sucres ou encore dérivés d'acides aminés, les pathogènes doivent passer une série de barrières à la fois physiques, l'épithélium semi hermétique intestinal par exemple, mais aussi biochimiques et fonctionnelles grâce des mécanismes de défense. La production d'immunoglobulines, les sécrétions de peptides antimicrobiens ainsi que d'un panel complexe de protéases, RNAses et DNAses assurent une protection chimique robuste. De plus, la barrière biologique assurée par le système immunitaire de l'hôte mais aussi la flore commensale qui recouvre l'épithélium permettent le maintien homéostatique (Bulet P., 2005). Bien que chaque épithélium ait une structure cellulaire et physique qui lui est propre (kératinisé pour la peau ou non pour les muqueuses par exemple), on retrouve dans la plupart des cas une couche externe de protection suivie d'une couche plus interne richement vascularisée et surveillée par de nombreuses cellules immunitaires (majoritairement associées à l'immunité innée, comme les macrophages ou les cellules dendritiques) appelées résidentes de part leur présence continue dans cette zone sous épithéliale. Ceci permet une solide défense du corps face à des envahisseurs microbiens

redoutables par les stratégies multiples employées pour détourner les défenses de l'hôte (Saha et al., 2017).

Cependant, certains contextes physiopathologiques, tels que l'immunodépression ou l'immunosuppression, les dérèglements métaboliques ou les brèches dans la barrière épithéliale peuvent conduire au passage du pathogène vers des couches plus sensibles du corps. Ces éléments intrusifs se mettent alors à exprimer une multitude de facteurs de virulence. La présence du pathogène et des signaux qu'il sécrète sont alors reconnus par les cellules immunitaires et mésenchymateuses résidentes de la couche sous-épithéliale, grâce particulièrement au système de reconnaissance Soi versus Non-soi (PAMP/PRR pour Pathogen Associated Molecular Patterns/Pattern Recognition Receptors), permettant la mise en place du signal de danger. Ces cellules à l'origine de la reconnaissance se mettent alors à leur tour à produire des signaux permettant d'amplifier l'intensité et de propager ce signal à toute la zone concernée (Mogensen, 2009). La forte et rapide production de chimiokines et cytokines inflammatoires permet le recrutement et l'activation de cellules immunitaires depuis la circulation sanguine, via la chimioattraction et la modification des signaux d'adhésion à la surface des vaisseaux sanguins facilitant l'extravasation.

Les premières cellules à être recrutées sont les polynucléaires neutrophiles, abondamment présents dans la circulation sanguine (50 à 70% des leucocytes circulants chez l'Homme). Ces cellules sont des phagocytes de l'immunité innée possédant une machinerie de réponse rapide, ne nécessitant bien souvent que très peu de transcription d'ARNm pour répondre à l'infection grâce à la présence abondante de granules chargés en substances bactéricides, facilitant ainsi la rapide destruction du pathogène. Nous verrons plus en détails une partie de ces différents mécanismes par la suite.

1. Les neutrophiles : granulopoïèse, sortie de la moelle osseuse et durée de vie

1.1. Généralités

La majorité des cellules circulantes de la voie sanguine sont générées dans la moelle osseuse selon un processus appelé hématopoïèse. L'étymologie de ce mot trouve son origine dans deux termes grecs : αἷμα ou αἷματος, signifiant le "sang"; et ποιεῖν, signifiant "faire" ou "fabriquer". Cependant, si ce processus permet de "fabriquer le sang", il est nécessaire que de nombreux types cellulaires soient générés par des processus de différenciation puis de maturation.

La moelle osseuse est composée de cellules souches hématopoïétiques, de nombreux macrophages et de multiples types cellulaires en cours de différenciation ou en cours de stockage au sein d'un tissu conjonctif réticulé et richement vascularisé. Sous ce grand processus d'hématopoïèse, on distinguera trois processus sous-jacents : l'érythropoïèse, permettant la création des globules rouges ou érythrocytes; la leucopoïèse, permettant de générer les leucocytes ou globules blancs; et la thrombocytopoïèse, permettant la fabrication des plaquettes. Pour les besoins de cette étude, nous nous concentrerons sur la leucopoïèse. La leucopoïèse regroupe elle-même trois grands processus de différenciation : la granulopoïèse, permettant la formation des neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles, des basophiles et des éosinophiles; la monocytopoïèse, permettant la formation des monocytes; et la lymphopoïèse aboutissant à la formation des lymphocytes et des Natural Killers (NKs).

Pour permettre la génération de ces nombreux types cellulaires, une cellule souche hématopoïétique peut, lors de sa division et sous le contrôle de différents facteurs de croissance et cytokines, de gènes clés mais aussi de micro ARN, générer un progéniteur

commun tout en maintenant le stock de cellules souches. C'est un processus de différenciation par étapes qui permet l'acquisition progressive de caractères propres au lignage final. Cependant, cette différenciation par étape semble bien plus complexe que la classification classique présentée en figure 13, avec un passage par des progéniteurs multipotents puis oligopotents, des possibilités de différenciations croisées ainsi qu'une différenciation selon un continuum plutôt qu'un passage successif d'étapes déterministes (Cheng et al., 2020; Theret et al., 2019). Dans un but de clarté, nous resterons dans ce modèle plus simple de classification hiérarchique pour comprendre comment sont formés les neutrophiles.

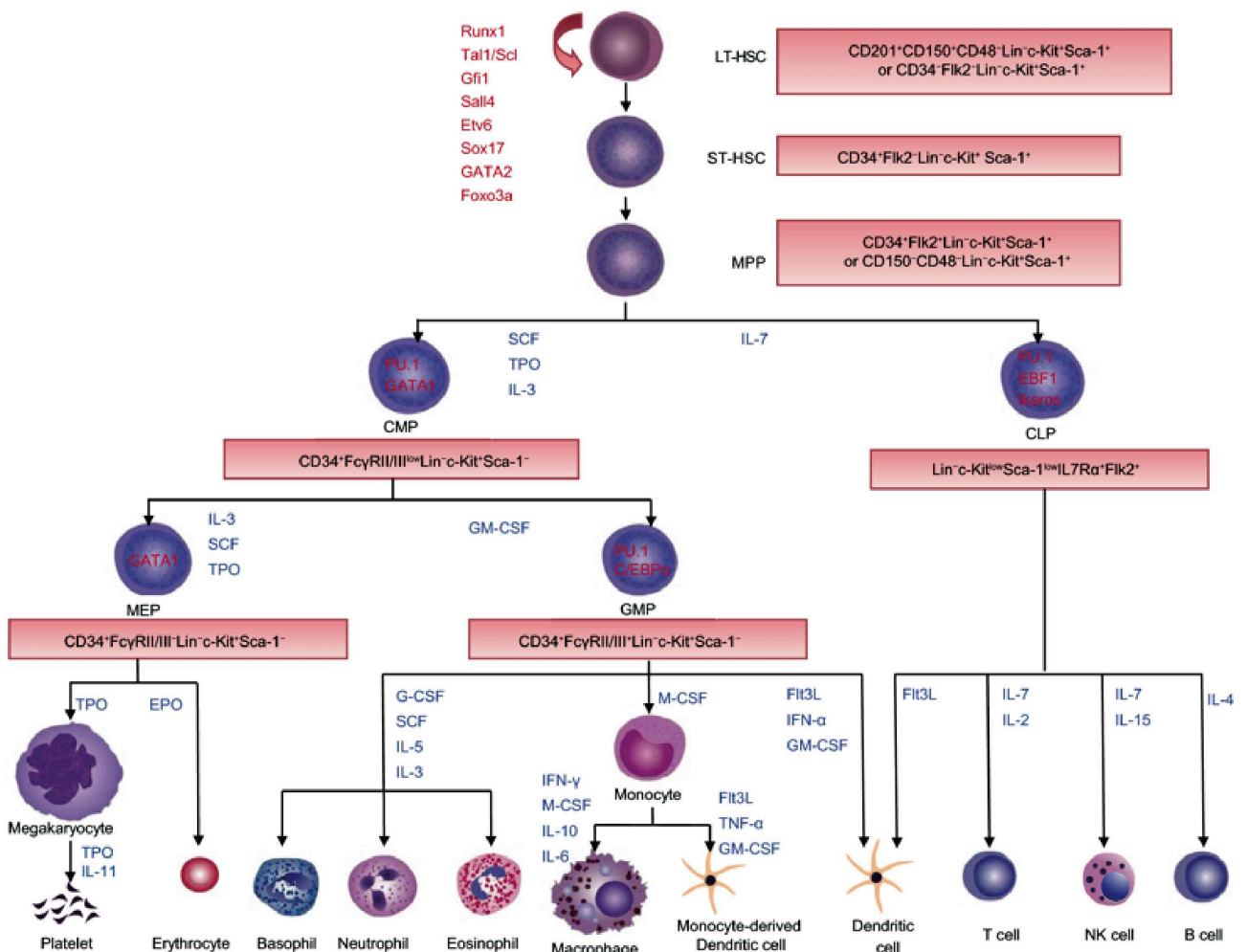


Figure 13. La hiérarchie hématopoïétique classique. Les cellules souches hématopoïétiques à long-terme (LT-HSC) génèrent des cellules souches hématopoïétiques à court-terme (ST-HSC) qui se différencieront en progéniteurs multipotents (MPP). Le destin du progéniteur multipotent est contrôlé par les facteurs environnants pour favoriser la différenciation vers un précurseur commun de type myéloïde (CMP) ou lymphoïde (CLP). A son tour, le CMP pourra générer des précurseurs de type mégacaryocyte-érythrocyte (MEP) ou de type granulocyte-macrophage (GMP) sous le contrôle notamment du GM-CSF.

1.2. Granulopoïèse dans la moelle osseuse

Qu'est-ce que la granulopoïèse et quel sera le destin cellulaire du progéniteur myéloïde commun ? Le processus de granulopoïèse dure environ 10 jours chez l'Homme et c'est l'environnement en facteurs de croissance et cytokines, l'activation de gènes spécifiques qui permettra une différenciation vers un lignage cellulaire plutôt qu'un autre.

Ainsi, un environnement riche en SCF, TPO et IL-3 et une activation majeure des gènes PU.1 et GATA-1 influencera la différenciation du progéniteur multipotent vers un progéniteur commun myélocytaire ou CMP (Zhu and Emerson, 2002). A ce stade, un environnement riche en GM-CSF et une expression dominante de PU.1 semblent être essentiels à la formation du progéniteur commun pour les lignages granulocytaires et monocytaires (GMP). S'ensuit l'activation d'un pattern d'expression de C/EBP α , crucial pour influencer la différenciation du GMP vers le lignage granulocyttaire en activant l'expression notamment du récepteur au G-CSF et de la myéloperoxidase (MPO) (Hohaus et al., 1995; Radomska et al., 1998; Smith et al., 1996; Wang et al., 2001) (figure 14).

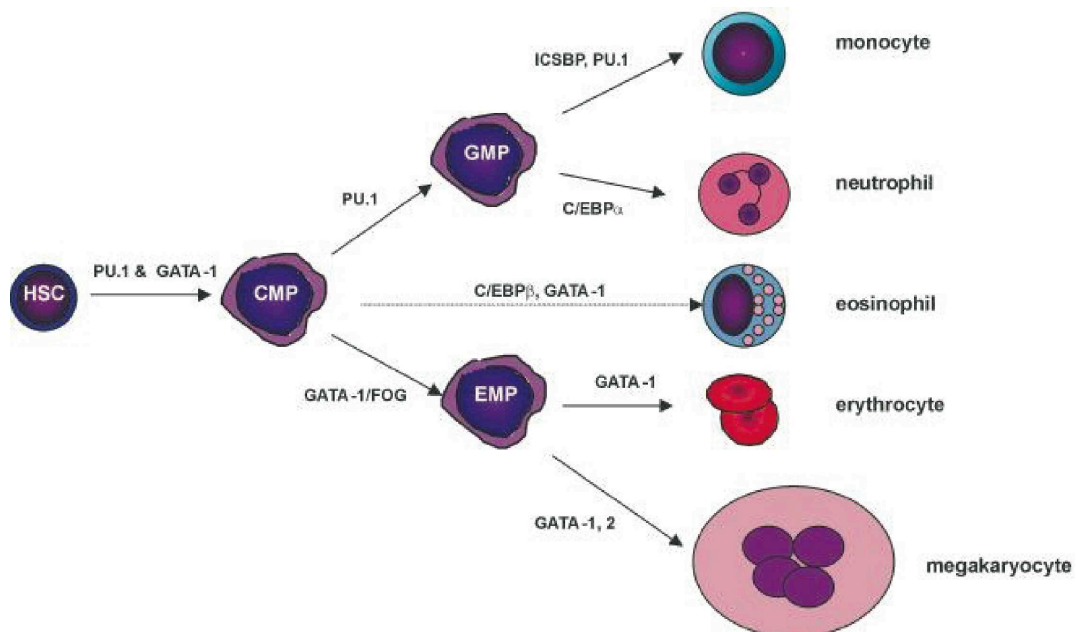


Figure 14. Régulation transcriptionnelle de l'engagement du progéniteur myéloïde commun (CMP). Le CMP peut se différencier aussi bien en précurseur pour les lignages granulocytique et monocytique/macrophagique (GMP) que pour les lignages érythroïde et mégacaryocytique (EMP). La double expression de PU.1 et GATA-1 conduit la cellule souche hématopoïétique (HSC) à se différencier en CMP. Puis l'expression dominante de PU.1 ou GATA-1 conduira le CMP en GMP ou EMP respectivement. Tiré de Zhu et Emerson, 2002.

Un environnement riche en G-CSF influencera ensuite le passage vers la granulopoïèse terminale qui commence par les stades myéloblaste et promyélocyte avec la formation des granules primaires ou azurophiliques. L'augmentation de l'expression de Gfi-1 déterminera alors le destin granulocytaire en activant des gènes spécifiques aux granulocytes et en supprimant le développement monocytaire (figure 13 et 14) (Borregaard, 2010). La différenciation se poursuit ensuite sous le contrôle majeur de C/EBP ϵ et l'acquisition des granules secondaires ou spécifiques aux stades myélocyte et métamyélocyte. Enfin, c'est l'étape terminale de maturation du neutrophile dans la moelle osseuse qui s'amorce avec un arrêt de la division cellulaire. C'est à cette étape qu'apparaît la segmentation du noyau caractéristique de ce type cellulaire sous le contrôle des C/EBP β , δ , γ et de PU.1. Ce noyau polylobé comporte entre 2 et 5 lobes chez l'Homme (majoritairement 3-4) reliés par un filament de chromatine condensée. C'est au cours de cette étape de maturation terminale que sont formés les granules tertiaires ou contenant la gélatinase ainsi que les vésicules sécrétoires (figure 15).

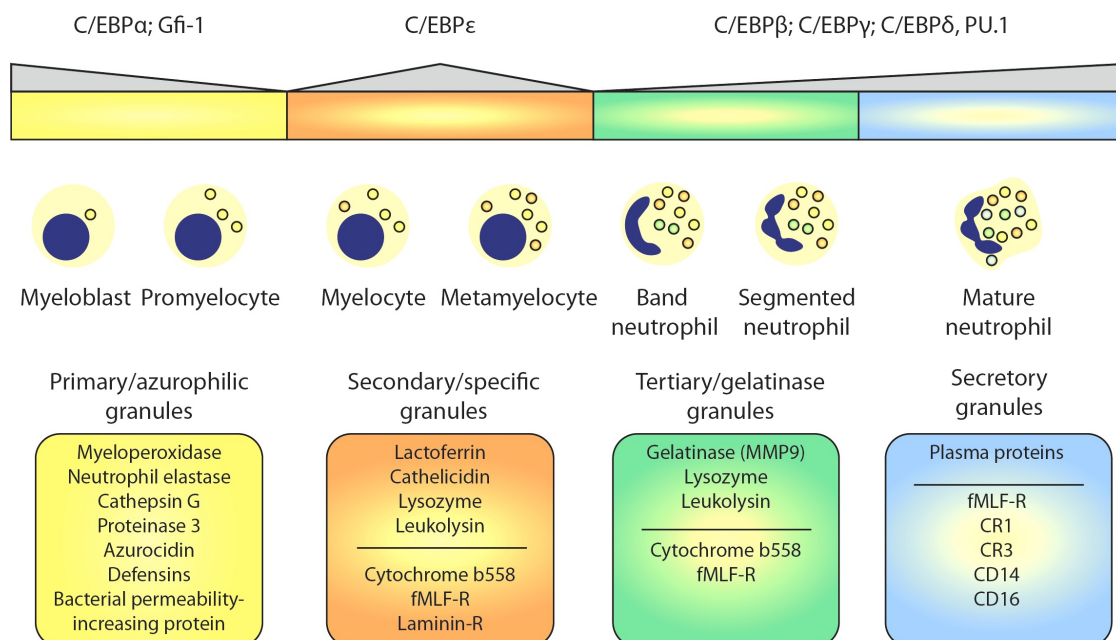


Figure 15. La granulopoïèse terminale dans la moelle osseuse. La granulopoïèse terminale se caractérise par la formation séquentielle des différents granules. La segmentation du noyau débute au stade myéloblaste/promyélocyte pour finir au neutrophile mature. Les granules ont un contenu bien spécifique permettant de les classer en différents types de granules. La séquence de déroulement de la granulopoïèse terminale est régulée par les principaux facteurs de transcription inscrits en haut de la figure. Adapté de Fiedler et Brunner, 2012.

1.3. Rétention et sortie des neutrophiles de la moelle osseuse

Afin d'exécuter leur fonction de patrouilleurs dans la voie sanguine, les neutrophiles doivent être relâchés depuis la moelle osseuse. Cette mobilisation est contrôlée principalement par deux récepteurs et leurs chimiokines associées. Les ostéoblastes expriment continuellement la chimiokine CXCL12/SDF-1 α qui active son récepteur cible à la surface du neutrophile : CXCR4 (Martin et al., 2003). CXCR4 a été mis en évidence comme récepteur de rétention des neutrophiles dans la moelle par son invalidation myéloïde-spécifique chez la souris (Eash et al., 2009). En parallèle, les chimiokines inflammatoires CXCL1, CXCL2 et IL-8 ont pour rôle d'induire la mobilisation des neutrophiles vers la voie sanguine. Il a aussi été montré que le G-CSF, le leukotriène B4 ainsi que le complément 5a (C5a) circulants participent à ce relargage de neutrophiles. Cette mobilisation suit un cycle nyctéméral en conditions physiologiques ou répond aux besoins immunitaires en conditions pathologiques. Ainsi, les neutrophiles dans la moelle sont pris entre deux messages contradictoires : la rétention versus la mobilisation. C'est donc la balance d'intensité entre ces deux signaux qui vont permettre d'induire la libération des neutrophiles dans la circulation sanguine. En effet, en condition inflammatoire ou infectieuse, la rapide induction des chimiokines CXCL1/2, IL-8 notamment active CXCR2 à la surface des neutrophiles stockés dans la moelle, induisant à la fois l'attraction des neutrophiles vers la circulation sanguine mais aussi l'inhibition de leur rétention par diminution du CXCR4 à leur surface (Eash et al., 2010). Un des facteurs de sortie de la moelle est le G-CSF. De La Luz Sierra M et al ont montré que le G-CSF réduit l'expression de CXCL12 et induit la diminution de son récepteur CXCR4 à la surface des neutrophiles par activation du facteur de transcription Gfi-1 contribuant ainsi à leur sortie de la moelle (De La Luz Sierra et al., 2007; Kim et al., 2006; Semerad et al., 2002). Il a été de plus mis en évidence que des

animaux invalidés pour le G-CSF ou son récepteur (G-CSFR) présentaient extrêmement peu de neutrophiles aussi bien dans leur circulation sanguine que dans leur moelle osseuse plaçant le G-CSF à la fois comme régulateur positif de la production et de la mobilisation neutrophilique (Lieschke et al., 1994). Le G-CSF est donc un élément essentiel au contrôle du passage des neutrophiles vers la voie sanguine en réduisant la rétention et potentialisant ainsi l'effet chimio-attractant des chimiokines telles que CXCL1 et CXCL2 (figure 16).

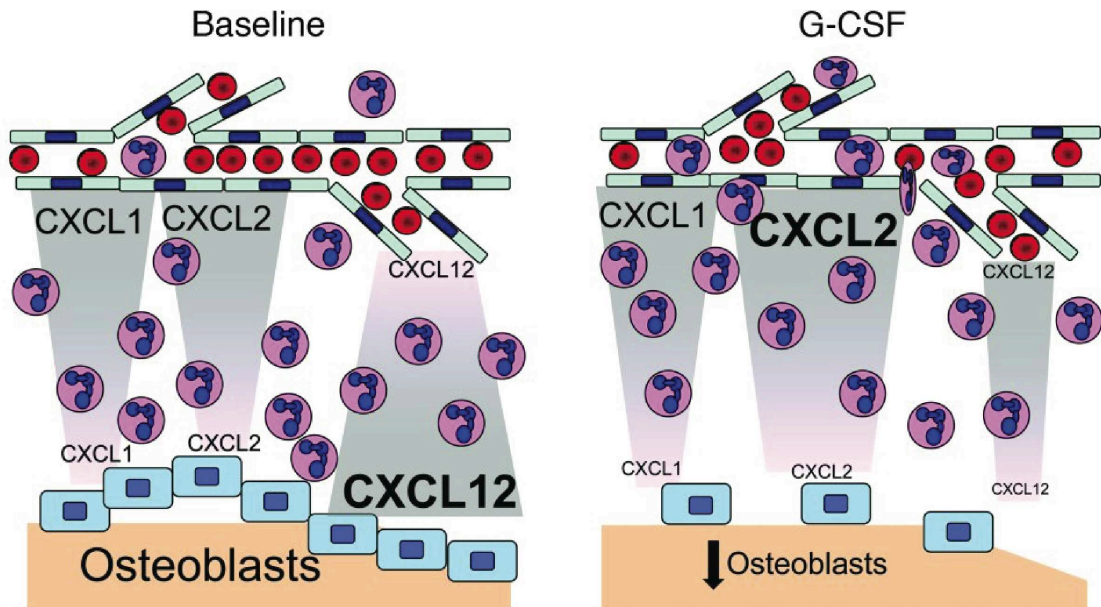


Figure 16. Modèle du tir à la corde du recrutement des neutrophiles depuis la moelle osseuse. La balance entre les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL12 permet de réguler la sortie du neutrophile de la moelle osseuse. En condition basale, l'expression abondante de CXCL12 par les cellules stromales de la moelle osseuse induit la rétention des neutrophiles dans la moelle, par l'activation de CXCR4. Au contraire, en condition de recrutement des neutrophiles, la forte quantité de CXCL1 et CXCL2 (principalement) sécrétée par les cellules endothéliales en réponse notamment au G-CSF, permet d'atténuer le signal de rétention et de conduire à la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse. Tiré de Eash et al., 2010.

Un second élément de rétention est la barrière physique constituée par l'endothélium sinusoidal. Le neutrophile doit passer au travers selon une voie transcellulaire (figure 17). L'intégrité de cette barrière permet d'éviter un relargage de neutrophiles en absence de stimulation. Cependant, ces cellules endothéliales sinusoidales sont perméables aux chimiokines de façon à établir un gradient de chimio-attractants des neutrophiles lorsqu'un besoin de mobilisation se présente.

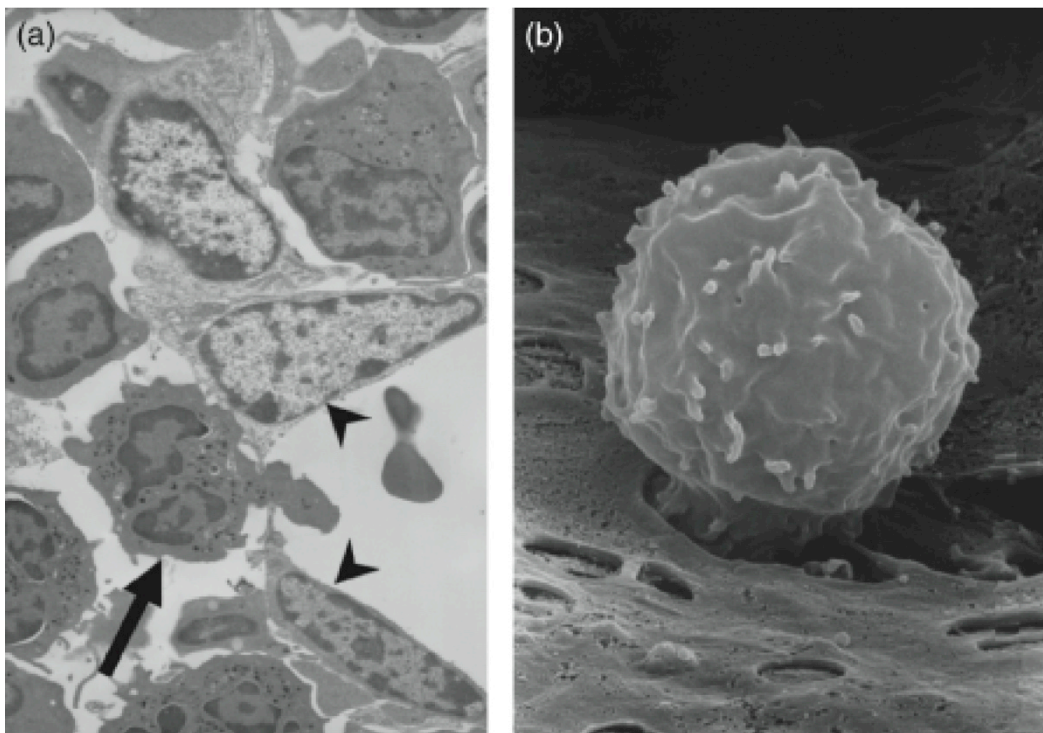


Figure 17. Migration d'un neutrophile au travers de l'endothélium sinusoidal observé au microscope électronique à transmission. La moelle osseuse du fémur d'un rat a été infusée pendant 10 min avec Mip-2. A, grossissement x25000. B, grossissement x 17500. Tiré de Burdon et al., 2008.

1.4. Vie des neutrophiles dans la circulation sanguine

Une fois entrés dans la circulation sanguine, les neutrophiles ont une durée de vie d'environ 4 à 5 jours chez l'Homme ou 18h chez la souris. Ceci a pu être mis en évidence récemment grâce à des expériences de marquage radioactifs *in vivo* (Lahoz-Beneytez et

al., 2016; Pillay et al., 2010). Ils rejoignent le site d'inflammation ou d'infection au niveau duquel ils devront procéder à l'extravasation. Ce processus se passe en trois étapes : 1) le roulement du neutrophile sur l'endothélium, possible grâce aux L-sélectines; 2) l'activation du neutrophile, induit par les cytokines et chimiokines; et enfin 3) l'arrêt/l'adhésion du neutrophile, favorisé par les intégrines (figure 18).

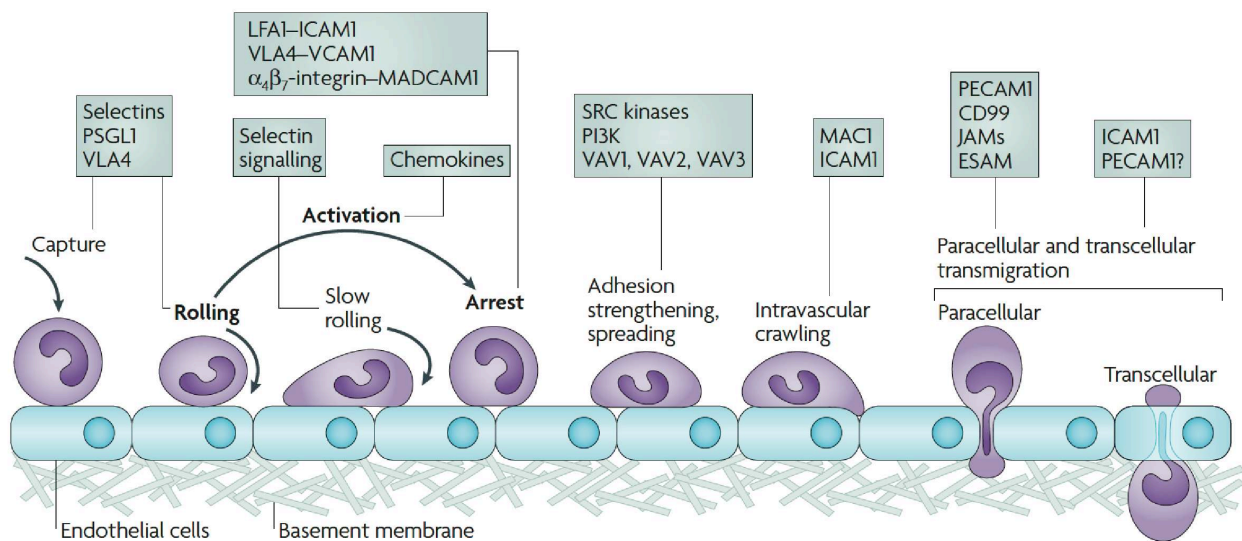


Figure 18. La cascade d'adhésion des leucocytes. Les trois étapes principales sont notées en gras, elles sont médiées par les séllectines et l'activation des cellules induite par les chimiokines, puis l'arrêt induit par les intégrines. Tiré de Ley et al., 2007.

En effet, les neutrophiles expriment différentes séllectines dont CD62L à leur surface. Cette L-séllectine permet d'effectuer un roulement ou "rolling" à la surface de l'endothélium sanguin en reconnaissant les PSGL-1 exprimées. Lorsqu'un site inflammatoire est rencontré, la grande quantité de chimiokines et de cytokines, comme $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ ou encore $\text{IL-1}\beta$ va modifier et activer plusieurs acteurs cellulaires. Premièrement, ceci résulte en l'activation des neutrophiles qui induit un clivage rapide de CD62L réduisant ainsi sa vitesse de roulement. Deuxièmement, l'environnement inflammatoire active les cellules endothéliales qui augmentent en réponse leur niveau d'expression des protéines

d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 à leur surface. En parallèle, ce ralentissement est favorisé par l'augmentation de l'expression de LFA-1 et VLA-4 à la surface du neutrophile qui commence à interagir avec ICAM-1 et VCAM-1 respectivement (Couffinhal et al., 1994). La reconnaissance de ICAM-1 par LFA-1 et de VCAM-1 par VLA-4 induit l'arrêt du neutrophile. Tout en continuant son processus d'activation en vue de son extravasation, le neutrophile commence à augmenter son taux d'exocytose des vésicules sécrétoires (sans production de ROS) résultant en une augmentation des intégrines, notamment Mac-1 (CR3 ou CD11b/CD18) (Borregaard and Cowland, 1997). A son tour Mac-1 commence à interagir avec ICAM-1, et en association avec de nombreuses autres interactions (comme PECAM-1 et CD177, LFA-1 et JAM-A), permet l'extravasation paracellulaire ou transcellulaire à travers l'endothélium puis à travers la couche formée par les péricytes vers le site inflammatoire (Phillipson et al., 2006) (figure 19). De plus l'activation des neutrophiles participe à l'augmentation de leur durée de vie (Dienz et al., 2012; Walmsley et al., 2005). Indépendamment d'un recrutement des neutrophiles au niveau d'un site inflammatoire ou infectieux, il semble que les neutrophiles présents dans les tissus jouent un rôle de surveillance et de défense rapide par la production notamment de peptides antimicrobiens mais aussi de présentation d'antigènes et de maturation des autres cellules immunitaires, notamment dans la rate où ils participent à la maturation des lymphocytes B (Gätjen et al., 2016).

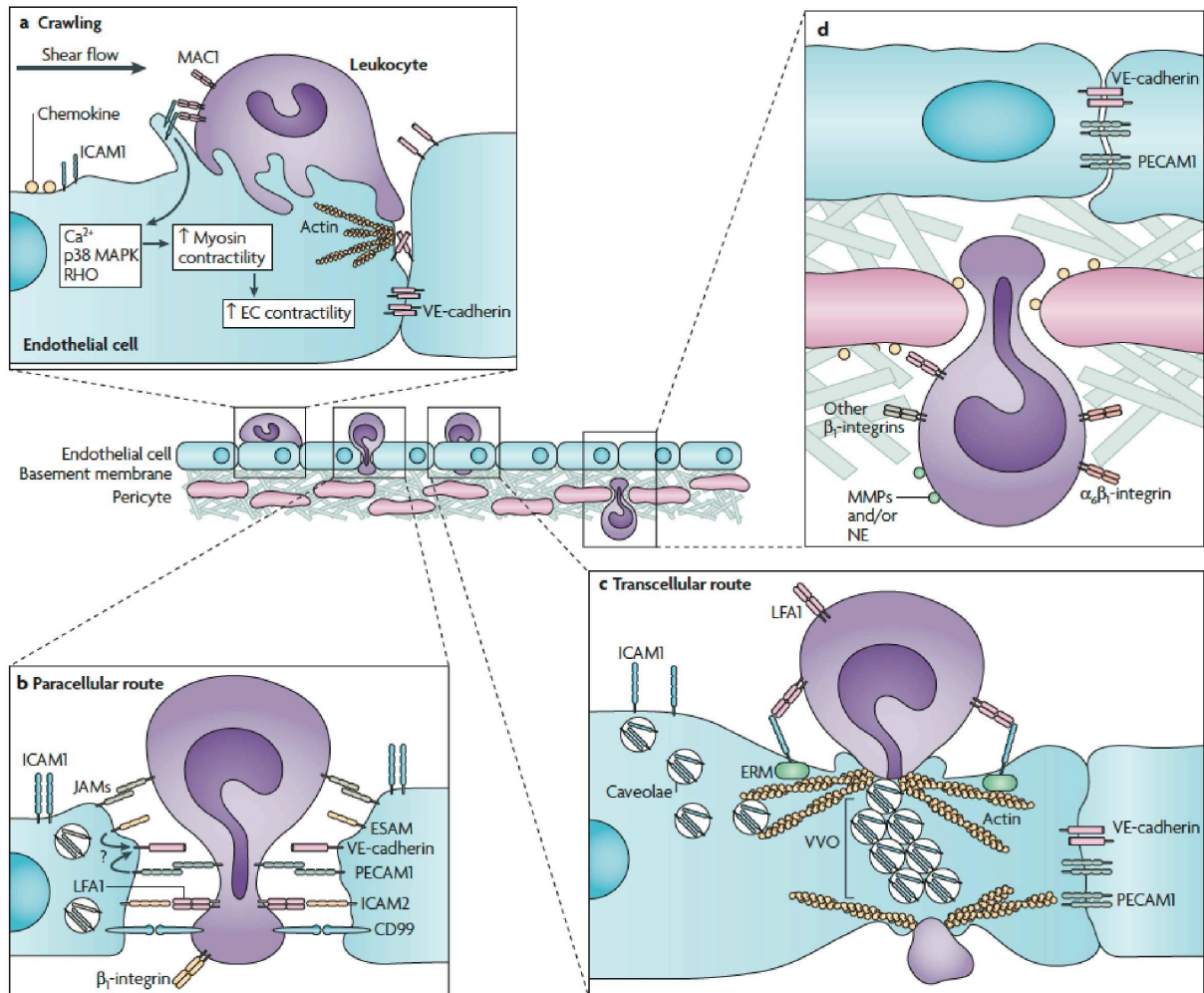


Figure 19. L'étape de transmigration des leucocytes. La migration au travers de la paroi des vaisseaux implique de pénétrer dans la barrière formée par les cellules endothéliales. a. Extension des protrusions des leucocytes dans le corps de la cellule endothéliale pour faciliter le passage dans la jonction intercellulaire. Cette étape est déclenchée par l'interaction de ICAM-1 et Mac-1. b. La migration paracellulaire médiée par PECAM-1 et potentiellement JAM-A. c. Migration transcellulaire apparaît dans les parties fines de l'endothélium. Cette étape est régulée par ICAM-1. d. Migration au travers des espaces entre les péricytes adjacents. Cette étape est facilitée par les Matrix Metalloprotéases (MMPs) et l'élastase. Tiré de Ley et al., 2007.

1.5. Fin de vie et élimination des neutrophiles

Les neutrophiles sont renouvelés de façon journalière afin de patrouiller dans la circulation sanguine ainsi que dans différents organes. On retrouve d'ailleurs la majorité des neutrophiles non pas dans la circulation sanguine mais dans les poumons, la rate et le foie. En effet, à la fin de leur cycle de vie, les neutrophiles vont être phagocytés par les macrophages présents dans le foie, le poumon, la moelle osseuse, ou encore la rate mais uniquement chez l'Homme (Casanova-Acebes et al., 2013; Martin et al., 2003; Saverymuttu et al., 1985; Shi et al., 2001; Szczepura et al., 2011). Les neutrophiles apoptotiques circulants subissent des modifications de la composition du feuillet externe de leur membrane plasmique avec notamment une augmentation de la présence des phosphatidylserines (PS) majoritairement reconnue par les macrophages comme signal de phagocytose. Ainsi, lors du passage de neutrophiles apoptotiques dans le foie ou la rate, les macrophages présents (notamment les cellules de Kupffer dans le foie) vont reconnaître et éliminer ces neutrophiles. Il a été mis en évidence que la déplétion des cellules de Kupffer par traitement au gadonium chloride conduit à la redistribution des neutrophiles pour dégradation dans d'autres organes (poumons et rate principalement)(Shi et al., 2001), soulignant l'importance de l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les cellules de Kupffer et le rôle du foie dans ce mécanisme. La moelle osseuse est le site de production des neutrophiles mais aussi de l'élimination des neutrophiles âgés ou sénescents. Ce retour à la moelle s'opère via un mécanisme dépendant de CXCR4 pour répondre au gradient de CXCL12 dans cet organe (Casanova-Acebes et al., 2013; Martin et al., 2003). En vieillissant, les neutrophiles présentent une modification de l'expression de certains récepteurs de surface (comme CXCR4) ainsi que des molécules d'adhésion (ICAM-1, CD11b) (figure 20). Aussi les neutrophiles de retour à la moelle seront phagocytés par les macrophages médullaires (Furze and Rankin, 2008).

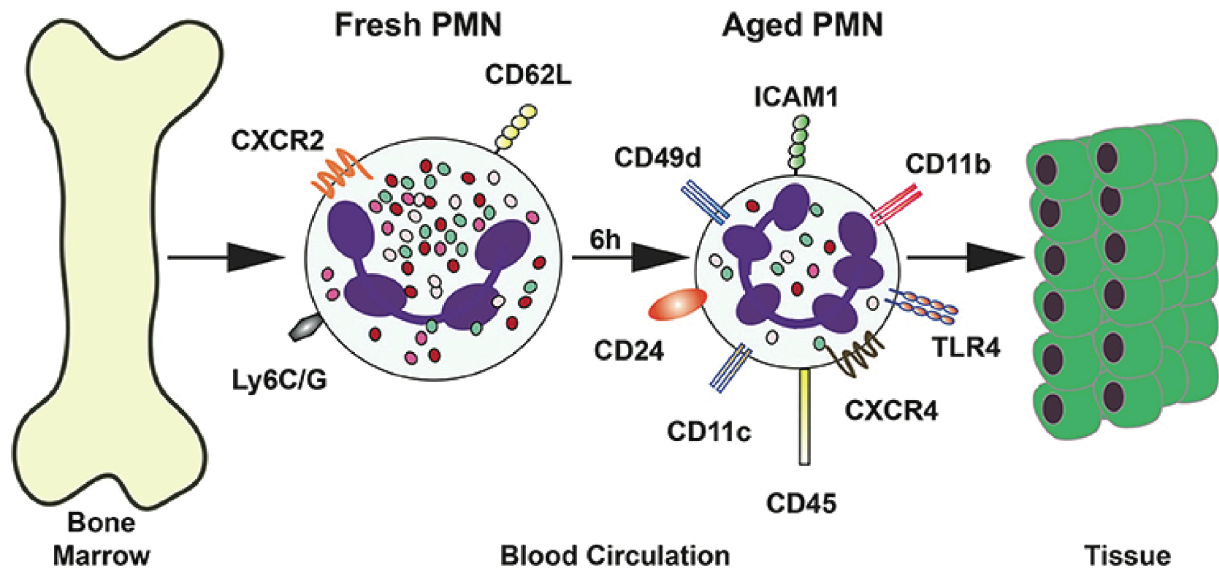


Figure 20. Le phénotype des neutrophiles âgés. A la sortie de la moelle osseuse, un neutrophile jeune exprime CD62L et CXCR4. Après plusieurs heures dans la circulation sanguine (4-6h), l'expression des molécules de surface change. Ce nouveau phénotype décrit comme "phénotype âgé" induit une signature propice à leur élimination de la circulation sanguine en migrant dans les tissus ou en retournant à la moelle osseuse. Tiré de Rosales, 2018.

2. Mode d'action des neutrophiles en réponse à l'inflammation et l'infection

Les neutrophiles sont rapidement libérés depuis la moelle en réponse aux signaux inflammatoires circulants dans la voie sanguine. Une fois arrivés sur le site d'infection/d'inflammation, les neutrophiles procèdent à l'extravasation para et/ou trans-cellulaire comme vu précédemment et se retrouvent dans le tissu ciblé. Ils sont alors pleinement activés (avec activation des enzymes et augmentation du taux de transcription) et disposent de plusieurs mécanismes d'actions pour répondre à l'inflammation, défendre l'hôte contre les pathogènes et participer enfin à la résolution de l'inflammation et à la réparation tissulaire par la sécrétion de cytokines et métalloprotéinases notamment (Nauseef and Borregaard, 2014). En ce qui concerne la défense de l'hôte, on trouve trois mécanismes principaux de réponse : la formation de Neutrophil Extracellular Networks

(NETs) appelé aussi NETose; la phagocytose du pathogène; et la dégranulation associée à une libération des peptides antimicrobiens, de protéases et à la production de ROS (figure 21).

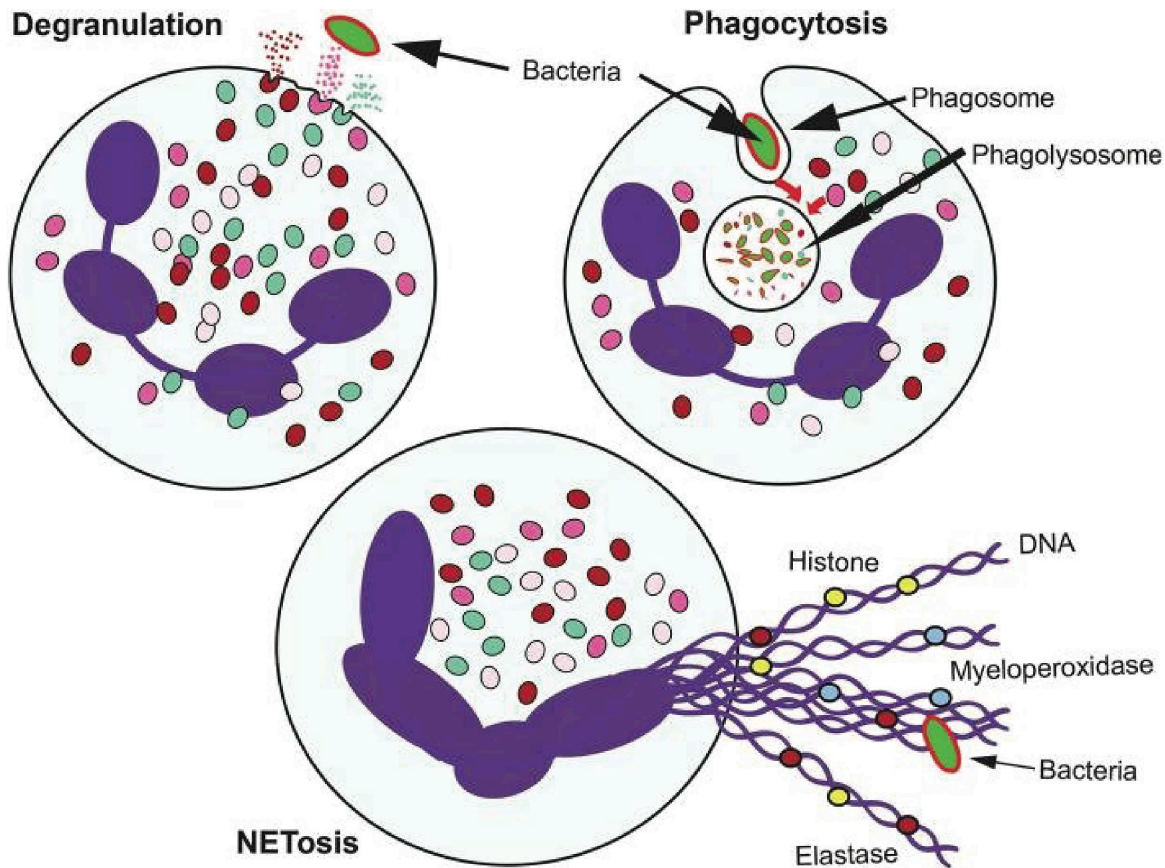


Figure 21. Les mécanismes antimicrobiens des neutrophiles. Lorsqu'un neutrophile reconnaît un organisme pathogène, il déploie différentes fonctions pour le détruire. La phagocytose comprend l'ingestion du pathogène dans une vacuole de phagocytose qui, après maturation, devient un pagolysosome. Les enzymes de dégradation et le burst oxydatif contribuent à sa destruction. Les neutrophiles peuvent aussi relarguer leurs granules dans l'environnement extérieur ou former des pièges extracellulaires (NETs) en libérant leur ADN associé à des protéines issues des granules. Tiré de Rosales, 2018.

2.1. La NETose

Identifiés en 2004 (Brinkmann et al., 2004), les NETs sont un moyen de défense du neutrophile permettant de former un réseau dense composé de matériel intracellulaire et d'ADN afin d'immobiliser un pathogène pour éviter sa dissémination, tout en concentrant les substances antibactériennes actives libérées permettant une synergie dans une zone

délimitée. Ce processus est considéré comme une forme de mort programmé du neutrophile. Générés en réponse à de nombreux stimuli comme le $TNF\alpha$, l'IL-8 ou encore le PMA, les NETs sont formés d'ADN et d'histones, pour la partie nucléaire; et des trois types de granules (primaires, secondaires et tertiaires) contenant notamment la MPO, les peptides antimicrobiens ou encore l'elastase. Il semble que la production des NETs soit dépendante de la NOX2 et de la présence de ROS, en particulier le H2O2 (Brinkmann and Zychlinsky, 2007; Fuchs et al., 2007). Les neutrophiles en NETose se distinguent cependant d'une cellule en apoptose de par l'absence de présentation de signaux "mangez-moi" permettant au réseau de NETs formé de ne pas être détruit par les autres phagocytes. La modification des histones et les nucléases présentes permettront par la suite le désassemblage des NETs (Wang et al., 2009).

2.2. La phagocytose

S'il a été abondamment étudié pour la formation de NETs dans la dernière décennie, le neutrophile reste avant tout un phagocyte ayant pour fonction principale la destruction intracellulaire des pathogènes. La reconnaissance du pathogène est permise par la reconnaissance des PAMPs via les PRR, tels que les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs Lectin de type C présents à la surface des neutrophiles. Tout comme les macrophages, les neutrophiles sont capables de phagocyter des particules et des pathogènes, qu'ils soient opsonisés ou non. Cependant, l'opsonisation facilite grandement la phagocytose. Les opsonines, comme les IgG et les protéines du complément C3b et C3bi, recouvrent le pathogène afin de faciliter sa reconnaissance et son ingestion par le neutrophile (Fleit et al., 1982; Graham et al., 2012; Witko-Sarsat et al., 2000). A la surface du neutrophile humain, les principaux récepteurs pour les opsonines sont le Fc γ RIIA (CD32) et Fc γ RIIIb (CD16) en condition de repos. D'autres récepteurs Fc peuvent être

augmentés spécifiquement par certains stimuli, comme le récepteur FcγRI (CD64) qui est augmenté en réponse à l'interféron notamment (voir d'avantage dans (McKenzie and Schreiber, 1998). D'autres récepteurs reconnaissent quant à eux les protéines du complément C3b et C3bi. C'est le cas notamment des B2 intégrines activées, tel que le CR1 (CD35), le CR3 (aussi appelé MAC-1 ou CD11b/CD18). Il a été montré qu'en plus de favoriser la reconnaissance, la liaison des opsonines à leurs récepteurs contribue au remodelage du cytosquelette pour induire la formation de pseudopodes autour du pathogène (Suzuki et al., 2006). Après l'ingestion du pathogène, la phagocytose se conclut par l'élimination du pathogène qui repose sur l'alliance de deux mécanismes majeurs : la dégranulation et la production de ROS.

2.3. La dégranulation et réponse oxydative

La dégranulation

Une fois phagocytée, la vacuole de phagocytose contenant le pathogène subit une rapide modification biochimique la transformant en une puissante organelle antimicrobienne, lors de la maturation phagosomale. C'est notamment la dégranulation qui contribue à la fonction bactéricide du neutrophile. Quatre types de granules sont décrits selon leur morphologie en microscopie électronique (figure 22) et leur contenu (figure 23) :

- les granules primaires ou azurophiliques : organites à la forme allongée dense en microscopie électronique. Ils sont très abondants et constituent 1/3 des granules présents. Ils contiennent des α-défensines, l'élastase, des protéinases et serine-protéases, le lysozyme et surtout la myéloperoxidase (MPO)
- les granules secondaires ou spécifiques : organites à la forme sphérique ou bâtonnet peu denses en microscopie électronique. Ils contiennent les cathélicidines (LL-37), la lactoferrine, le lysozyme, la metalloprotéinase 8, la NGAL (Neutrophil

Gelatinase-associated Lipocalin) ainsi que le CR3, le CD66, le flavocytochrome b558 de la NADPH, le récepteur au TNF et le récepteur au fMLF.

- les granules tertiaires : organites de forme et de densité hétérogène. Ils contiennent un grand nombre d'enzymes notamment les metalloproteinase 9, l'arginase 1, le lysozyme mais aussi des récepteurs comme le CR3, NRAMP-1, le récepteur au fMLF, le flavocytochrome b 558 de la NADPH oxydase.
- les vésicules sécrétoires : vésicules d'origine endocytaire (Fauschou and Borregaard, 2003) contenant un grand nombre de récepteurs de surface notamment le CR1, le CR3 (Mac-1), le CD16, le CD45, le récepteur au fMLF, le flavocytochrome b 558 de la NADPH oxydase.

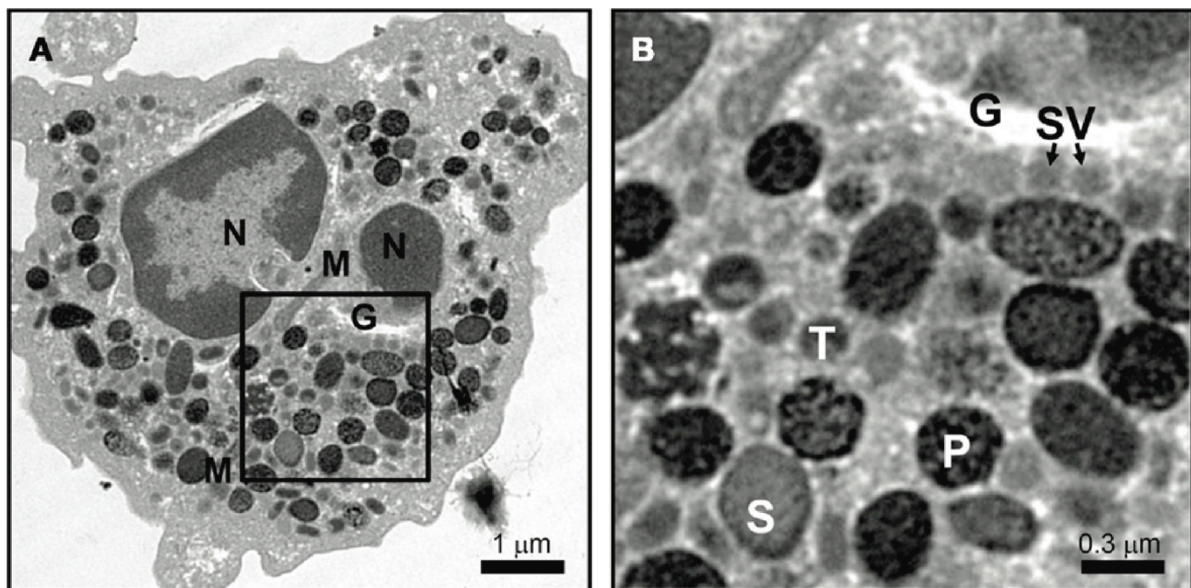


Figure 22. Morphologie du neutrophile observé au microscope électronique. Les neutrophiles sont isolés du sang périphérique humain pour analyse par microscopie électronique. Le cytosol est rempli de vésicules, dont les granules primaires de couleur foncée (P), les granules secondaires (S) et les granules tertiaires (T). Les vésicules sécrétoires (SV) se situent proches de l'appareil de Golgi (G). On peut aussi observer plusieurs mitochondries (M). A, grossissement 9100. B, grossissement 27600. Tiré de Sheshachalam et al., 2014.

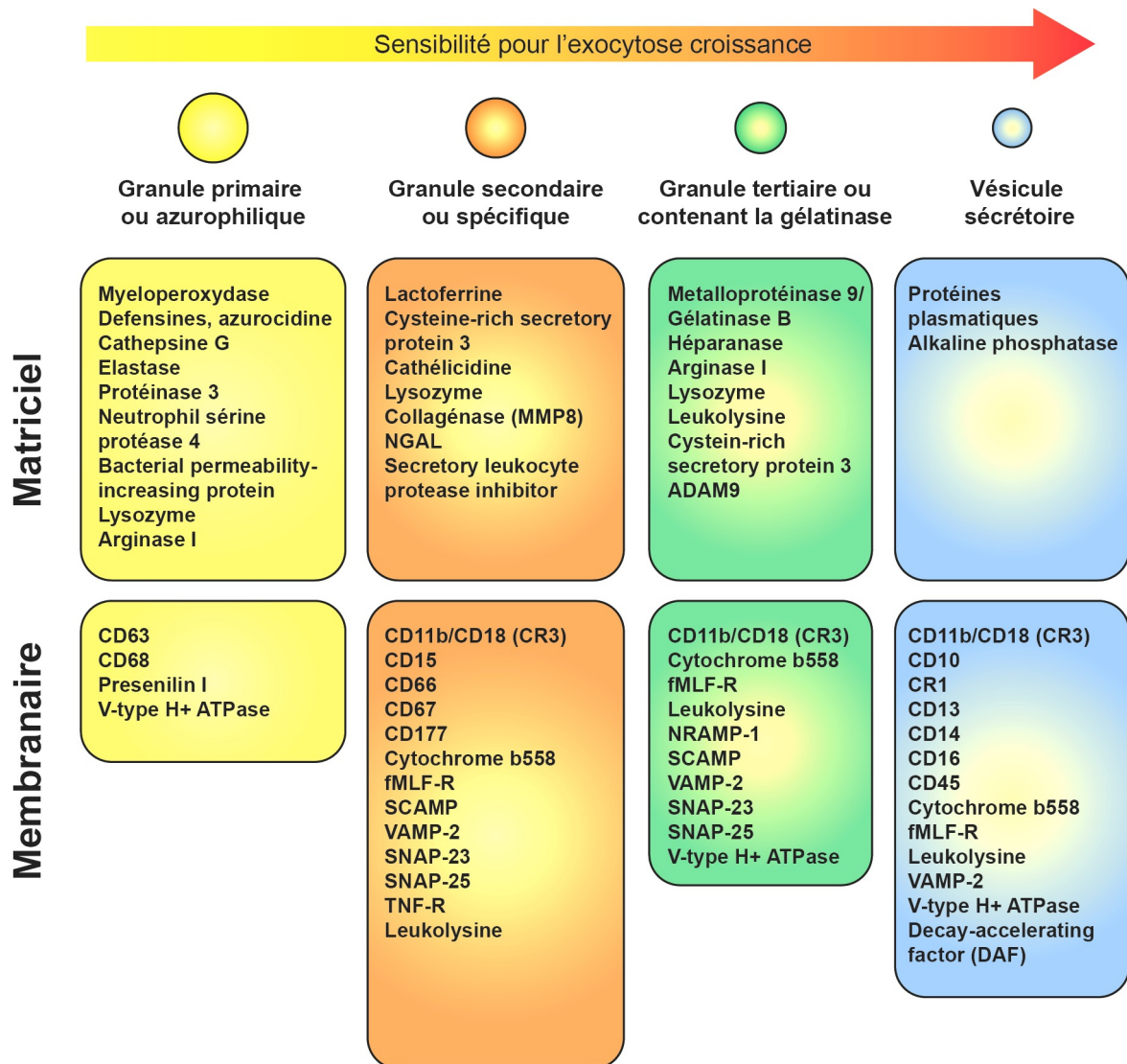


Figure 23. Composition des granules de neutrophiles. Les neutrophiles sont équipés d'un grand nombre de granules, leur conférant le nom de granulocytes. Ces granules peuvent être répartis en trois principaux sous-groupes : primaires, secondaires, et tertiaires qui sont générés durant les stades promyélocytophagocytaires, myélocytophagocytaires et métamyélocytophagocytaires respectivement. Les neutrophiles contiennent aussi des vésicules sécrétoires qui permettent, lorsqu'elles sont exocytées, d'induire une rapide augmentation des molécules d'adhésion à leur membrane facilitant l'adhérence sur les cellules endothéliales lors de l'extravasation. La sensibilité à l'exocytose de chaque granule est inversement corrélée avec son stade de production: les plus précoces dégranulent moins facilement que les plus tardifs. Tiré de Vols et al., 2017.

Avant même que le phagosome soit complètement fermé, les premiers granules azurophiliques et spécifiques commencent à être libérés au niveau de la zone d'ingestion. Les granules sont dirigés par les microtubules vers le centre d'organisation des microtubules (MTOC) qui se relocalise proche de la zone d'ingestion au début de la phagocytose (Tapper et al., 2002). Les granules azurophiliques contiennent un grand nombre d'enzymes lytiques et de peptides antimicrobiens cationiques, connus pour former

des pores dans les membranes des bactéries (Ganz et al., 1985). L'exocytose des granules est dépendante des variations de calcium intracellulaire, et c'est l'amplitude du signal qui induira la libération d'un type de granule plutôt qu'un autre. En effet, la libération des granules azurophiliques requiert un signal calcique de plus forte amplitude que celui nécessaire pour la libération des granules secondaires (Nüsse et al., 1998) en régulant l'interaction des granules avec la membrane plasmique via le système SNAP/SNARE. La libération des granules spécifiques et gelatinase semble assez concomitante, nécessitant un signal calcique similaire. Ce sera donc la localisation des différents sous-types de granules qui permettra leur arrivée plus ou moins rapide au phagosome. Si la fusion des granules permet la libération de substances bactéricides, elle permet aussi l'arrivée de la NADPH oxydase ainsi que de la MPO pour générer des ROS (figure 24) en réponse à des agents microbiens naturels (fMLF, Zymosan...) ou de synthèse (comme l'esther de phorbol Phorbol 12-myristate 13 acetate ou PMA qui est un activateur pharmacologique de la Protéine Kinase C). A la différence du macrophage bien connu pour acidifier sa vacuole, le pH du phagolysosome du neutrophile reste assez neutre et c'est le burst oxydatif qui est majoritairement employé pour la destruction du pathogène.

Le priming de la NADPH oxydase

La phagocytose du pathogène déclenche l'activation du programme bactéricide du neutrophile et notamment la production des différents ROS : $O_2^{\cdot-}$; H_2O_2 ; OH° ; $HOCl$. La NADPH oxydase (NOX2) est une macro-protéine de la famille des NOX qui est composée de six protéines. Le flavocytochrome b558 qui contient un hème de fer au niveau du site catalytique est composé des sous-unités transmembranaires gp91phox et p22phox, associé à 4 autres sous-unités cytosoliques p47phox, p40phox, p67phox et Rac2. Afin de répondre de façon optimale aux stimuli, la NADPH oxydase nécessite une préparation aussi appelée priming. Cette étape de priming est provoquée par de nombreux agents :

des agents inflammatoires tels que le PAF ou le C5a; des cytokines inflammatoires tels que le TNF α et l'IL-8; ou des agonistes des TLRs comme le LPS. Le priming va permettre le réarrangement des sous-unités de la NADPH oxydase ainsi que certaines phosphorylations et modifications structurales. Dans le cytoplasme, les sous-unités p47phox, p67phox et p40phox sont associées en trimères impliquant des domaines de liaisons de type PB1, SH3 (Park et al., 1994). Au repos, la sous-unité p47phox est dans une conformation masquant deux de ses domaines SH3, essentiels à l'interaction avec la sous-unité membranaire p22phox de la NADPH oxydase (Groemping et al., 2003). Les agents de priming permettent aussi d'induire une dégranulation modérée afin d'augmenter la quantité de flavocytochrome b558 (les sous-unités membranaires de la NADPH oxydase) à la membrane (DeLeo et al., 1998; Sheppard et al., 2005). Plusieurs sites de phosphorylations de la p47phox semblent importants pour le priming de la NADPH oxydase. En effet, il a été montré que la phosphorylation de la Serine 345 de p47phox soit par ERK soit par p38MAPK (activée par le GM-CSF ou le TNF α respectivement) est essentielle pour la production de ROS dans les neutrophiles humains (Dang et al., 2006). Notamment, la phosphorylation de cette Serine 345 permet sa reconnaissance par la proline isomérase Pin1 dans le but de démasquer ses deux régions SH3 de liaison à p22phox, et de faciliter les phosphorylations par la PKC sur les résidus voisins et préparer la NADPH à son activation future (Boussetta et al., 2010). En parallèle, l'activation du TLR8 induit aussi des phosphorylations de la p47phox sur le Serine 345 mais aussi sur les Serines 328 et 315 (Makni-Maalej et al., 2015). Il semble que la p47phox ne soit pas la seule sous-unité à être phosphorylée lors du priming, la sous-unité p67phox est elle aussi phosphorylée (sur des sites encore non identifiés) en réponse au TNF α notamment mais de façon moindre que la p47phox (Brown et al., 2004). Il a été montré que les phosphorylations de la p47phox favorisent l'interaction directe de la p67phox via un démasquage de son domaine N-terminal de liaison avec la gp91phox. De plus, il semble que les phosphorylations de la sous-unité p40phox soient quant à elle impliquées dans le changement de conformation de

la p67phox afin de permettre son interaction complète avec le cytochrome b558 (Dang et al., 2002).

Des changements de conformation du cytochrome b558 après stimulation au PMA ont aussi été décrits (Campion et al., 2007).

Outre les modifications au niveau de la NADPH, les agents de priming permettent aussi de faciliter l'activation de la production de ROS en augmentant la présence de récepteurs comme le CR3 à la surface du neutrophile (McLeish et al., 2017).

Le burst oxydatif

Une fois le neutrophile préparé et activé, le burst oxydatif peut alors s'entamer. La NADPH oxydase réduit 2 O₂ en 2 O₂^{•-}, les anions superoxydes qui pourront à leur tour générer du peroxyde d'hydrogène, H₂O₂, réaction spontanée en présence de protons. La présence d'ions métalliques divalents comme le fer ou le cuivre, peut engendrer une réaction de Fenton ou de Haber Weiss favorisant la formation de OH[•] (radical hydroxyl). La MPO délivrée principalement par l'exocytose des granules azurophiliques peut alors catalyser la réaction de formation du HOCl grâce à l'utilisation de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorure Cl⁻. C'est une enzyme contenant un hème de fer, dérivé de la protoporphyrine IX, fonctionnant en homodimère symétrique, composé de deux hémi-enzymes, possédant chacune deux sous-unités (légère de 15 kDa et lourde d'environ 60 kDa) (Nauseef et al., 2000) le poids moléculaire global peut varier en fonction des glycosylations. La présence de la Nitric Oxide Synthase (NOS) peut induire la formation de peroxynitrite (ONOO⁻) par apport de monoxyde d'azote; ou en combinaison avec la MPO catalyser la formation de dérivés hypothiocyanites (HOSCN). De plus, la formation de chloramines (R-NH-Cl) peut oxyder les antiprotéases, augmentant ainsi l'activité des protéases libérées par exocytose des granules. Tous ces composés sont extrêmement réactifs leur conférant des propriétés hautement bactéricides afin de détruire le pathogène.

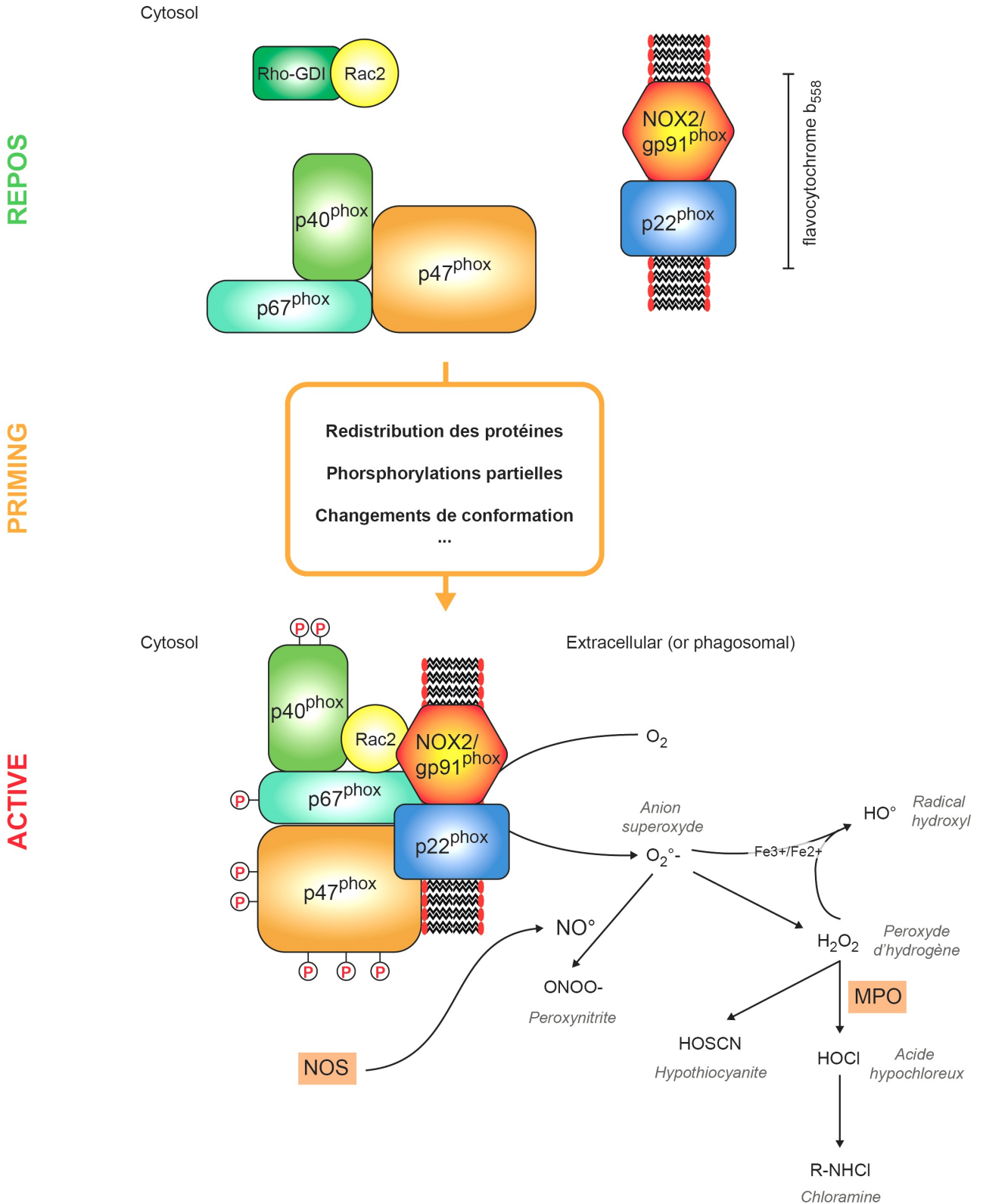


Figure 24. La NADPH oxydase dans un neutrophile au repos, primé ou activé et la production de réactifs oxydants potentiels consécutifs. Au repos, la NADPH oxydase est désassemblée et ses composants sont séparés spatialement. Le priming de la NADPH oxydase induit la translocation des composants cytosoliques, des phosphorylations partielles de la sous-unité p47^{phox} et des modifications conformationnelles la préparant à répondre à une stimulation. Dans son état activé, la NADPH oxydase s'assemble rapidement pour permettre la formation des réactifs oxydants. La production des réactifs oxydants peut-être complétée et modulée par la Nitric Oxyde Synthase (NOS) et la MyeloPerOxydase (MPO) aboutissant à un très large panels de réactifs puissants pour détruire le pathogène, notamment les formes réactives de l'oxygène ROS et de l'azote RNS. Adapté de El-Benna et al., 2016 et Hampton et al., 1998.

Première partie : projet principal – Etude du rôle de l'axe hepcidine-fer sur la fonction des neutrophiles dans l'hémochromatose héréditaire

"Que de fois, au lieu de muser avec des garçons de mon âge, je m'étais plu à épousseter ces graphites, ces anthracites, ces houilles, ces lignites, ces tourbes! Et les bitumes, les résines, les sels organiques qu'il fallait préserver du moindre atome de poussière! Et ces métaux, depuis le fer jusqu'à l'or, dont la valeur relative disparaissait devant l'égalité absolue des spécimens scientifiques!"

Jules Verne - Voyage au centre de la Terre

1. Contexte de l'étude

Le fer est essentiel pour la grande majorité des organismes vivants en catalysant des processus biologiques cruciaux pour la vie : le transport et le stockage de l'oxygène, la synthèse d'ATP ou la réplication de l'ADN.

Plus spécifiquement, au niveau du neutrophile, le fer participe à la défense de l'hôte en favorisant la production de ROS. Cependant, les carences ou les excès en fer ont été associés à des défauts de la fonction des neutrophiles mais rien n'est connu à ce jour quant à la régulation de l'homéostasie du fer du neutrophile par l'hepcidine. C'est dans ce but que cette étude s'inscrit : évaluer le rôle de l'hepcidine sur l'homéostasie du fer du neutrophile dans deux contextes de surcharge en fer avec ou sans expression d'hepcidine. Ceci devrait nous permettre de comprendre l'impact de la surcharge en fer sur la fonction des neutrophiles et confirmer ou infirmer la régulation de l'homéostasie du fer du neutrophile par l'hepcidine dans l'hémochromatose héréditaire.

2. L'hémochromatose héréditaire

2.1. Généralités

L'hémochromatose héréditaire est le désordre génétique le plus fréquent en Occident, touchant environ 2 200 000 personnes en Europe et 2 000 000 aux États-Unis. En France, entre 1 personne sur 200 et 1 personne sur 2000 est porteuse de la principale mutation génétique prédisposant au développement de cette maladie. Sa pénétrance varie suivant les zones géographiques (source INSERM Olivier Loral, consultable ici : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/hemochromatose-genetique>).

L'apparition du terme d'haemochromatose, devenu depuis hémochromatose, remonte à 1899 lors d'une caractérisation du dépôt de pigments contenant du fer dans certaines cellules, notamment du foie dans un diabète "bronzé" (Opie, 1899). S'ensuit au XXe siècle, une multitude d'études, principalement cliniques, sur cette pathologie et ce n'est qu'en 1996 que survient l'identification du gène responsable de la majorité des cas de développement de cette maladie : le régulateur HFE (pour High Fer). A cette période, ce gène est décrit comme codant pour une Molécule d'Histocompatibilité de classe I de part ses fortes similitudes avec le HLA-A2. Deux variants génétiques sont identifiées chez les patients : l'un présente une substitution de la Cystéine 282 en Tyrosine chez 85% des patients (C282Y), et le second une substitution de l'Histidine 63 en Acide Aspartique (H63D). La substitution C282Y, retrouvée majoritairement à l'état homozygote, conduisant à une suppression d'un pont disulfure dans la protéine potentiellement impliquée dans le transport de la protéine du Réticulum Endoplasmique à la membrane plasmique. La seconde substitution H63D est beaucoup moins fréquente et majoritairement présente à l'état hétérozygote en association avec la mutation à l'état hétérozygote de C282Y. (C282Y/H63D)(Feder et al., 1996). Il est important de relever le caractère récessif de cette pathologie qui ne se développe qu'en condition homozygote C282Y ou hétérozygote dit "composite" C282Y/H63D. Ainsi le variant H63D ne comporte pas de caractère pathologique car il ne conduit pas vers le développement d'une hémochromatose lorsqu'il est présent à l'état homozygote. Les patients dits "composite" sont habituellement saignés car ils présentent une augmentation de la saturation de la transferrine. Toutefois, le développement de la pathologie dans ce contexte reste à ce jour controversé car il ne semble pas que ces patients présentent une surcharge viscérale significative. A cette même époque apparaissent les premières études évaluant le risque d'hépatocarcinome chez les patients hémochromatosiques (Willis et al., 1997) ainsi que les premiers questionnements quant à l'utilisation du sang de patients hémochromatosiques surchargés en fer dans un but de transfusion sanguine (Fields and Grindon, 1999). En 2001,

l'identification de l'hepcidine comme régulateur du fer permet un bond en avant dans le domaine de l'hémochromatose et de l'homéostasie du fer (Nicolas et al., 2002, 2001; Pigeon et al., 2001), et les premières identifications de mutants de l'hepcidine, de l'hémojuvéline (HJV) alors identifiée sous le nom de HFE2, et du récepteur 2 à la transferrine (TfR2) identifié comme HFE3, apparaissent chez des patients hémochromatosiques. On observe notamment à cette époque la première identification de gènes mutés dans l'hémochromatose juvénile, depuis sa caractérisation en 1978 (Lamon et al., 1979; Roetto et al., 2003, 1999). Toutes ces mutations retrouvées chez les patients hémochromatosiques convergent vers la même protéine : l'hepcidine.

En effet ce sont des régulateurs de l'expression de l'hepcidine participants à la détection des quantités de fer du corps (figure 25).

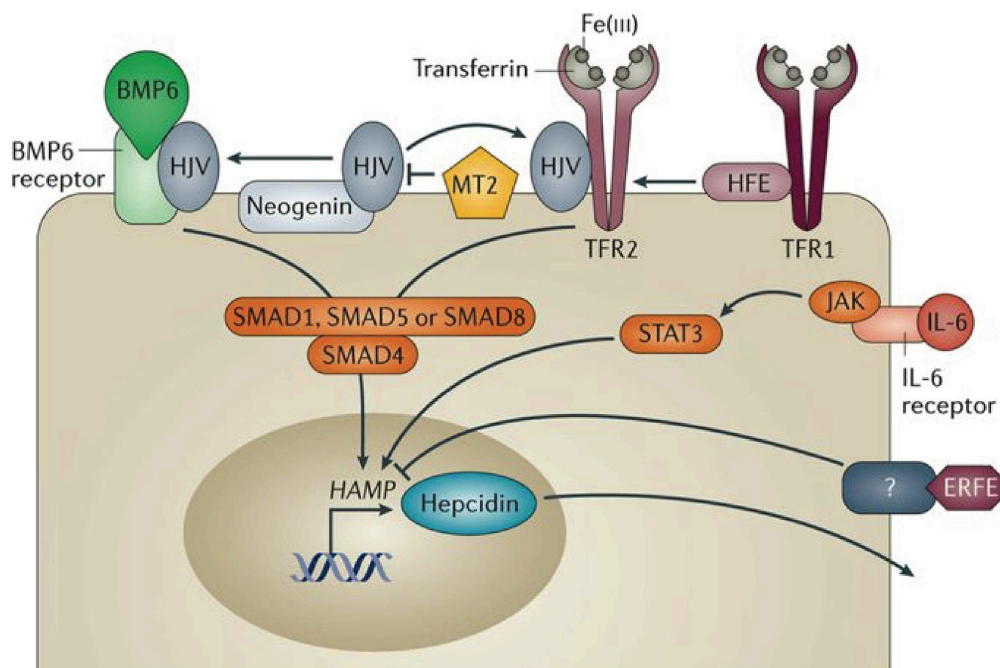


Figure 25. La régulation de la production d'hepcidine par les hépatocytes. BMP6 est produite par les cellules non parenchymateuses du foie en réponse au fer stocké. La liaison de BMP6 sur son récepteur, alors complexé avec HJV induit l'activation des SMAD1/5/8 et de SMAD4 qui stimulent la transcription de l'hepcidine. HJV est stabilisé par la Néogénine et clivé par la matriptase 2 (MT-2) permettant une régulation fine de la voie de signalisation de BMP6. La voie d'activation des SMADs est aussi régulée par TfR2 en association avec HFE et HJV. HFE interagit avec TfR1 entrant en compétition avec l'holo-Tf. En conséquence, lorsque l'apport en fer est élevé, HFE est déplacé de TfR1 permettant son association avec TfR2, ce qui résulte en l'activation de la voie SMAD et l'induction de la transcription et de l'expression de l'hepcidine. En conditions inflammatoires, l'IL-6 se lie à son récepteur induisant l'activation des JAK1 et 2 et consécutivement de STAT3. Cette activation résulte en l'augmentation de l'expression de l'hepcidine. Enfin, lors d'une production érythroïde accrue, le besoin en fer pour l'érythropoïèse conduit ces cellules à exprimer l'érythroferrone (ERFE) qui inhibe l'expression de l'hepcidine par un mécanisme encore mal compris à ce jour. Tiré de Crielaard et al., 2017.

Ces nouvelles identifications de gènes mutés dans l'hémochromatose héréditaire (ou génétique) ont permis de définir des sous-catégories de ces surcharges en fer primitives : l'hémochromatose classique qui est la plus fréquente, dans laquelle on retrouve les différentes mutations de HFE pré-citées; l'hémochromatose juvénile, plus rare, dans laquelle on retrouve les mutations de HJV ou de l'hepcidine (HAMP); l'hémochromatose par mutation TfR2, assez rare elle aussi. Les mutations qui affectent ces différents types d'hémochromatose sont récessives et nécessitent donc de porter la ou les mutations à l'état hétérozygote pour développer la pathologie de façon sévère. On distingue les hémochromatoses à mutation dominante telle que la maladie de la ferroportine.

2.2. Développement de la maladie

Dans les cas classiques qui nous intéressent pour cette étude, les variants pathogéniques de HFE induisent un niveau d'hepcidine « anormalement normal ». En effet, tous les patients compris dans cette étude présentent une hémochromatose héréditaire HFE C282Y homozygote ou "composite" C282Y/H63D. Ceci a pour conséquence une expression d'hepcidine basale qui n'augmente pas en réponse à la surcharge martiale pour réduire l'absorption et le recyclage du fer. S'ensuit une absorption incontrôlée du fer qui s'accumule progressivement au cours de la vie de l'individu si aucune prise en charge n'est effectuée. Naturellement la surcharge en fer augmente graduellement au cours de la vie de l'individu et les premiers symptômes apparaissent autour de 35 ans chez les hommes et 45 ans chez les femmes (élimination du fer lors des menstruations). Le dépistage de la maladie sur la base de ses symptômes consiste en une évaluation du coefficient de saturation de la Transferrine (qui ne doit pas être supérieur à 50% en conditions physiologiques). L'examen peut s'accompagner parfois d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) afin d'évaluer la surcharge en fer hépatique.

Depuis l'identification des mutations impliquées dans ces pathologies, des tests de dépistage génétique sont possibles afin de prévenir au plus tôt l'accumulation de fer chez un patient à risque. Par exemple, une personne ayant un ou plusieurs membres de sa famille atteints d'hémochromatose bénéficiera de ces tests génétiques, notamment en Occident où la maladie est la plus fréquente (source Orphanet par Professeurs Pierre Brissot et Jacques Rochette, consultable ici : <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/hemochromatose-FRfrPub92.pdf>).

2.3. Symptômes

L'évolution de la maladie se décompose cliniquement en 5 stades, listés dans le tableau 1.

Stade 0	Hémochromatose asymptomatique Absence de toute expression phénotypique (CS-Tf < 45 % et ferritinémie normale)
Stade 1	Augmentation du CS-Tf (> 45 %) sans élévation de la ferritinémie
Stade 2	Augmentation du CS-Tf > 45 % et du taux de ferritinémie sans expression clinique ou biologique d'atteinte viscérale ou métabolique
Stade 3	Augmentation du CS-Tf > 45 % et du taux de ferritinémie avec expression clinique pouvant compromettre la qualité de vie (asthénie, impuissance, arthropathie, diabète, hépatopathie non cirrhotique, troubles du rythme cardiaque, mélanodermie)
Stade 4	Augmentation du CS-Tf > 45 % et du taux de ferritinémie avec expression clinique pouvant compromettre le pronostic vital (cirrhose, carcinome hépatocellulaire, diabète requérant de l'insuline, insuffisance cardiaque)

Tableau 1. Les paramètres biologiques et cliniques de l'hémochromatose de type 1 pour la classification de la maladie. CS-Tf : coefficient de saturation de la transferrine. Source : hémochromatose.org, consulté le 5 décembre 2019, document validé par le Collège de la Haute Autorité de Santé en mars 2011.

Les manifestations cliniques de l'hémochromatose héréditaire sont diverses allant des arthropathies à l'hépatocarcinome. Les atteintes aux organes sont diverses allant d'atteintes fonctionnelles hépatiques (fréquence de 16% au diagnostic tous sexes confondus), de diabète (7%), d'asthénie et d'adynamie, de mélanodermie, d'impuissance pour les hommes, d'arthralgie ou encore d'anomalies de l'électrocardiogramme (source Société Française d'Endocrinologie)(Deugnier et al., 2019).

En effet, le premier organe à se charger de fer est le foie, dont le volume augmente, avec détérioration de la fonction hépatique et potentielles douleurs abdominales. Cela peut évoluer vers la cirrhose qui favorise l'apparition de l'hépatocarcinome. Le cœur peut être aussi touché par la surcharge en fer et présenter des signes d'insuffisance et d'une mauvaise oxygénation pouvant conduire à de l'arythmie et des palpitations. Le pancréas se charge lui aussi en fer entraînant des problèmes de sécrétion d'insuline pouvant évoluer vers un diabète sans marqueurs d'auto-immunité, avec atteintes des yeux, des reins et du système cardiaque.

2.4. Prise en charge

La principale méthode de prise en charge est la phlébotomie avec prélèvement sanguin dont la fréquence peut varier en fonction de la surcharge du patient. Cette méthode est actuellement suffisamment efficace pour diminuer les niveaux de fer (en retirant les globules rouges) et stimuler l'érythropoïèse afin d'utiliser le fer restant. Cette méthode entraîne des effets à court terme de fatigue et d'hypotension. Récemment, des agonistes de l'hepcidine sont apparus, agissant en mimétique de l'hepcidine comme le PTG-300 (Protagonist Therapeutics), la mini-hepcidine conçue par Tomas Ganz (UCLA) ou le LJPC-401 (La Jolla Pharmaceutical); stimulant la production d'hepcidine comme le Tmprss6-ASO (Ionis Pharmaceuticals); ou encore inhibant l'export du fer par la ferroportine comme le VIT-2763 (Vifor Pharma) (voir d'avantage dans cette revue (Casu et al., 2018). Cependant, s'il

paraît tentant d'utiliser ce type de molécules dans l'hémochromatose héréditaire, nous verrons dans cette étude que certaines précautions sont à prendre en compte quant aux effets indésirables potentiels sur la fonction immunitaire notamment.

3. Les hémochromatoses secondaires

Il existe d'autres hémochromatoses qui ne sont pas dues à un défaut de régulation de l'hépcidine. Ce sont des surcharges en fer secondaires ou hémochromatoses secondaires qui peuvent être héréditaires ou non. On retrouve des hémoglobinopathies telles que la thalassémie et la drépanocytose, les anémies sidéroblastiques ou hémolytiques et la myélodysplasie.

Les hémoglobinopathies :

Dans ces pathologies, les mutations affectant un ou plusieurs gènes impliqués dans la formation de l'hémoglobine entraînent une érythropoïèse inefficace. Ce phénomène est accentué par le manque d'oxygénation, qui augmente encore la synthèse de globules rouges en sécrétant de l'EPO et de l'ERFE. ERFE est connu pour induire une répression de l'hépcidine par des mécanismes encore non élucidés impliquant notamment les BMPs (Arezes et al., 2018). Cette répression de l'hépcidine consécutive à une érythropoïèse inefficace induit une absorption du fer accrue conduisant à l'hémochromatose. Ce sont des hémochromatoses secondaires héréditaires.

Les anémies sidéroblastiques

Elles constituent un groupe hétérogène d'anomalies de la moelle osseuse rares pouvant être héréditaires ou acquises. Elles se caractérisent par un défaut d'utilisation du fer lors de la synthèse de l'hémoglobine en condition de suffisance en fer. Ce fer s'accumule dans les

mitochondries des érythroblastes médullaires (= sidéroblastes) formant une couronne caractéristique, visible après coloration de Perls.

Les anémies hémolytiques

Elles se caractérisent par une destruction prématurée du globule rouge (hémolyse). Le problème à l'origine de la destruction du globule rouge peut être intrinsèque au globule rouge, souvent héréditaire avec présence d'anomalies de la membrane plasmique du globule rouge (sphérocytose) ou des troubles métaboliques du globule rouge, ou extrinsèque, majoritairement acquis avec des anomalies immunologiques, hyperactivité réticuloendothéliale. La compensation par l'augmentation de la production de nouveaux globules rouges n'est bien souvent pas efficace entraînant l'anémie chez le patient atteint.

Les myélodysplasies :

Ces pathologies sont pour la plupart acquises et présente une dysfonction des cellules progénitrices entraînant un manque de production de globules rouges, globules blancs, plaquettes.

Tout ces cas conduisent à une augmentation de l'absorption du fer pour tenter de soutenir une érythropoïèse malheureusement inefficace. De plus, ces patients nécessitent un apport exogène fréquent en globules rouges et sont donc régulièrement transfusés, accroissant de nouveau les quantités de fer du corps. Ces pathologies s'associent souvent à une atteinte hépatique pouvant évoluer vers une cirrhose ou à des complications cardiaques.

Le diagnostic des surcharges en fer secondaire est le même que pour l'hémochromatose héréditaire (quantification du fer, de la ferritine et du coefficient de saturation de la transferrine plasmatique) et ce sont les tests génétiques et l'évaluation des risques familiaux qui permettent de distinguer ces deux types de surcharges.

La prise en charge comprend des poly-transfusions pour subvenir aux besoins d'apports en globules rouges souvent associés à des chélateurs du fer oraux ou intraveineux. Les chélateurs les plus fréquemment utilisés sont la déféroxamine, le déférasirox ou la défériprone qui seront éliminés dans l'urine et dans les fèces.

- La déféroxamine : chélateur de cations trivalents comme le fer Fe^{3+} et l'aluminium Al^{3+} administré de façon intraveineuse ou sous-cutanée lente. Son affinité pour le Fe^{2+} , le Cu^{2+} , le Zn^{2+} ou la Ca^{2+} est très faible. 1g de DFO peut théoriquement complexer 85 mg de fer. Il chélate principalement le fer libre plasmatique ou cellulaire, le fer lié à la ferritine ou l'hémosidérine (agrégat de ferritine, lipides, protéines dénaturées et fer insoluble). Il ne lie pas le fer de la transferrine, ni de l'hémoglobine ou autre cytochromes.
- Le déférasirox : chélateur par voie orale ayant une très forte affinité pour le fer trivalent. Il lie le fer avec une haute affinité dans une proportion de 2:1. Il n'a qu'une faible affinité pour l'aluminium et une très faible affinité pour le cuivre ou le zinc.
- Le défériprone : chélateur par voie orale liant le fer trivalent avec une très forte affinité dans une proportion 3:1. Affinité faible pour le zinc, le cuivre et l'aluminium. Le défériprone peut entraîner une neutropénie voire une agranulocytose.

4. Fer et immunité innée

Nous allons dans cette partie nous intéresser à l'importance du fer pour l'immunité et aux conséquences de ses dérégulations sur les fonctions immunes, notamment des neutrophiles. Le rôle du fer est central pour le bon fonctionnement du système immunitaire. Il participe notamment à la prolifération des cellules immunitaires, à leur activation et à l'optimisation de leur fonction.

L'étude des multiples mécanismes sophistiqués développés par les micro-organismes pour acquérir le fer souligne l'importance de ce métal comme facteur de virulence. De l'autre côté du front de guerre, les mammifères ont développé des mécanismes de défense en retirant le fer du pathogène et en l'employant dans ses réponses inflammatoires.

En effet, dans les monocytes et les macrophages, le fer participe à l'activation de NLRP3 et donc de l'inflammasome permettant la production notamment d'IL-1 β (Nakamura et al., 2016). Nous avons vu chez les neutrophiles que le fer était un élément central dans la production des formes réactives de l'oxygène nécessaire à la destruction des pathogènes. Mais qu'en est-il des conséquences sur le système immunitaire, et particulièrement les neutrophiles, en condition de carence ou d'excès en fer ?

Carences en fer

La carence en fer peut être retrouvée en condition d'anémie par manque d'apport en fer alimentaire, par pertes sanguines importantes, par impossibilité d'absorber le fer alimentaire (maladie céliaque par exemple) ou en condition d'anémie de l'inflammation, (l'activation chronique ou à durée trop grande des cellules immunitaires conduit à une sécrétion massive d'hepcidine - via l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-22 - et donc un arrêt de l'absorption du fer associée à un arrêt de l'érythropoïèse) (Kramer et al., 2008; Lee et al., 2005; Shanmugam et al., 2015; Wallace and Subramaniam, 2015). Cependant l'anémie n'est pas toujours associée à une carence en fer, comme vu précédemment dans les surcharges en fer secondaires.

Une des conséquences de la carence en fer sur les neutrophiles est l'apparition d'un phénotype d'hypersegmentation du noyau (plus de 6 lobes). Ces neutrophiles hypersegmentés présentent des défauts d'adhésion endothéliale (Kamp et al., 2012) et de réponse à l'infection (Leliefeld et al., 2018). Chez l'Homme, de nombreuses études ont

permis de mettre en évidence des défauts de production de ROS par les neutrophiles, une diminution de la respiration mitochondriale, une diminution de l'activité myéloperoxydase et des dysfonctions dans le processus de phagocytose et le pouvoir bactéricide des neutrophiles.

Il semble que la capacité de phagocytose des neutrophiles ne soit pas toujours affectée par la déficience en fer, mais leur pouvoir bactéricide drastiquement et ceci de façon réversible par supplémentation en fer (Hassan et al., 2016; Kurtoğlu et al., 2003; Patruta et al., 1998; Walter et al., 1986).

Surcharges en fer

Les surcharges en fer sont d'origines multiples comme discuté précédemment, mais les avancées des dernières décennies ont permis d'identifier des gènes conduisant à une surcharge en fer qui peut être primitive ou secondaire. De nombreuses études ont évalué l'impact de la surcharge en fer sur la fonction des phagocytes et notamment des neutrophiles. Cependant, ces études ont été réalisées pour la grande majorité avant l'identification de ces gènes et ont évalué les conséquences des excès de fer sur le système immunitaire inné en considérant les surcharges en fer comme un même ensemble. Aujourd'hui, il est donc nécessaire d'apporter un regard nouveau en considérant ces surcharges en fer comme des composantes propres à chaque pathologie. Notamment, dans cette étude, nous cherchons à dissocier l'hémochromatose génétique présentant une absence d'augmentation de l'expression de l'hepcidine du reste des surcharges en fer où l'hepcidine peut être exprimée fortement par phase, et où l'érythropoïèse est bien souvent affectée. Notamment, chez les patients atteints de thalassémie, les neutrophiles présentent des dysfonctions de leur capacité de phagocytose, de leur chimiotaxie et de leur capacité oxydative (Cantinieux et al., 1987; Flament et al., 1986; Matzner et al., 1993). Ces altérations peuvent être corrigées par traitement avec des agents chélateurs du fer mais

ces chélateurs peuvent aussi conduire à des neutropénies (Cohen et al., 2000; Pati and Choudhry, 1999; Waterlot et al., 1985). Il semble que la surcharge en fer intracellulaire dans les neutrophiles entraîne une réduction de la fonctionnalité des neutrophiles à répondre aux agents infectieux notamment. Cependant, les mécanismes impliqués dans ces altérations ne sont aujourd'hui que peu compris et il semblerait que suivant la forme de fer considéré, les effets peuvent être variables, allant du dépôt de fer intracellulaire à l'induction de l'apoptose (Gotfryd et al., 2011; Hoepelman et al., 1988; Quintela-Carvalho et al., 2017). A l'inverse, un retrait du fer intracellulaire semble aussi impacter négativement le burst oxydatif du neutrophile (Zhu et al., 2005).

En ce qui concerne l'hémochromatose génétique, une étude a utilisé des neutrophiles et des macrophages de patients HH pour évaluer leur capacité de phagocytose. Si la diminution de la capacité de phagocytose semble nette en ce qui concerne les macrophages, c'est bien moins évident en ce qui concerne les neutrophiles. A nouveau, cette étude inclut des patients HH avant identification des gènes potentiellement mutés, et inclut donc ces patients dans les surcharges en fer au sens large. De plus, les patients inclus dans cette étude sont tous âgés et présentent des niveaux extrêmement élevés de tous leur paramètres martiaux circulants, associés à des dommages aux organes tels que des diabètes ou des infections récurrentes des voies respiratoires (van Asbeck et al., 1984). Il a été cependant rapporté que la capacité de phagocytose des monocytes/macrophages issus de patients atteints d'hémochromatose génétique était diminué (Moura et al., 1998).

Mais un point très important est le fait que les macrophages, ayant un rôle central dans le recyclage du fer, sont extrêmement impactés par ces niveaux d'hépcidine anormalement normaux. Ils sont très pauvres en fer, soulevant des questionnements quant à la pertinence des corrélations apportées par les études précédentes sur l'effet direct de la surcharge en fer sur la fonction des phagocytes.

5. Résumé de l'étude

Le fer est essentiel pour la réponse oxydative des neutrophiles en permettant la génération de formes réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase. La fonction des neutrophiles a cependant été décrite comme sévèrement altérée en conditions de surcharge en fer, notamment chez les patients multi-transfusés. Par conséquent, une régulation fine de l'homéostasie du fer semble avoir un rôle critique pour éviter la toxicité du fer due à sa haute réactivité chimique. L'hepcidine est l'hormone régulatrice clé de l'homéostasie du fer. Cependant, aucune étude n'a investigué le rôle de ce peptide dans le maintien de l'homéostasie du fer du neutrophile, ou même caractérisé la fonction des neutrophiles chez les patients atteints d'Hémochromatose Hériditaire (HH), une maladie génétique due à un défaut de production de l'hepcidine, extrêmement fréquente en Occident. Pour répondre à ces questions, nous avons étudié deux modèles de surcharge en fer : un modèle de surcharge en fer orale expérimentalement induite, dans lequel la production d'hepcidine est augmentée; et un modèle génétique de surcharge en fer, dans lequel l'hepcidine hépatique est délétée. Nous avons montré que la déficience en hepcidine protège les neutrophiles de la surcharge en fer intracellulaire et est associée à une surprenante augmentation de la réponse oxydative. Nous avons de plus observé que les neutrophiles issus de patients HH sont eux aussi protégés de l'accumulation intracellulaire de fer et présentent une augmentation similaire de la réponse oxydative, corrélée au niveau de saturation de la transferrine. Nous avons confirmé l'état d'hyperactivation des neutrophiles issus de patients HH par l'identification d'une phagocytose accrue et d'une diminution des L-sélectines à la surface des neutrophiles HH en comparaison à des donneurs sains. Nous avons identifié une augmentation de TNF α , VCAM-1 et ICAM-1 plasmatiques, facteurs importants dans l'activation des neutrophiles, comme acteurs potentiels du phénotype d'hyperactivation. Cette étude caractérise donc pour la première fois l'homéostasie du fer du neutrophile et les fonctions associées chez les patients HH.

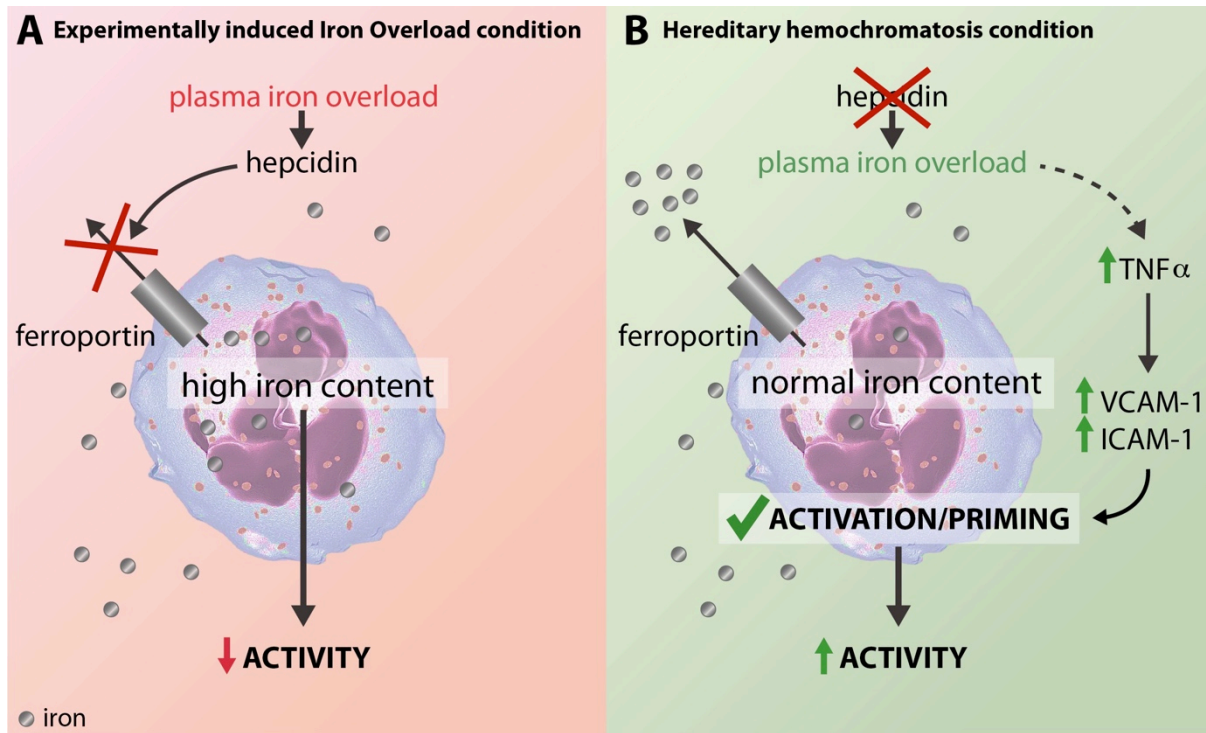


Figure 26. Résumé graphique de l'étude. La présence ou l'absence d'hépcidine est un élément décisif pour le bon fonctionnement des neutrophiles en condition de surcharge en fer systémique. A, dans le modèle de surcharge en fer expérimentalement induite, l'excès de fer systémique conduit à une augmentation de l'hépcidine, qui empêche l'export du fer des neutrophiles conduisant à une accumulation de fer intracellulaire. L'augmentation du fer intracellulaire affecte le bon fonctionnement des neutrophiles. B, dans l'hémochromatose héréditaire la déficience en hépcidine protège les neutrophiles de la surcharge en fer intracellulaire. La surcharge en fer systémique induit une augmentation des niveaux plasmatiques de TNF α , de ICAM-1 et VCAM-1, pouvant participer à l'activation des neutrophiles.

6. Publication – Blood 2019 – en révision

Neutrophils from Hereditary Hemochromatosis patients are protected from iron excess and present an hyperactivation state

Cyril Renassia, Sabine Louis, Sylvain Cuvellier, Nadia Boussetta, Jean-Christophe Deschemin, Joël Poupon, Didier Borderie, Karine Bailly, Pham My-Chan Dang, Jamel El-Benna, Sandra Manceau, Edouard Bardou-Jacquet, Sophie Vulont, François Lefrère, Carole Peyssonnaux



American Society of Hematology
2021 L Street NW, Suite 900,
Washington, DC 20036
Phone: 202-776-0544 | Fax 202-776-0545
editorial@hematology.org

Neutrophils from Hereditary Hemochromatosis patients are protected from iron excess and present an hyperactivation state

Tracking no: BLD-2019-004384

Cyril Renassia (Université de Paris, INSERM, Institut Cochin, CNRS, France) Sabine Louis (Université de Paris, INSERM, Institut Cochin, CNRS, France) sylvain CUVELLIER (CNRS, France) Nadia Boussetta (Université de Paris, INSERM, Institut Cochin, CNRS, France) Jean-Christophe Deschemin (Université de Paris, INSERM, Institut Cochin, CNRS, France) Joel POUPON (APHP, University of Paris, France) Didier Borderie (APHP, France) KARINE BAILLY (INSTITUT COCHIN, France) Pham My-Chan DANG (INSERM U773, France) Jamel El Benna (Centre Hospitalier Universitaire de Xavier Bichat, France) Sandra Manceau (Hôpital Necker, APHP, France) Edouard Bardou-Jacquet (CHU Pontchaillou, France) Sophie Vaultont (Institut Cochin, France) Francois Lefrere (Hôpital Necker, AP-HP, France) Carole Peyssonnaud (Université de Paris, INSERM, Institut Cochin, CNRS, France)

Abstract:

Iron is required for the oxidative response of neutrophils to allow the production of reactive oxygen species (ROS) by the phagocyte NADPH oxidase. Neutrophil functions was however reported to be severely altered in conditions of iron overload, as observed in polytransfused patients. Therefore, a tight regulation of neutrophil iron homeostasis seems to be critical to avoid iron toxicity. Heparidin is the key iron regulatory hormone in the organism. However, no studies have investigated its role in maintaining neutrophil iron homeostasis, nor characterized neutrophils function in patients with Hereditary Hemochromatosis, a common iron overload genetic disorder due to a defect in hepcidin production. First, to address these questions, we studied two mouse models of iron overload: an Experimentally-induced Iron Overload model (EIO), in which hepcidin is increased; and a genetic model of iron overload with a deletion of hepatic hepcidin. We found that hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron overload and is associated with an unexpected increase in neutrophil oxidative burst. Second, we observed that neutrophils from HH patients were also protected from iron excess and presented a similar increase in oxidative burst activity, correlated with transferrin saturation. We confirmed the activation state of HH neutrophils vs healthy donors, with the increased phagocytosis and decrease in surface L-selectin expression. We identified plasma TNF α , VCAM-1 and ICAM-1, important factors of neutrophil activation, as potential key actors in the hyperactivation process. Thus, this study characterized for the first time neutrophil iron homeostasis and associated functions in HH patients.

Conflict of interest: No COI declared

COI notes:

Preprint server: No;

Author contributions and disclosures: C.R., S.L., S.C., N.B., J-C.D. J.P, K.B. E B-J designed the experiments, carried out experiments and performed data analysis. P M-C D, J.E-B, S.M., S.V., F.L. provided essential reagents and scientific advice. C.P. designed and analyzed experiments, supervised the project. CP wrote the manuscript.

Non-author contributions and disclosures: No;

Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: emails to the corresponding author

Clinical trial registration information (if any):

Neutrophils from Hereditary Hemochromatosis patients are protected from iron excess and present an hyperactivation state

Running head: Activated neutrophils in genetic hemochromatosis

Cyril Renassia^{1,2}, Sabine Louis^{1,2}, Sylvain Cuvellier^{1,2}, Nadia Boussetta^{1,2}, Jean-Christophe Deschemin^{1,2}, Joel Poupon³, Didier Borderie⁴, Karine Bailly¹, Pham My-Chan Dang⁵, Jamel El-Benna⁵, Sandra Manceau⁶, Edouard Bardou-Jacquet⁷, Sophie Vaulont^{1,2}, Francois Lefrère⁶, Carole Peyssonnaud^{1,2,*}

¹ Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 Paris, France

² Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France

³ Laboratoire de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris, France

⁴ Department of Automated Biological Diagnosis, Cochin Hospital, Assistance Publique-Hopitaux de Paris; INSERM UMR 1124, University Paris-Descartes, Paris, France.

⁵ Université de Paris, Centre de recherche sur l'inflammation (CRI), Inserm, U1149, CNRS, ERL8252, Laboratoire d'Excellence Inflammex, Faculté de Médecine Xavier Bichat, F-75018 Paris, France

⁶ Service de Biothérapie, Groupe Necker-Enfants malades, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, 75015, Paris, France.

⁷ University of Rennes, CHU Rennes, INSERM, CIC 1414, Liver Disease Department, French Reference Center for Hemochromatosis and Iron Metabolism Disease, Rennes, France

*** Corresponding author:**

Carole Peyssonnaud, PhD
Institut Cochin, Department Endocrinology Metabolism and Diabetes
INSERM U1016, CNRS UMR8104
24 rue du Faubourg Saint Jacques
75014 Paris, FRANCE
e-mail: carole.peyssonnaud@inserm.fr
Phone: (33)1 44 41 24 71
Fax: (33)1 44 41 24 21

Text : 3843 words
Abstract : 246 words
6 figures / 1 table
57 references

Key points:

- **Identification of hepcidin as a key player in iron dependent regulation of neutrophil function**

- **First demonstration of an increased neutrophil function in hemochromatosis patients**

ABSTRACT

Iron is required for the oxidative response of neutrophils to allow the production of reactive oxygen species (ROS) by the phagocyte NADPH oxidase. Neutrophil functions was however reported to be severely altered in conditions of iron overload, as observed in polytransfused patients. Therefore, a tight regulation of neutrophil iron homeostasis seems to be critical to avoid iron toxicity. Heparin is the key iron regulatory hormone in the organism. However, no studies have investigated its role in maintaining neutrophil iron homeostasis, nor characterized neutrophils function in patients with Hereditary Hemochromatosis, a common iron overload genetic disorder due to a defect in hepcidin production. First, to address these questions, we studied two mouse models of iron overload: an Experimentally-induced Iron Overload model (EIO), in which hepcidin is increased; and a genetic model of iron overload with a deletion of hepatic hepcidin. We found that hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron overload and is associated with an unexpected increase in neutrophil oxidative burst. Second, we observed that neutrophils from HH patients were also protected from iron excess and presented a similar increase in oxidative burst activity, correlated with transferrin saturation. We confirmed the activation state of HH neutrophils *vs* healthy donors, with the increased phagocytosis and decrease in surface L-selectin expression. We identified plasma TNF α , VCAM-1 and ICAM-1, important factors of neutrophil activation, as potential key actors in the hyperactivation process. Thus, this study characterized for the first time neutrophil iron homeostasis and associated functions in HH patients.

INTRODUCTION

Neutrophils are the most abundant circulating white blood cells in humans. As both the first line of innate defense and effectors of adaptive immunity, neutrophils play crucial roles in the immune defense against infection^{1,2}. They respond to external stimuli by producing superoxide anions and HOCl via the phagocyte NADPH oxidase complex^{2,3} and Myeloperoxidase (MPO) respectively, through a process called respiratory/oxidative burst. Iron is required for both neutrophil NADPH oxidase and MPO activities as component of the catalytic site³ but can also participate to the generation of other ROS such as the hydroxyl radical (OH°) through the Fenton reaction during phagocytosis. Therefore iron plays an important role in antimicrobial host defense and inflammation⁴. However, studies extending back to 1959 described the toxic effect of excess iron on MPO⁵ but also on phagocytosis and bactericidal activity⁶⁻⁸. Excess iron stimulates production of oxidant radicals, that could be autotoxic for the neutrophil membranes with a subsequent phagocytosis impairment⁷⁻⁹. Altered phagocytic functions of neutrophils have been reported in patients with polytransfused hemodialysis^{10,11} and polytransfused beta-thalassemia major^{12,13}. Although other factors could contribute to impaired neutrophil functions in transfused patients, the improved neutrophil phagocytosis and bactericidal capacity following decreased body iron stores by iron chelation^{11,14} provide good evidence for the negative effects of iron overload on neutrophil functions.

Since these seminal discoveries describing the negative effect of iron overload on neutrophil functions, iron homeostasis has been the focus of active research, including the discovery of hepcidin as a key circulating hormone maintaining systemic iron homeostasis in the organism. However, no studies have investigated the impact of hepcidin on neutrophil iron homeostasis. Hepcidin is a 25 amino acids peptide mainly produced by the liver and secreted in the blood in response to iron overload or infection/inflammation¹⁵. Since iron cannot be excreted

physiologically, this peptide inhibits both iron absorption in the small intestine and the release of recycled iron from macrophages, to avoid iron excess. Hepcidin acts by inhibiting cellular iron efflux through binding to ferroportin (FPN), the sole known cellular iron exporter^{16,17}. Whether neutrophils express FPN and whether neutrophil intracellular iron content can be regulated by hepcidin is not known.

Hereditary Hemochromatosis (HH) or primary hemochromatosis is a common genetic disorder, characterized by iron overload, due to abnormally low hepcidin levels. HH is caused by mutations on genes involved in hepcidin regulation, or, rarely, by mutations on the hepcidin gene itself^{18,19}. The most common mutations in HH patients are on the HFE gene, with the most frequent one being the C282Y substitution, which accounts for 90% of the HFE mutations²⁰. HH patients have high plasma iron levels, increased transferrin saturation, high iron absorption and iron accumulation in parenchyma. Iron deposition leads to injuries in organs such as the liver, heart, or pancreas²¹.

While iron overload in primary hemochromatosis / HH patients is a consequence of hepcidin deficiency^{22,23}, patients with hematologic conditions requiring multiple transfusions of red blood cells to treat anemia, develop a secondary form of hemochromatosis associated with an increase in hepcidin allowing to counteract iron overload.

In this study, we first aimed to elucidate the impact of hepcidin deficiency or increase on neutrophil iron content and oxidative burst activity in animal models. Second, to translate our studies to humans, we analyzed the function of neutrophils isolated from HH patients.

METHODS

Animal studies

All animal studies were performed in 8-12 week-old C57BL/6J male mice and were reviewed and approved (Agreement n° CEEA34.CP.003.13) by the “Président du Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale Paris Descartes” and are in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals (Council of Europe, ETS 123, 1991).

When indicated, mice were fed an iron-rich diet (20g/kg; Safe diet) or a control diet (0.2g/kg; Safe diet).

Human samples

Blood samples from hemochromatosis patients and healthy donors were collected after written informed consent by the Department of Adult Haematology (Hopital Necker-Enfants Malades). Approval by the Ministry of Research was obtained under reference DC 2014-2272. Samples from hemochromatosis patients and healthy donors were compared on the same day. Blood samples from healthy donors were also obtained by the EFS (Etablissement Français du Sang) in accordance with the principles and guidelines established by the convention n° 18/EFS/030.

Neutrophil purification

From human whole blood:

Neutrophils were purified from human whole blood anticoagulated with ACD with the Dextran-Ficoll method as previously described²⁴. Purity of the preparation was assessed by

cell counting with a Türk hematological staining and cell viability by a Trypan blue staining.

The preparations used were above 95% purity and viability.

From mouse bone marrow:

Neutrophils were purified from mouse bone marrows by using the Miltenyi's neutrophil magnetic isolation kit according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec).

Oxidative burst

The oxidative burst kinetics were performed on a TriStar LB942 Modular Multimode Microplate Reader using 1×10^5 cells resuspended in 200 μ l HBSS (ThermoFisher), stimulated with the following agents: Phorbol 12-myristate 13-acetate (0,1 μ g/ml PMA, Sigma), N-Formyl-Met-Leu-Phe (5 μ M fMLF, Sigma), Opsonized Zymosan (20 mg/ml Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma). The indexed maximal relative luminescence was calculated thanks to the following formula: Indexed RLU max = ((Hemochromatosis patient maximal RLU max) / (Healthy donor maximal RLU)) * 100.

Neutrophil surface marker expression

After evaluation of the viability of the purified human neutrophil preparations (ThermoFisher Aqua Live/dead), the presence of the surface marker CD62L (using antibody against CD62L - BD Pharmingen 553152) was evaluated by the flow cytometer BD LSRFortessaTM and analyzed on FlowJo 10 software using Median Fluorescence Intensity.

Phagocytosis evaluation

Phagocytosis and acidification capacity of human neutrophils were quantified using the pHrodo Green *S. aureus* BioParticles kit (ThermoFisher) following the manufacturer's

instructions. Flow cytometry acquisition was performed on BD LSRT Fortessa™. Results were analyzed using the FlowJo 10 Software.

Plasma factors quantification

Human plasma was analyzed with the V-plex Human Biomarker 40-Plex kit from Meso Scale Discovery (K15209D) according to the manufacturer's recommendations.

Iron parameters measurement

Mouse plasma iron parameters (plasma iron, transferrin and ferritin) were quantified by the Biochemistry and Metabolism platform of the "Centre de Recherche sur l'Inflammation" (INSERM UMR1149 – Paris, France) and human plasma iron parameters by the Department of Automated Biological Diagnosis of Cochin Hospital.

Western blot

Extraction of total proteins was performed on frozen samples with equal neutrophil number. Triton X-100 lysis buffer (HEPES 50mM, PMSF 4mM, Leupeptin 0,4mM, Pepstatin 0,4mM, Orthovanadate 1mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM and Triton X-100 1%) to extract proteins. The western blotting has been performed as previously described²⁵ with a Tris-Glycine 10% Acrylamide Gel. The following antibodies were used:

-for mouse samples: Beta actin (Sigma A5316), Ferroportin (Alpha Diagnostic MTP11-A), Ferritin H (Cell Signaling Technology 4393), TfR1 (Invitrogen 13-6800) ;

-for human samples: Beta actin (Sigma A5316), Ferroportin (NOVUS NBP1-21502), Ferritin H (Cell Signaling Technology 4393).

Band intensity was quantified using ImageJ and expressed as fold change of the mean signal intensity over its own control.

RT-qPCR

Total RNA was extracted using TriReagent (Sigma) following the manufacturer's protocol and reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Real-time PCR was performed using The LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) in a LightCycler480 detection System. All values were normalized against Cyclophilin A ($\Delta\text{CT} = \text{CT} [\textit{Hamp1}] - \text{CT} [\textit{Cyclo}]$). Fold change in expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, where $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} (\text{test sample}) - \Delta\text{CT} (\text{control})$. *Cyclophilin A* was used as a reference gene. The following primers have been used: *CycloA* (Forward: 5' GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT 3'; Reverse: 5' CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT 3'). *Hamp1* (Forward: 5' CCT ATC TCC ATC AAC AGA T 3'; Reverse: 5' TGC AAC AGA TAC CAC ACT G 3').

Statistical analysis

All statistical analysis were performed on GraphPad Prism software, using the specific statistic test described in each figure legend. We evaluated the normality ($\alpha=0,05$) of each batch samples to determine the statistic test to use. When comparing two groups, unpaired t test was used when the normality was accepted and a Mann-Whitney test when the normality was not accepted. A one-way or a two-way ANOVA followed by a Sidak test was used when more than two groups were compared. Spearman's r test was used for correlations, using 95% confidence interval. R^2 calculation helps to model the robustness of the linearity of the correlations. Statistical significance is indicated by * symbols (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). ns indicates not significant. ND indicates non detectable.

RESULTS

Hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron excess

We assessed the level of iron-related proteins in neutrophils isolated from two models of iron overload: an experimentally-induced iron overload (EIO) model, where hepcidin mRNA expression is increased and a genetically-induced iron overload model (mimicking a primary iron overload model), where hepatic hepcidin gene is inactivated by the Cre-LoxP system²⁶ (*Hamp1Δ^{liver}*) (Figure 1A).

To test this hypothesis, we measured the expression of the iron storage molecule ferritin H (FTH), which is a surrogate of cellular iron content. While FTH expression was higher in the neutrophils isolated from the EIO model compared to controls, FTH expression was lower in the neutrophils from *Hamp1Δ^{liver}* mice compared to control littermates (Figure 1B-C). We next examined the expression of TfR1, which mediates cellular iron uptake from iron-loaded transferrin (holo-transferrin). As a consequence of the decrease in iron content, TfR1 was significantly increased in the neutrophils isolated from *Hamp1Δ^{liver}* mice compared to control littermates. Indeed, TfR1 is regulated post-transcriptionally by the IRE–IRP system, where under conditions of iron starvation, IRPs bind to the IREs present in the 3' UTR of TfR1 mRNA and promote its stability. FPN expression level was found similar in both conditions.

These results show that two models sharing systemic iron overload with either increase or defect in hepcidin production present differential neutrophil iron content.

Neutrophils from *Hamp1Δ^{liver}* mice displayed increased burst activity

We next tested whether the differences in neutrophil iron contents between the two models presenting similar plasma and liver iron overload (Supplementary Figure 1A) translated in

differences in oxidative burst activity. Neutrophils isolated from the EIO model presented with a significant defect in superoxide production compared to controls upon exposure to bacterial-type (N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine = fMLF), yeast-type (Opsonized Zymosan = OZ), or synthetic (Phorbol Myristate Acetate = PMA) agents (Figure 2A), confirming the decrease in neutrophil activity previously described in secondary iron overload patients¹⁰⁻¹³. Neutrophils loaded with holo-transferrin *in vitro* decreased their oxidative burst capacity (Supplemental Figure 1B), further confirming the detrimental effect of excess iron^{8,27}. In sharp contrast, neutrophils isolated from the genetically-induced iron overload model showed unexpectedly a significant increase in their oxidative burst in comparison to neutrophils isolated from control littermates (Figure 2 B). Iron deficient neutrophils have been associated to a decreased rather than an increased oxidative burst activity^{28,29} raising the question of the mechanism by which neutrophils isolated from hepcidin deficient mice present an exacerbated burst activity.

Despite systemic iron overload, neutrophils from HH patients are not iron loaded

To translate these results in humans, we had access for the different analyses to a cohort of 38 patients harboring homozygous *HFE* mutations (C282Y) and 31 healthy donors. Plasma iron and ferritin levels as well as transferrin saturation in the HH cohort was significantly increased compared to healthy donors (Figure 3A).

Interestingly, despite systemic iron overload, neutrophils isolated from HH patients presented similar FTH levels than healthy controls (Figure 3B-C). FPN levels were not significantly changed between HH patients and healthy donors (Figure 3B-C). Therefore, as in the HH mouse model, neutrophils from HH patients presented the same protection against intracellular iron overload.

Oxidative burst capacity of HH neutrophils is positively correlated with plasma transferrin saturation

In agreement with our mouse model of HH, the oxidative burst was increased in neutrophils from HH patients compared to healthy donors following stimulation with fMLF, OZ or PMA. (Figure 4A-B). In order to determine whether the iron status of HH patients was involved in the modulation of the neutrophil activity, we tested correlations between transferrin saturation and the level of ROS production in each patient. We found a significant positive correlation between the transferrin saturation, and the oxidative burst in response to fMLF (Spearman's $r = 0.6649$ - p value = 0.0019), OZ (Spearman's $r = 0.5645$ - p value = 0.0147) and PMA: Spearman's $r = 0.5480$ - p value = 0.0186) (Figure 4C). In contrast, plasma ferritin was not correlated to the oxidative burst response (Figure 4D).

Altogether, these data suggest first that neutrophils from HH patients are “protected” from intracellular iron overload and second that the increase in neutrophil activity of HH patients correlates with systemic iron overload.

Plasma TNF α from patients correlates with oxidative burst and transferrin saturation

To determine whether the indirect effect of systemic iron overload on the oxidative burst response could be linked to circulating factors known to be involved in neutrophil activation, we performed a multiplex analysis of 40 circulating factors including cytokines, chemokines and angiogenesis/vascular injury factors in the plasma of 26 HH patients versus 22 healthy controls (Figure 5A and supplemental Figure 2) Interestingly, TNF α was among the most significantly upregulated factors in the plasma of HH patients compared to healthy donors. TNF α is well known to induce the expression of the adhesion molecules ICAM-1 and

VCAM-1, which induce neutrophil adhesion and para- or trans-cellular migration of vascular endothelium, and therefore contribute to neutrophil priming/activation^{30,31}. These two adhesion molecules were also found to be significantly upregulated in the plasma of HH patients. TNF α is also one of the more potent priming agents of human neutrophils³²⁻³⁴ and sufficient to induce an increase of the neutrophil respiratory burst in human³⁵. We found a positive correlation between plasma TNF α levels and transferrin saturation (Figure 5B) arguing that plasma TNF α production is a likely consequence of iron overload. Moreover, plasma TNF α also correlates with the oxidative capacity of neutrophils after fMLF, OZ and PMA stimulation (Figure 5B), confirming the importance of this factor in neutrophil activation of these patients.

Neutrophils from HH patients are hyperactivated

To confirm the “primed” phenotype of neutrophils in the HH population, we measured two other parameters of neutrophil activation. First, we evaluated by flow cytometry the relative amount of L-selectin/CD62L on the surface of neutrophils, L-selectin/CD62L shedding being a classical readout for neutrophil activation³⁶. As compared to healthy donors, a decrease in the amount of L-selectin/CD62L was observed on the surface of neutrophils of HH patients (Figure 5C), confirming the neutrophil activation state in this population.

Second, we analyzed the neutrophil phagocytosis capacity from both populations. We performed an *in vitro* experiment using *S.aureus* bioparticles coupled to a fluorochrome. While the recognition capacity of neutrophils towards the bioparticles was not affected (Figure 5D), flow cytometry analysis indicated that within 15 min and 30 min incubation, fluorescein-labeled *S.aureus* particles were phagocytized by HH neutrophils at higher levels than by neutrophils from healthy donors (Figure 5E).

DISCUSSION

Although iron is a key metal for neutrophil function, neutrophils from patients with HH, a systemic iron overload disease of genetic origin had paradoxically never been characterized. Using neutrophils isolated from genetic mouse models and HH patients, we investigated the impact of hepcidin deficiency on neutrophil iron homeostasis and function.

First, we found that neutrophil intracellular iron levels are greatly influenced by hepcidin levels (Figure 6). We showed that hepcidin deficiency protects neutrophils from iron excess. In the liver specific hepcidin knockout model, neutrophils are iron deficient (as measured by decreased FTH levels). Regulation of iron homeostasis genes in response to intracellular iron levels is mediated at a post-transcriptional level by IRPs, which bind to IREs found in the untranslated regions (UTRs) of target mRNAs. High IRP-binding activity in response to low intracellular iron levels results in translational repression of mRNAs that contain an IRE in their 5'UTR (such as FPN or FTH) or promotes mRNA stability if bound to mRNAs that contain an IRE in 3'UTR (such as TfR1). As a consequence of cellular iron deficiency, TfR1 levels were increased in the neutrophils. Therefore, in a dynamic *in vivo* *Hamp1Δ^{liver}* model, FPN may be stabilized at the protein level (by the lack of hepcidin) but translationally repressed by the IRE/IRP system; this results in normalization of FPN levels. This dual regulation could explain the absence of FPN protein level changes in neutrophils isolated from *Hamp1Δ^{liver}* mice compared to WT neutrophils. Conversely, in the EIO model, hepcidin-mediated FPN degradation may be compensated by FPN stabilization at the translational level through the IRE/IRP system.

In contrast to the genetic mouse model in which hepcidin is absent, hepcidin levels are abnormally low in regard to the iron status in HH patients but do not significantly differ from control subjects³⁷. Therefore in contrast to the hepcidin KO model, the stabilization of the

iron export system caused by hepcidin deficiency in HH patients may be milder, and not consequently lead to iron deficient neutrophils. Indeed, neutrophils from HH patients have similar levels of intracellular iron than healthy donors and do not present iron overload as shown in the EIO model and as reported in neutrophils of patients with acquired iron overload^{11,12,14,27}.

Our study showed a significant defect in ROS production in neutrophils isolated from iron overload conditions in which hepcidin is increased. These results suggest that the use of hepcidin mimetics or agonists in a therapeutic perspective to treat iron overload may have noxious effects on neutrophil functions. The use of hepcidin for treatment of HH should be considered with caution, as it would increase intracellular iron levels of neutrophils and may decrease their activity. In the treatment phase, when systemic iron is still present, patients may be more susceptible to infections due to defective neutrophils. Hepcidin agonists are also clinically relevant in beta-thalassemia. Beta-thalassemia major causes ineffective erythropoiesis and chronic anemia and is associated with iron overload due to both transfused iron and increased iron absorption, the latter mediated by suppression of the iron-regulatory hormone hepcidin. Hepcidin is therefore also considered for the treatment of this pathology and similar precautions should be applied.

Second, our findings showed that neutrophils from HH patients present an activation phenotype. The positive correlation between transferrin saturation and oxidative burst on one hand, and transferrin saturation and TNF α on the other hand led us hypothesize that systemic iron overload could trigger increased oxidative burst mediated by TNF α . Indeed, increase in TNF α levels have already been associated to iron overload pathologies³⁸⁻⁴¹ and a number of studies showed that circulating TNF α results in neutrophil priming, oxidative response, and adhesion³². In endothelial cells, TNF α leads to the enhanced expression of vascular adhesion

molecule-1 (VCAM-1) and inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)⁴², also elevated in our HH cohort, confirming previous results⁴³. Interestingly, IFN γ was also found to be significantly increased in the plasma of our HH cohort. In view of its capacity to increase phagocytosis and release of ROS and its ability to synergize with TNF α in promoting inflammatory responses⁴⁴, IFN γ could also contribute to the activation of neutrophils in HH patients.

The “neutrophil oxidative burst” represents a pivotal component of innate immune defense against invading micro-organisms, but is also a cause of “collateral tissue damage” via extracellular effects of ROS. The consequence of neutrophil « hyperactivation » in HH patients may be multiple. Hemochromatosis in its advanced stages can be associated with diabetes mellitus, arthropathy and severe cardiac complications (including congestive heart failure, premature coronary artery disease, and cardiac arrhythmias). Activated neutrophils play crucial roles in these manifestations. First, the elevation of ROS production by neutrophils has been shown to be an aggravating factor in diabetic-related complications^{45,46}. Second, neutrophils play an important role in the pathophysiology of arthritis via the release of ROS and neutrophil depletion can greatly inhibit the development of arthritis^{47,48}. Finally, although the pathophysiology of cardiac dysfunction in HH has not been well characterized, enhanced production of ROS has been speculated to be responsible for tissue damage⁴⁹ and there is substantial evidence that in the heart, neutrophils induce tissue injury (both myocardial and microvascular), in many forms of acute heart failure⁵⁰. Altogether, the increase in neutrophils activation could be a contributing factor in the development of the pathologies associated with hemochromatosis.

It is generally accepted that iron overload disorders cause increased susceptibility to infections. Among the mechanisms implicated is the possibility that the increased availability of iron stimulates bacterial growth and increases bacterial virulence. Concerning HH, case

reports have described an increased prevalence of certain infections. In these cases, the pathogens involved were intracellular bacteria such as *Yersinia enterocolitica*^{51,52}, *Yersinia pseudotuberculosis*^{51,53}, *Listeria monocytogenes*⁵⁴ and *Vibrio vulnificus*⁵⁵. These pathogens require higher iron concentrations for growth. In addition, in some cases it was not clear whether the infection observed was a direct consequence of the iron overload or secondary to co-existing liver cirrhosis, liver carcinoma or liver transplantation surgery. Thus, the real impact of iron overload in increasing infection susceptibility is a matter of debate, especially in view of a number of studies that have emphasized the deleterious effect of excess iron on leucocytes¹⁰⁻¹⁴.

Hemochromatosis is one of the most common heritable genetic conditions in people of Northern Europe, with a prevalence of one in 200. Genetic studies suggest that the original C282Y hemochromatosis mutation coincides with the Neolithic farmers expanding into Central Europe and that the spread of the allele may be an adaptation to a dietary shift from hunting and gathering wild foods rich in iron to domesticated cereal and dairy food poor in iron^{56,57}. The presence of the mutant allele may have provided an evolutionary advantage by maintaining higher iron levels in the blood. Then, because of the general improvement in nutrition, acquisition of this mutation led to iron overload. We can suppose that this mutation should have been counterselected if leading to fatal infection. To provide elements of a response to this question, we examined infection related deaths in a prospective cohort including 1085 patients with a mean follow up duration of 8.3 (\pm 3.9) years. No infection related death was observed in the cohort, while 0.93 were expected in the general population. Infection related death was overall similar to that of the general population (SMR:0.00 (0.00 - 3.24). Similarly no significant difference was seen according to sex, age at diagnosis, or serum ferritin at diagnosis (Table 1). Therefore, despite iron overload, HH patients do not exhibit an increased infection related death. Even if further investigations will be required to

confirm this assumption, we can speculate that the stimulation of neutrophil functions may have conferred a selective advantage to HH patients during evolution.

In conclusion and in a larger context, our study pointing out an unexpected activation of neutrophils in HH patients, may explain some features of the disease but also clarify the paradoxical relative protection of these patients to infection considering iron overload. Moreover this study warns against the use of hepcidin in therapeutics that may have noxious effects on neutrophil function. Further studies will be required to test these different hypotheses, which open a wide area of research.

Acknowledgements

This work was supported by a funding from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2011-2015 Grant agreement no 261296), the "Fondation pour la Recherche Médicale" (DEQ20160334903), the Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051, funded by the program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02.

We thank Véronique Witko-Sarsat and Sylvie Chollet-Martin for scientific discussions and technical advice.

We greatly acknowledge the HistIM and animal facilities of Institut Cochin.

Authorship contributions

C.R., S.L., S.C., N.B., J-C.D. J.P, K.B. E B-J designed the experiments, carried out experiments and performed data analysis. P M-C D, J.E-B, S.M., S.V., F.L. provided essential

reagents and scientific advice. C.P. designed and analyzed experiments, supervised the project.

CP wrote the manuscript.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

REFERENCES

1. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* 2015;11(3):e1004651.
2. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210(7):1283-1299.
3. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-189.
4. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 2016;90(1):1-37.
5. Schultz J, Rosenthal S. Iron (II) inactivation of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 1959;234:2486-2490.
6. Cantinieaux B, Hariga C, Clumeck N, et al. The role of excess iron in the pathogenesis of disturbed neutrophil functions in cirrhotic patients (neutrophil functions in cirrhotic patients). *Acta Clin Belg.* 1987;42(3):153-167.
7. van Asbeck BS, Marx JJ, Struyvenberg A, van Kats JH, Verhoef J. Deferoxamine enhances phagocytic function of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1984;63(3):714-720.
8. van Asbeck BS, Marx JJ, Struyvenberg A, van Kats JH, Verhoef J. Effect of iron (III) in the presence of various ligands on the phagocytic and metabolic activity of human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1984;132(2):851-856.
9. Cantinieaux B, Boelaert JR, De Meuleneire J, Kerrels V, Fondu P. Neutrophils from patients with secondary haemosiderosis contain excessive amounts of autotoxic iron. *Eur J Haematol.* 1993;51(3):161-165.
10. Cantinieaux B, Boelaert J, Hariga C, Fondu P. Impaired neutrophil defense against *Yersinia enterocolitica* in patients with iron overload who are undergoing dialysis. *J Lab Clin Med.* 1988;111(5):524-528.
11. Waterlot Y, Cantinieaux B, Hariga-Muller C, De Maertelaere-Laurent E, Vanherweghem JL, Fondu P. Impaired phagocytic activity of neutrophils in patients receiving haemodialysis: the critical role of iron overload. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985;291(6494):501-504.
12. Cantinieaux B, Hariga C, Ferster A, De Maertelaere E, Toppet M, Fondu P. Neutrophil dysfunctions in thalassaemia major: the role of cell iron overload. *Eur J Haematol.* 1987;39(1):28-34.
13. Skoutelis AT, Lianou E, Papavassiliou T, Karamerou A, Politi K, Bassaris HP. Defective phagocytic and bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes in patients with beta-thalassaemia major. *J Infect.* 1984;8(2):118-122.

14. Cantinieaux B, Hariga C, Ferster A, Toppet M, Fondu P. Desferrioxamine improves neutrophil phagocytosis in thalassemia major. *Am J Hematol*. 1990;35(1):13-17.
15. 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.
16. Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, et al. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood*. 2018;131(8):899-910.
17. 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.
18. Barton JC. Hemochromatosis and iron overload: from bench to clinic. *Am J Med Sci*. 2013;346(5):403-412.
19. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;33(1):21-22.
20. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1472-1477.
21. Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loreal O. Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18016.
22. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;34(1):97-101.
23. Pietrangelo A. Genetics, Genetic Testing, and Management of Hemochromatosis: 15 Years Since Hepcidin. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1240-1251 e1244.
24. Kuhns DB, Long Priel DA, Chu J, Zarembek KA. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:7 23 21-16.
25. Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1159-1166.
26. Zumerle S, Mathieu JR, Delga S, et al. Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype. *Blood*. 2014;123(23):3646-3650.
27. van Asbeck BS, Marx JJ, Struyvenberg A, Verhoef J. Functional defects in phagocytic cells from patients with iron overload. *J Infect*. 1984;8(3):232-240.
28. Kurtoglu E, Ugur A, Baltaci AK, Mogolkoc R, Undar L. Activity of neutrophil NADPH oxidase in iron-deficient anemia. *Biol Trace Elem Res*. 2003;96(1-3):109-115.
29. Mackler B, Person R, Ochs H, Finch CA. Iron deficiency in the rat: effects on neutrophil activation and metabolism. *Pediatr Res*. 1984;18(6):549-551.
30. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
31. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005;106(2):584-592.
32. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):180-193.
33. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*. 1994;62(6):2195-2201.
34. McColl SR, Beauseigle D, Gilbert C, Naccache PH. Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis

factor-alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. *J Immunol.* 1990;145(9):3047-3053.

35. Wewers MD, Rinehart JJ, She ZW, et al. Tumor necrosis factor infusions in humans prime neutrophils for hypochlorous acid production. *Am J Physiol.* 1990;259(4 Pt 1):L276-282.

36. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol.* 2019;10:1068.

37. Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, et al. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood.* 2003;102(1):371-376.

38. Bhowmik A, Ojha D, Goswami D, et al. Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice. *Biomed Pharmacother.* 2017;87:443-450.

39. Ige AO, Ongele FA, Adele BO, Emediong IE, Odetola AO, Adewoye EO. Pathophysiology of iron overload-induced renal injury and dysfunction: Roles of renal oxidative stress and systemic inflammatory mediators. *Pathophysiology.* 2019;26(2):175-180.

40. Li J, Hou Y, Zhang S, et al. Excess iron undermined bone load-bearing capacity through tumor necrosis factor-alpha-dependent osteoclastic activation in mice. *Biomed Rep.* 2013;1(1):85-88.

41. Maras JS, Das S, Sharma S, et al. Iron-Overload triggers ADAM-17 mediated inflammation in Severe Alcoholic Hepatitis. *Sci Rep.* 2018;8(1):10264.

42. Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989;59(6):1203-1211.

43. Norris S, White M, Mankan AK, Lawless MW. Highly sensitivity adhesion molecules detection in hereditary haemochromatosis patients reveals altered expression. *Int J Immunogenet.* 2010;37(2):125-133.

44. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1997;272(23):14899-14907.

45. Ridzuan N, John CM, Sandrasaigaran P, et al. Preliminary study on overproduction of reactive oxygen species by neutrophils in diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016;7(13):271-278.

46. Wong RK, Pettit AI, Davies JE, Ng LL. Augmentation of the neutrophil respiratory burst through the action of advanced glycation end products: a potential contributor to vascular oxidant stress. *Diabetes.* 2002;51(9):2846-2853.

47. Tanaka D, Kagari T, Doi H, Shimozato T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology.* 2006;119(2):195-202.

48. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2001;167(3):1601-1608.

49. Gulati V, Harikrishnan P, Palaniswamy C, Aronow WS, Jain D, Frishman WH. Cardiac involvement in hemochromatosis. *Cardiol Rev.* 2014;22(2):56-68.

50. Liu S, Chirkov YY, Horowitz JD. Neutrophil-Initiated Myocardial Inflammation and Its Modulation by B-Type Natriuretic Peptide: A Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1).

51. Abbott M, Galloway A, Cunningham JL. Haemochromatosis presenting with a double Yersinia infection. *J Infect.* 1986;13(2):143-145.

52. Olesen LL, Ejlersen T, Paulsen SM, Knudsen PR. Liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica* in patients with haemochromatosis. *J Intern Med.* 1989;225(5):351-354.
53. Conway SP, Dudley N, Sheridan P, Ross H. Haemochromatosis and aldosterone deficiency presenting with *Yersinia pseudotuberculosis* septicaemia. *Postgrad Med J.* 1989;65(761):174-176.
54. Sinkovics JG, Cormia F, Plager C. Hemochromatosis and *Listeria* infection. *Arch Intern Med.* 1980;140(2):284.
55. Bullen JJ, Spalding PB, Ward CG, Gutteridge JM. Hemochromatosis, iron and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*. *Arch Intern Med.* 1991;151(8):1606-1609.
56. Heath KM, Axton JH, McCullough JM, Harris N. The evolutionary adaptation of the C282Y mutation to culture and climate during the European Neolithic. *Am J Phys Anthropol.* 2016;160(1):86-101.
57. Richards MP, Schulting RJ, Hedges RE. Archaeology: sharp shift in diet at onset of Neolithic. *Nature.* 2003;425(6956):366.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron overload. (A) Liver hepcidin (*Hamp1*) expression evaluated by Real Time quantitative PCR (RT-qPCR) on *Hamp1* Δ^{liver} mice and mice fed an iron rich diet for 6 weeks (EIO model) and their respective controls. N=3 per group. (B) Western blot detection of FTH, TfR1, FPN and beta-actin on neutrophils isolated from the different mouse models as indicated. N=3 per condition. Representative of two independent experiments. (C) Quantification of the band intensity expressed in fold change of the associated control.

Figure 2. Increased oxidative burst response of neutrophils isolated from *Hamp1* Δ^{liver} mice. Kinetics of the oxidative burst response to fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) or PMA of neutrophils isolated from (A) mice fed an iron rich diet for 6 months (EIO) vs control mice or (B) *Hamp1* Δ^{liver} vs *Hamp1* $^{\text{lox/lox}}$ mice. N=3 per group. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by a Sidak test.

Figure 3. Neutrophils from HH patients are not iron loaded. (A) Plasma iron, Transferrin (Tf) saturation and ferritin in healthy donors (n=16) and HH patients (n=20). (B) Western blot of FPN, FTH and beta-actin on total protein extracts from neutrophils isolated from healthy donors and HH patients. (C) Western blot band intensity quantification for FPN and FTH normalized by the healthy donor mean band intensity.

Figure 4. Oxidative burst in neutrophils from HH patients is positively correlated with plasma transferrin saturation. (A) Representative experiment of the oxidative burst assay upon stimulation with fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) and PMA on neutrophils isolated from HH patients (red) and healthy donors (black). (B) RLU_{max} HH patient / RLU_{max} Healthy donor ratio for each independent experiment. (C) Correlation between plasma transferrin saturation and area under the curve upon stimulation with fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) and PMA for each patient. (D) Correlation between plasma ferritin level and area under the curve for the same previous stimulating agents for each patient.

Figure 5. Neutrophils from HH patients are activated. (A) Plasma TNF α , VCAM-1 and ICAM-1 in the plasma of HH patients (n=23; red square) vs healthy donors (n=18; black dot). (B) Correlations between plasma TNF α and transferrin saturation or between plasma TNF α and area under the curve of the oxidative burst upon stimulation with fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) and PMA for each patient. (C) Analysis by flow cytometry of CD62L surface expression on neutrophils isolated from HH patients (n=4) vs healthy donors (n=3) as measured by Mean Fluorescence Intensity (MFI) and expressed in fold change. (D-E) Evaluation of the phagocytosis capacity (number of phagocytized *S. aureus* bioparticles) in neutrophils from HH patients vs healthy donors. Three independent experiments. (D) Analysis of the percentage of phagocytic neutrophils over time. (E) Comparison of the Median Fluorescence signal Intensity (MFI) between neutrophils from HH patients versus healthy donors. The normality of each data batch was assessed to determine the appropriate statistic test to use. A Mann Whitney test was used for the analysis of TNF α and ICAM-1 graphs in (A), an unpaired Student t test for (E) and VCAM-1 graph in (A) and a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Sidak test (D).

Figure 6. Presence or absence of hepcidin is a decisive element for the neutrophil function in the setting of iron overload. (A) In EIO, the systemic iron overload increases hepcidin, which blocks the iron export of the neutrophil and results in accumulation of intracellular iron. The increase in intracellular iron impairs neutrophil function. (B) In HH, the hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron overload. The systemic iron overload increases plasma TNF α , ICAM-1 and VCAM-1 levels, which may contribute to neutrophil activation.

Table 1. Infection related death Standardized Mortality Ratios according to clinical and biological characteristics of patients.

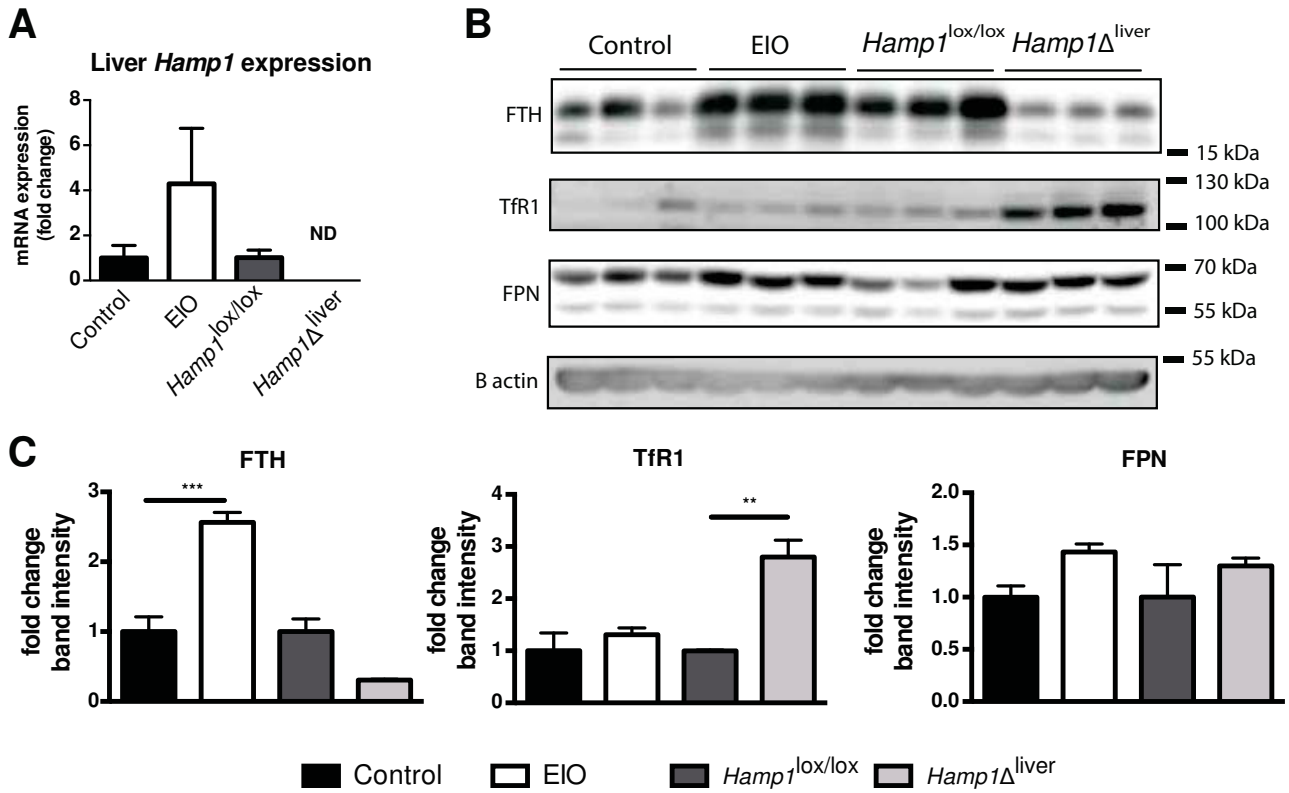


Figure 1. Hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron overload. (A) Liver hepcidin (*Hamp1*) expression evaluated by Real Time quantitative PCR (RT-qPCR) on *Hamp1*Δ^{liver} mice and mice fed an iron rich diet for 6 weeks (EIO model) and their respective controls. N=3 per group. (B) Western blot detection of FTH, TfR1, FPN and beta-actin on neutrophils isolated from the different mouse models as indicated. N=3 per condition. Representative of two independent experiments. (C) Quantification of the band intensity expressed in fold change of the associated control.

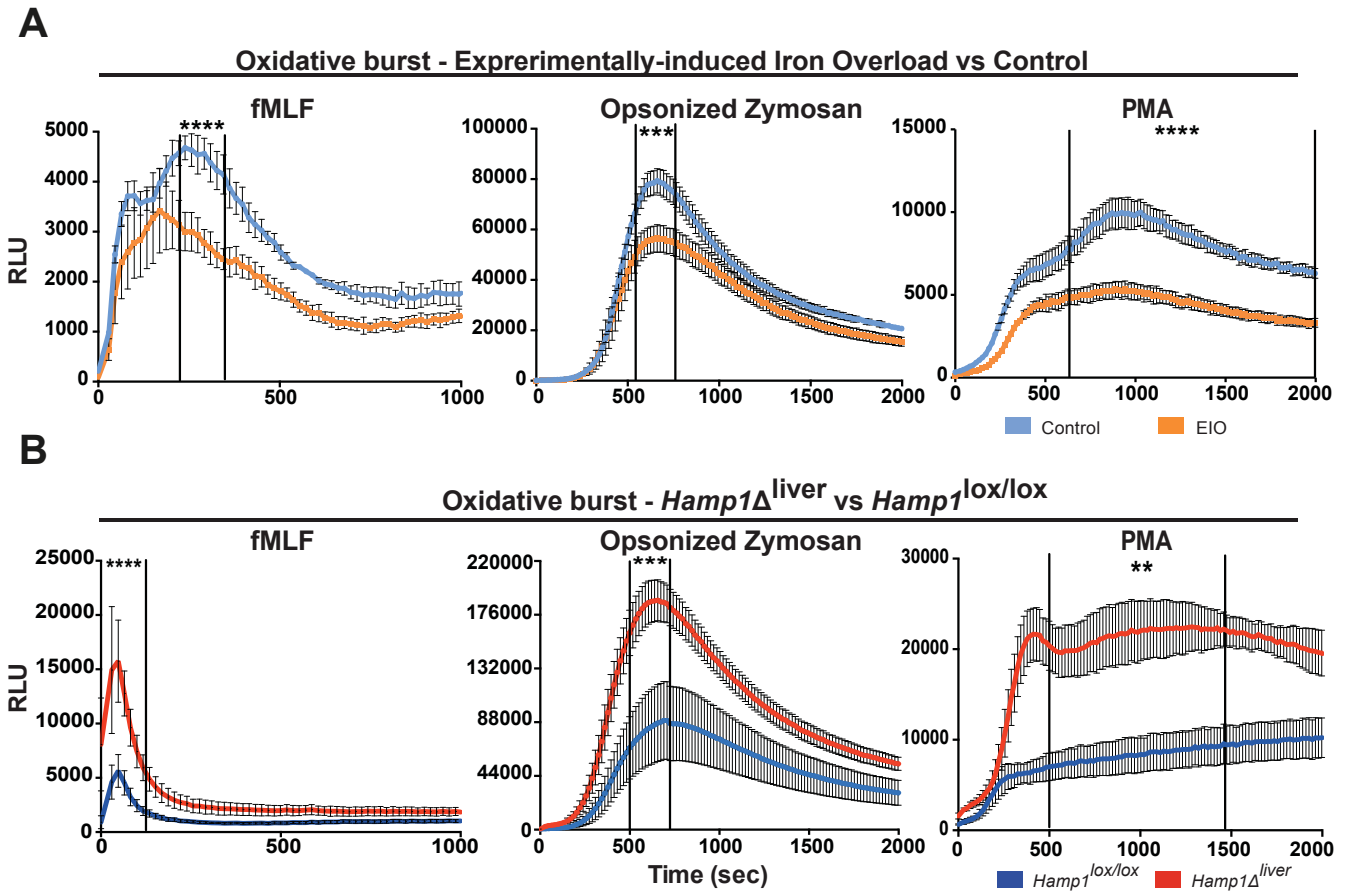


Figure 2. Increased oxidative burst response of neutrophils isolated from *Hamp1*^{liver} mice. Kinetics of the oxidative burst response to fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) or PMA of neutrophils isolated from (A) mice fed an iron rich diet for 6 months (EIO) vs control mice or (B) *Hamp1*^{liver} vs *Hamp1*^{lox/lox} mice. N=3 per group. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by a Sidak test.

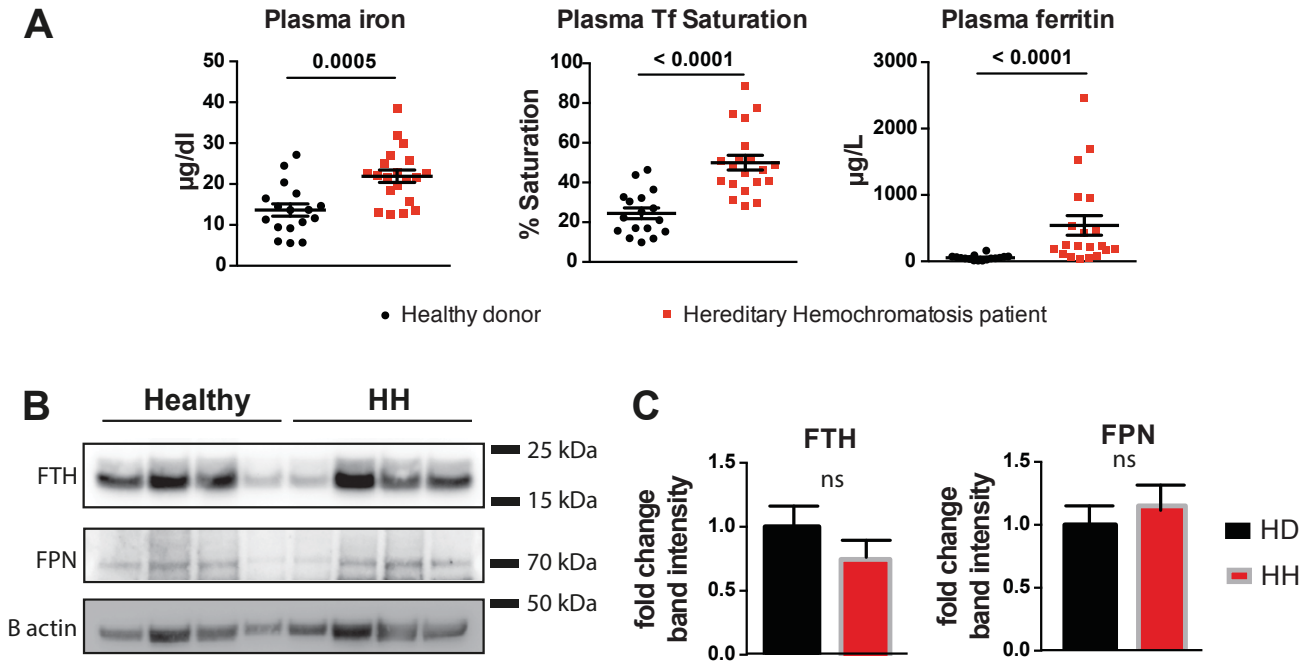


Figure 3. Neutrophils from HH patients are not iron loaded. (A) Plasma iron, Transferrin (Tf) saturation and ferritin in healthy donors (n=16) and HH patients (n=20). (B) Western blot of FPN, FTH and beta-actin on total protein extracts from neutrophils isolated from healthy donors and HH patients. (C) Western blot band intensity quantification for FPN and FTH normalized by the healthy donor mean band intensity.

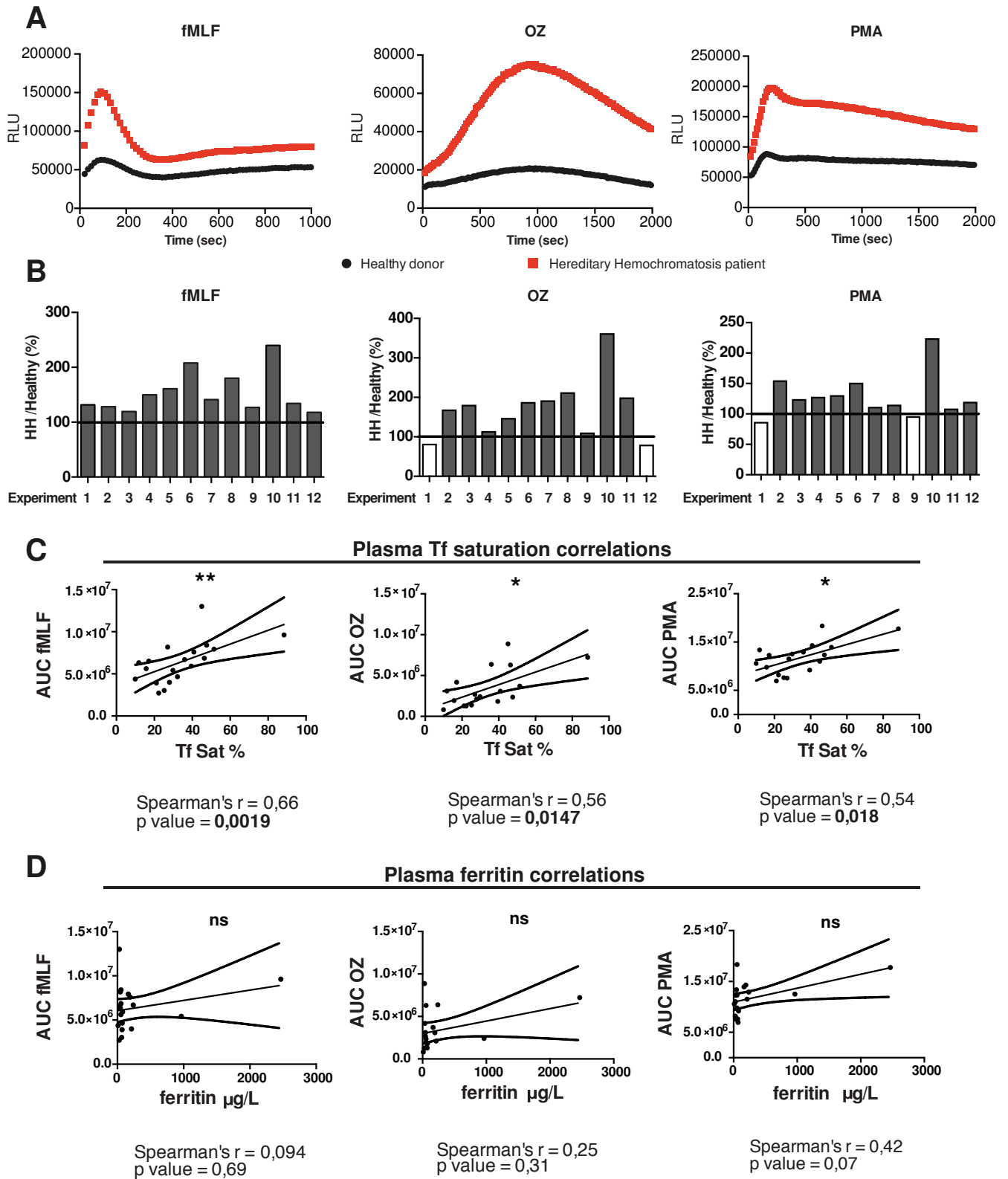


Figure 4. Oxidative burst in neutrophils from HH patients is positively correlated with plasma transferrin saturation. (A) Representative experiment of the oxidative burst assay upon stimulation with fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) and PMA on neutrophils isolated from HH patients (red) and healthy donors (black). (B) RLU_{max} HH patient / RLU_{max} Healthy donor ratio for each independent experiment. (C) Correlation between plasma transferrin saturation and area under the curve upon stimulation with fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) and PMA for each patient. (D) Correlation between plasma ferritin level and area under the curve for the same previous stimulating agents for each patient.

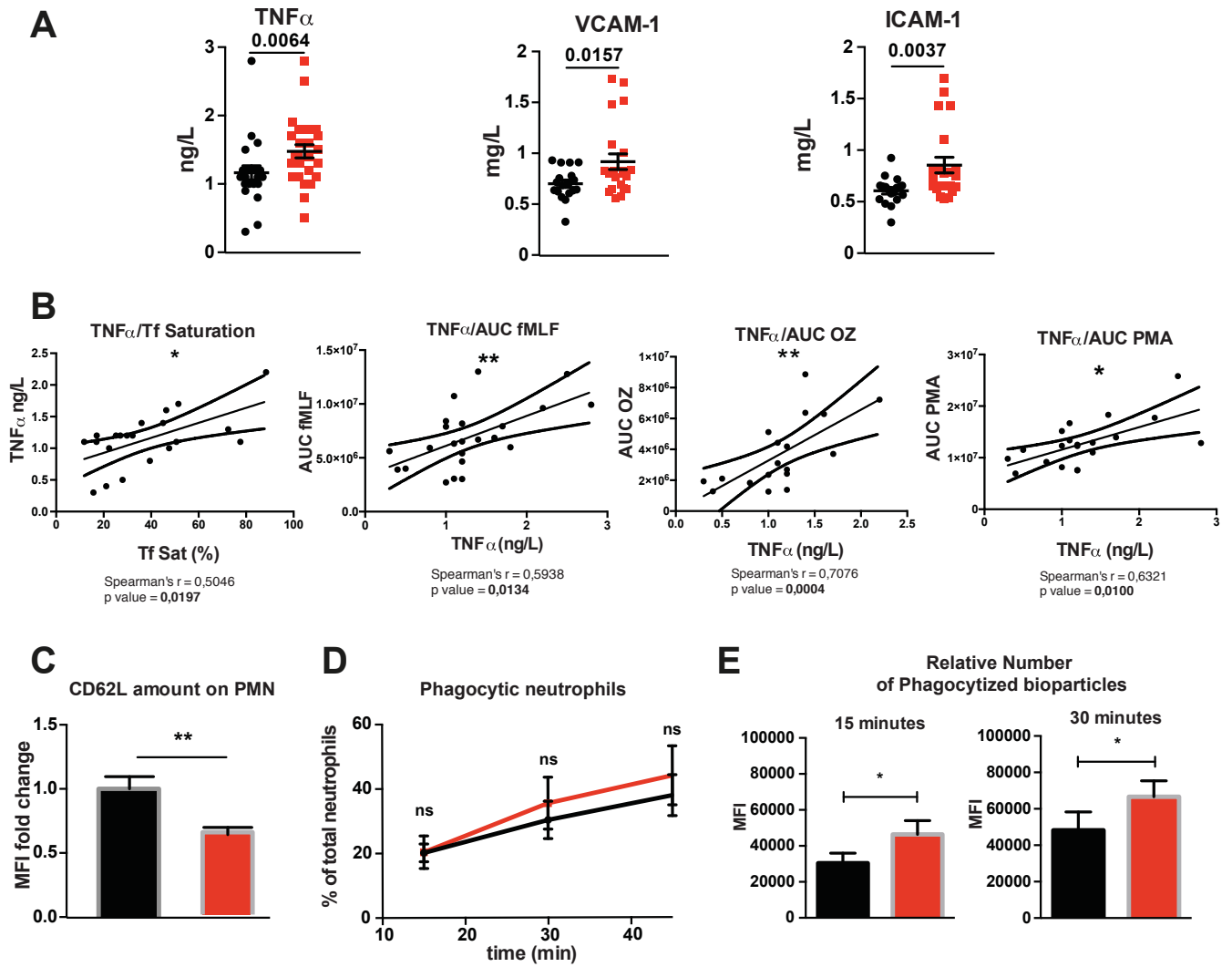


Figure 5. Neutrophils from HH patients are activated. (A) Plasma TNF α , VCAM-1 and ICAM-1 in the plasma of HH patients (n=23; red square) vs healthy donors (n=18; black dot). (B) Correlations between plasma TNF α and transferrin saturation or between plasma TNF α and area under the curve of the oxidative burst upon stimulation with fMLF, Opsonized Zymosan (OZ) and PMA for each patient. (C) Analysis by flow cytometry of CD62L surface expression on neutrophils isolated from HH patients (n=4) vs healthy donors (n=3) as measured by Mean Fluorescence Intensity (MFI) and expressed in fold change. (D-E) Evaluation of the phagocytosis capacity (number of phagocytized *S. aureus* bioparticles) in neutrophils from HH patients vs healthy donors. Three independent experiments. (D) Analysis of the percentage of phagocytic neutrophils over time. (E) Comparison of the Median Fluorescence signal Intensity (MFI) between neutrophils from HH patients versus healthy donors. The normality of each data batch was assessed to determine the appropriate statistic test to use. A Mann Whitney test was used for the analysis of TNF α and ICAM-1 graphs in (A), an unpaired Student t test for (E) and VCAM-1 graph in (A) and a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Sidak test (D).

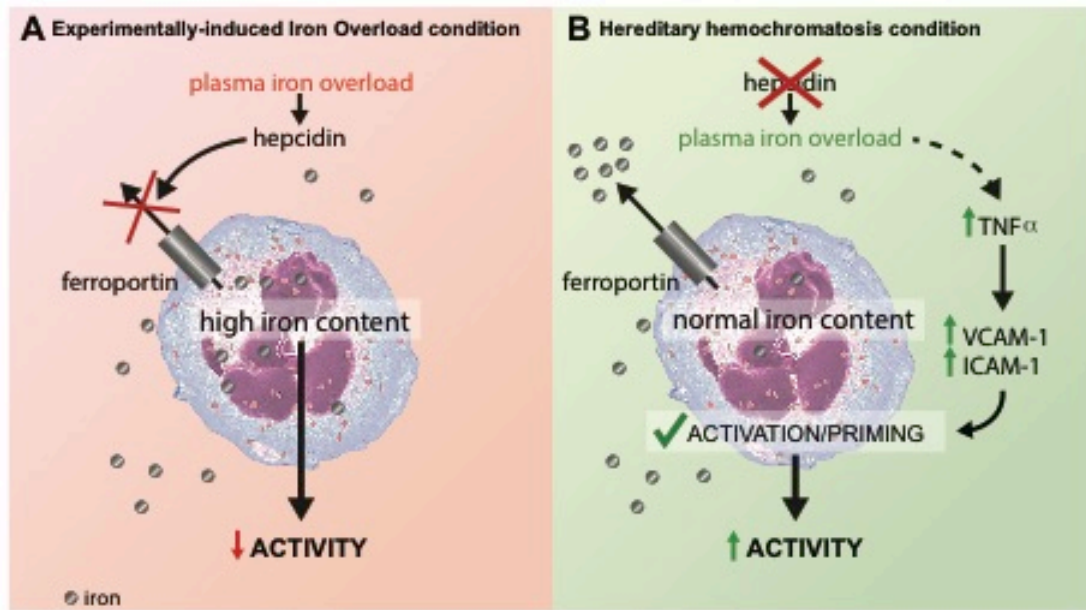
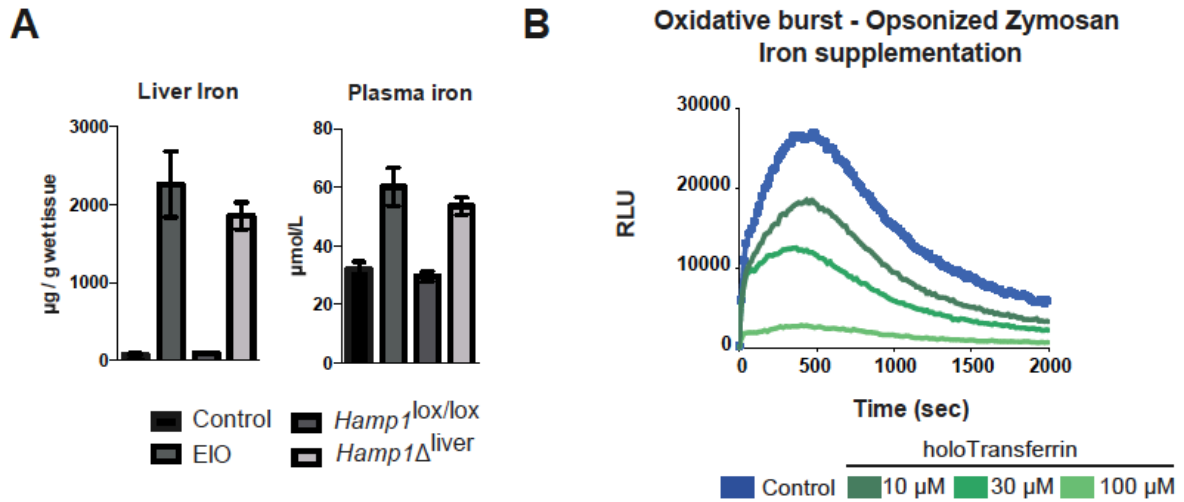


Figure 6. Presence or absence of hepcidin is a decisive element for the neutrophil function in the setting of iron overload. (A) In EIO, the systemic iron overload increases hepcidin, which blocks the iron export of the neutrophil and results in accumulation of intracellular iron. The increase in intracellular iron impairs neutrophil function. (B) In HH, the hepcidin deficiency protects neutrophils from intracellular iron overload. The systemic iron overload increases plasma TNF α , ICAM-1 and VCAM-1 levels, which may contribute to neutrophil activation.

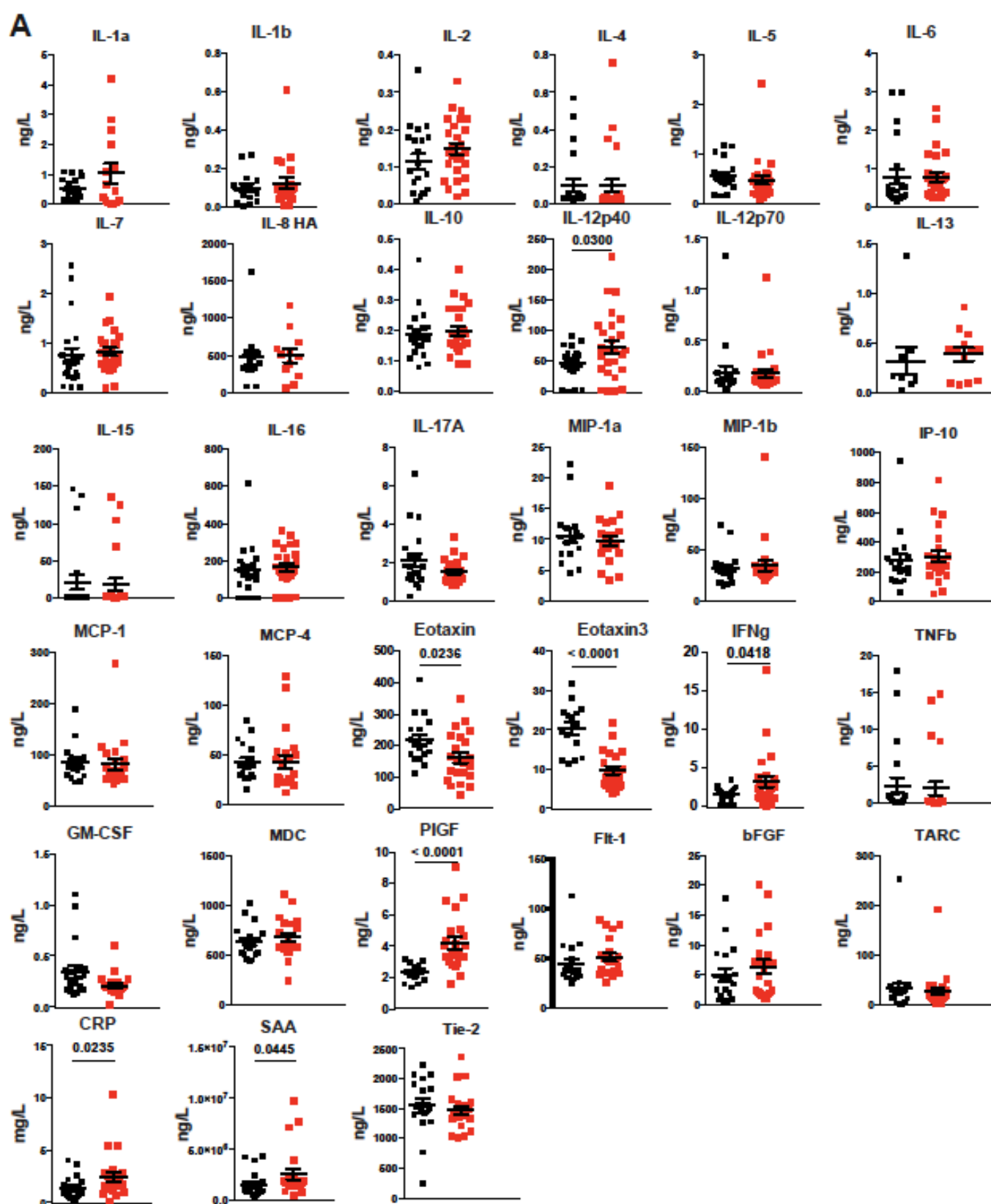
	(N)	Observed (n)	Expected (n)	SMR	CI 95%
Overall cohort (1085)		0	0.93	0	0.00 – 3.24
Sex					
Male (516)		0	0.47	0	0.00 – 6.37
Female (569)		0	0.46	0	0.00 – 6.58
Age at Diagnosis					
<35 years (284)		0	0.03	0	0.00 – 93.59
36-45 years (290)		0	0.12	0	0.00 – 26.04
46-55 years (272)		0	0.17	0	0.00 – 17.21
>55 years (239)		0	0.56	0	0.00 – 5.39
Serum ferritin at diagnosis					
<1000 µg/l (531)		0	0.42	0	0.00 – 7.1
1000-2000 µg/L (135)		0	0.17	0	0.00 – 17.83
>2000 µg/L (123)		0	0.11	0	0.00 – 26.98

Table 1 : Infection related death Standardized Mortality Ratios according to clinical and biological characteristics of patients.

Données supplémentaires - Blood 2019 en révision



Supplemental figure 1. (A) Quantification of liver iron content and plasma iron in EIO vs control and *Hamp1*^{Δliver} vs *Hamp1*^{lox/lox} mice. N=3 per group. (B) Representative experiment of the effect of iron supplementation for 2 hours on the oxidative burst response to OZ, using holo-transferrin at 10, 30 or 100 µM.



Supplemental figure 2. (A) Panel of cytokines, chemokines and circulating factors detected in plasma of HH patients (red square) versus healthy donors (black dot). The normality of each data batch was assessed to determine the appropriate statistic test. All the results have been tested with a unpaired Mann-Whitney test except for MDC and IL-2 evaluated by unpaired t test. Healthy donors n=18; HH patients n=23.

7. Discussion et conclusions

La première partie de ma thèse a permis de caractériser pour la première fois les protéines majoritairement impliquées dans l'homéostasie du fer dans la population immunitaire la plus fréquente dans le sang et formant une des premières lignes de réponse à l'infection mais aussi à l'inflammation des tissus. Nous avons démontré que les différentes protéines d'importation (TfR1), d'exportation (ferroportine), ou de stockage (ferritine H) du fer sont exprimées par les neutrophiles et qu'elles jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du fer intracellulaire du neutrophile. Ce maintien du fer intracellulaire dans des concentrations optimales est essentiel au bon fonctionnement du neutrophile et des dérégulations impactent avec sévérité aussi bien la capacité de phagocytose que la réponse oxydative des neutrophiles. De plus, l'hepcidine est un acteur clé dans ce maintien de l'homéostasie et en condition de surcharge en fer, l'absence de production d'hepcidine protège le neutrophile d'une surcharge en fer délétère. Ceci suggère une amélioration de la robustesse des neutrophiles chez les patients HH suggérant une meilleure réponse face à certaines infections comme souligné par l'absence d'augmentation de la mortalité dans la cohorte étudiée par la Professeur Bardou-Jacquet. De plus, la signature inflammatoire observée chez les patients HH ne présente pas une signature d'inflammation de bas grade classique. Nous observons une augmentation du $TNF\alpha$ et de l' $IFN\gamma$ mais aussi d'ICAM-1 et VCAM-1 mais aucune augmentation de l'IL-6 ou de l'IL-1 β par exemple qui aurait pu suggérer une inflammation de bas grade. Cette signature particulière est de plus confirmée par une autre étude publiée en 2010 (Norris et al., 2010). Si ce phénotype d'hyperactivation du neutrophile peut rappeler les neutrophiles primés retrouvés chez les personnes âgées, nous ne retrouvons pas de diminution du burst oxydatif, critère classique associé au vieillissement (Sauce et al., 2017). Au contraire, nous observons une augmentation de ce burst oxydatif pouvant expliquer la propension des patients HH à développer des arthrites rhumatoïdes, dont les composantes majeurs sont un dépôt de fer des les articulations

associée à une infiltration excessive de neutrophiles hyperactivés (Cascão et al., 2010; Wipke and Allen, 2001). Ces dommages collatéraux dus à l'état d'hyperactivation des neutrophiles de patients HH peut notamment expliquer certains aspects des problèmes cardiovasculaires que rencontrent ces patients. En effet, ces patients développent fréquemment des atteintes cardiaques souvent associées à un dépôt de fer dans le myocarde favorisant les infarctus. Si cet aspect a été bien souvent décrit (Gulati et al., 2014), l'implication des neutrophiles dans la réparation tissulaire post infarctus est une composante essentielle à la bonne récupération du patient mais une infiltration importante de neutrophiles hyperactifs est délétère dans un contexte de régénération tissulaire post infarctus (Liu et al., 2018). Les atteintes cardiovasculaires des patients atteints d'hémoglobinopathies sont fréquentes. On observe fréquemment des crises vaso-occlusives liées à une propension accrue à former des caillots sanguins. Les éléments causals de ces caillots sont une accumulation de plaquettes et de neutrophiles hyperactivés associés à une déformabilité réduite des globules rouges (Manwani and Frenette, 2013). Cependant, on s'attend à ce que l'hyperactivation des neutrophiles retrouvée chez les patients HH induise des problèmes vaso-occlusifs chez ces patients ? Or, ce n'est pas le cas. Pourquoi ? Il est possible que ce terrain favorable à la vaso-occlusion soit effectivement présent chez les patients HH mais qu'en l'absence de défaut des globules rouges, l'augmentation du risque de vaso-occlusion n'est pas significative.

La poursuite de cette réflexion nous conduit à se demander quel peut-être l'effet d'une augmentation de l'expression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation. Est-ce qu'un mécanisme d'augmentation ponctuel de l'activité des neutrophiles peut se mettre en place en condition d'inflammation via une augmentation légère du fer intracellulaire des neutrophiles ?

Ces réflexions ne sont bien sûr que spéculatives à ce jour et il serait essentiel d'évaluer de manière plus approfondie les conséquences de l'hyperactivation des neutrophiles,

notamment dans la réponse à l'infection chez des patients HH avant et au cours de leur prise en charge thérapeutique, afin d'évaluer l'importance des saignées sur la fonction des neutrophiles. En effet, il est possible que les niveaux de fer que présentent les patients HH lors de leur prise en charge thérapeutique n'atteignent pas les niveaux excessifs que pouvaient atteindre ces mêmes patients avant la découverte des différentes mutations impliquées dans ces pathologies. L'identification a permis une prise en charge plus précoce de ces patients limitant ainsi la surcharge en fer : ces patients sont surchargés mais les niveaux de fer sont peut-être compris dans un champ "acceptable" pour le corps. De plus, les mutations génétiques associées à l'HH semble avoir été sélectionnées positivement au cours de l'évolution lors de changements nutritionnels majeurs au Néolithique. Les populations de cette époque ont modifié drastiquement leur mode de vie, passant de chasseurs cueilleurs à la diète riche en apport en fer animal à des populations de fermiers sédentaires à l'alimentation riche en céréales pauvres en fer biodisponible (Heath et al., 2016). Ceci pourrait expliquer l'avantage de l'apparition d'une mutation induisant un apport en fer plus important pour le corps, en regard notamment à l'importance du fer sur la fertilité et la libido. Cependant, si ces mutations génétiques ont pu trouver un avantage certain pendant cette modification de l'alimentation, il est difficile d'expliquer pourquoi ces mutations sont encore aujourd'hui, près de 9000 ans plus tard, toujours aussi fréquemment retrouvées dans la population. Nous proposons que l'hyperactivation des neutrophiles de patients HH puisse être vue comme une adaptation avantageuse pour limiter les risques d'une surcharge en fer importante chez les patients atteints. De plus, l'accumulation du fer est progressive dans ces pathologies et les premiers symptômes apparaissent après 35 ans. Au vue de l'allongement drastique de l'espérance de vie notamment dans les populations Occidentales, il est possible que cet avantage ait été présent de façon silencieuse pendant plusieurs milliers d'années et qu'il se soit perdu lors de cet essor de l'espérance de vie, avec le dépassement des niveaux de fer élevés mais "acceptables" vers des niveaux de fer excessifs associés aux défaillances du corps bien connues dans

l'hémochromatose génétique. Aujourd'hui, la prise en charge thérapeutique nouvellement précoce de ces patients permet de limiter l'accumulation excessive de fer chez les patients HH et permettrait donc à cet avantage adaptatif de s'exprimer.

Cette étude soulève à nouveau des questions quant à l'utilisation des poches de sang fréquemment prélevé aux patients HH pour des transfusions sanguines. Longtemps controversé, le don du sang est possible pour certains patients hémochromatosiques depuis 2009. Compte tenu des nouvelles informations apportées par cette étude quant aux effets d'un apport en fer important et d'une possibilité d'augmentation de l'hepcidine associée au transfert de facteur d'inflammation, il serait important d'évaluer les conséquences de la transfusion sanguine de patients HH sur l'homéostasie du fer des neutrophiles et leur fonctions associées.

Parallèlement, compte tenu du rôle de l'hepcidine circulante sur l'homéostasie du fer du neutrophile et ses conséquences néfastes en condition de surcharge en fer, il convient de réévaluer l'utilisation d'agonistes de l'hepcidine comme alternative à la saignée thérapeutique. En effet, l'utilisation d'agoniste pourrait entraîner une séquestration du fer dans les neutrophiles et ainsi contribuer à la diminution des défenses immunitaires des patients.

Deuxième partie : projet secondaire – Etude du rôle de
l'axe hepcidine-fer dans l'immunité intestinale en
conditions de maladies inflammatoires chroniques de
l'intestin (MICIs)

*“Nous pourrions bien nous apercevoir un jour que les aliments en conserve sont des armes
bien plus meurtrières que les mitrailleuses.”*

George Orwell

1. Contexte de l'étude

1.1. Les MICIs

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICIs regroupent principalement deux types de pathologies : la maladie de Crohn et la rectocolite ulcéreuse hémorragique. Elles se caractérisent toute deux par une inflammation sévère de la paroi intestinale, une hyperactivité du système immunitaire digestif et des dérèglements de la composition du microbiote. Les MICIs sont pour la majorité diagnostiquées entre 20 et entre 30 ans avec un fort taux d'apparition des MICIs dans les pays industrialisés (principalement Europe du Nord et Etats-Unis). Ces 5 dernières années en France, on dénombre 5 nouveaux cas de maladies de Crohn et 5 nouveaux cas de rectocolites ulcéreuse hémorragiques pour 100 000 habitants. Si cette prévalence est assez stable en France, de nombreux pays du Maghreb ou d'Asie assistent à une explosion de l'apparition de nouveaux cas de MICIs. Les patients atteints de MICIs souffrent d'importantes douleurs abdominales, de diarrhées pouvant être hémorragiques et s'associant parfois au développement de fissure, d'abcès ou de fistule anale avec un rétrécissement de la partie de l'intestin atteinte. De plus, les patients atteints de MICIs présentent un risque de développement de cancer colorectal accru de 2 à 2,5 fois au cours de 10 ans d'évolution de la maladie par rapport à la population générale (Söderlund et al., 2010) (Söderlund et al., 2010). Ces pathologies sont extrêmement douloureuses pour les patients atteints et il n'existe aujourd'hui aucun traitement disponible pour traiter les causes. La prise en charge thérapeutique actuelle vise les symptômes, en calmant la douleur, en réduisant l'inflammation, contrôlant les poussées de fièvre, réduisant la fatigue et facilitant la prise alimentaire. On retrouve fréquemment l'utilisation de dérivés aminosalicylés (5-ASA) pour leur action anti-inflammatoire locale et directe sur les muqueuses intestinales dans le cadre de poussées modérées mais qui ne calment que difficilement les poussées sévères et ne préviennent que très modestement

les rechutes. Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont désormais peu utilisés à cause de leurs effets secondaires à long terme tout comme la chirurgie avec exérèse du segment intestinal le plus atteint, principalement employées dans le but de prévenir des complications mais souvent impossible du fait de l'absence de localisation bien définie de la zone atteinte. Plus récemment, des traitements par immunothérapie ont fait leur apparition. On retrouve notamment des anticorps neutralisants visant le TNF α ou l'IL-23 aux effets bénéfiques sur près de 70% des patients. Le principal problème réside dans la perte de l'efficacité du traitement au bout de quelques années. Les atteintes à l'estomac ou au duodénum restent assez rares (source INSERM, par Dr Pierre Desreumaux, consultable ici <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/maladies-inflammatoires-chroniques-intestin-mici>).

Les causes des MICIs sont multiples. On retrouve une implication de tous les acteurs présents dans l'environnement intestinal. Le terrain génétique peut favoriser l'apparition des MICIs. 150 gènes sont actuellement identifiés comme prédisposant au développement des MICIs et certaines mutations du gène CARD15 multiplierait par 40 le risque de développer une maladie de Crohn. Les facteurs environnementaux comme la pollution, les microparticules, les métaux lourds ou l'alimentation sont étroitement impliqués. Le tabagisme quant à lui favorise le risque de maladie de Crohn mais protège au contraire contre la rectocolite hémorragique.

La composante du microbiote intestinal est à la une de nombreuses recherches et il est avéré qu'une altération du microbiote intestinal (dysbiose) et/ou de sa richesse sont associées à l'initiation, au maintien ainsi qu'à la sévérité de l'inflammation.

La rectocolite ulcéreuse hémorragique

La rectocolite ulcéreuse affecte les parties distales de l'intestin, principalement le colon et le rectum. Dans 30 à 50% des cas, la zone atteinte est le rectum (rectocolite distale), dans 20% le rectum et la totalité du colon (rectocolite pancolique) et dans 20 à 30% des cas la

partie proximale du colon (rectocolite intermédiaire). Elle n'affecte jamais l'intestin grêle ni l'estomac.

La maladie de Crohn

A la différence de la rectocolite ulcéreuse hémorragique, la maladie de Crohn peut affecter différents segments du tube digestif, de la bouche jusqu'à l'anus. Toutefois, si plusieurs zones peuvent être affectées en parallèle, il n'est pas obligatoire d'observer un continuum dans la zone enflammée, et certaines zones peuvent être saines entre deux zones atteintes. Les zones les plus fréquemment affectées sont dans 25% des cas l'iléon, dans 25% l'iléon et le caecum et dans 35% des cas le colon.

1.2. Le microenvironnement intestinal

Le tube digestif intestinal, mesurant près de 7 mètres chez l'adulte, est composé de plusieurs segments longitudinaux : l'intestin grêle (le duodénum, le jéjunum, l'iléon), le caecum, le colon (ascendant, transverse, descendant), le rectum (figure 27).

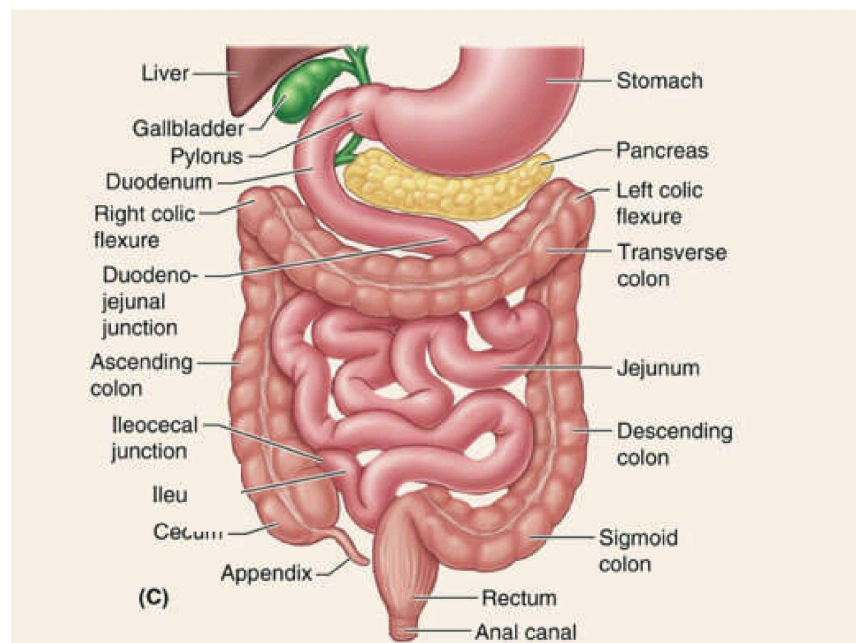


Figure 27. Morphologie de l'intestin chez l'Homme. Source : www.organsofthebody.com, consulté le 9 décembre 2019.

L'intestin grêle:

Le premier segment, le duodénum, a une fonction de digestion via un panel d'enzymes (amylases, lipases, peptidases...) provenant du pancréas via les canaux excréteurs et d'acides biliaires produits par le foie et stockés dans la vésicule biliaire. Cette étape de digestion permet la transformation des aliments pré-digérés (le chyme) en chyle, contenant fibres alimentaires, glucides complexes et nutriments. Cette transformation s'associe à une réduction de la forte acidité initiale. L'absorption des glucides, lipides, protéines, vitamines et ions débute dans ce segment de façon peu régulée et se poursuit dans les suivants : le jéjunum et l'iléon.

Le jéjunum est richement vascularisé et participe à la digestion et l'absorption des aliments et des vitamines. Il est aussi essentiel à l'absorption de l'eau et des électrolytes. Il possède aussi des fonctions sécrétoires en produisant du mucus et des immunoglobulines.

Le troisième segment terminant l'intestin grêle est l'iléon. Spécialisé dans l'absorption des vitamines et des électrolytes, la modification des sels biliaires et au contrôle du passage du bol alimentaire vers le colon via un sphincter iléo-caecal. Au final, ces trois segments composent l'intestin grêle avec un rôle de digestion et d'absorption majeur grâce à une surface d'absorption de 400m² au total optimisée par l'empilement de structures dédiées à l'absorption (microvillosités, villosités, repliements) (figure 28).

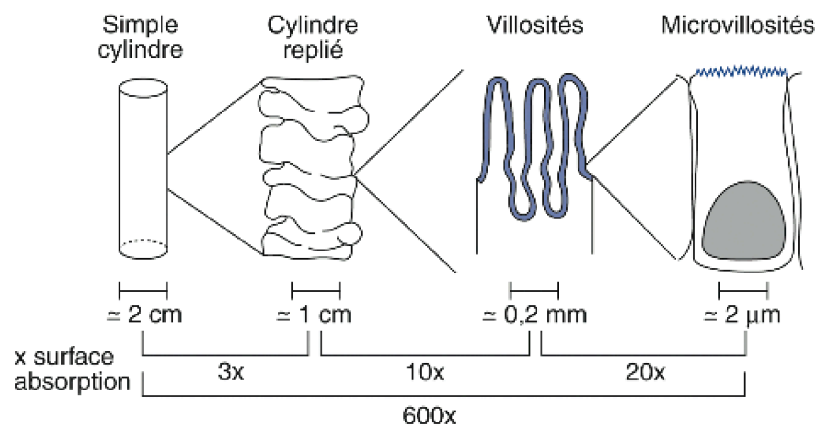


Figure 28. Surface d'absorption intestinale. L'empilement de structures de plus en plus petites multiplie par 600 la capacité totale d'absorption de l'intestin grêle. Tiré de Alder et al., 2006.

Le colon :

A l'entrée du colon se situe une petite poche appelée caecum. Cette structure semble avoir régressée chez l'Homme mais est bien conservée chez l'animal comme la souris ou le lapin dans un but d'accueil de bactéries participant à la digestion du matériel végétal par fermentation. C'est aussi cette structure qui porte l'appendice responsable des crises d'appendicite. Si le colon se distingue en trois segments par leur localisation, il peut aussi se distinguer en deux parties, proximale et distale, par rapport à leur fonction. La partie proximale a plutôt un rôle dans la digestion et l'absorption ou la réabsorption de l'eau et d'électrolytes quand la partie distale a un rôle de stockage et d'évacuation régulée des matières fécales. La digestion colique repose essentiellement sur l'intervention du microbiote. En effet, la flore intestinale du colon va permettre la fermentation de glucides comme l'amidon, le lactose, le fructose ou les polysaccharides des fibres alimentaires non absorbés par l'intestin grêle. Le microbiote participe aussi à la formation d'acides aminés, d'acides gras et de gaz en utilisant les protéines non absorbées par l'intestin grêle (figure 29). Le colon se termine par le rectum, le dernier segment du tube digestif. Cette section permet de stocker les selles avant leur évacuation par l'anus.

En considérant l'intestin de façon transversale, on observe différentes couches allant de la lumière vers l'hôte (figure 30) : la muqueuse qui comprend : le mucus, l'épithélium, le chorion (aussi appelé lamina propria) et la muqueuse musculaire; la sous-muqueuse; la couche musculuse (présentant d'abord des fibres circulaires puis longitudinales permettant le mouvement péristaltique de l'intestin); la sous-séreuse et séreuse.

Illustration : Carole Fumat

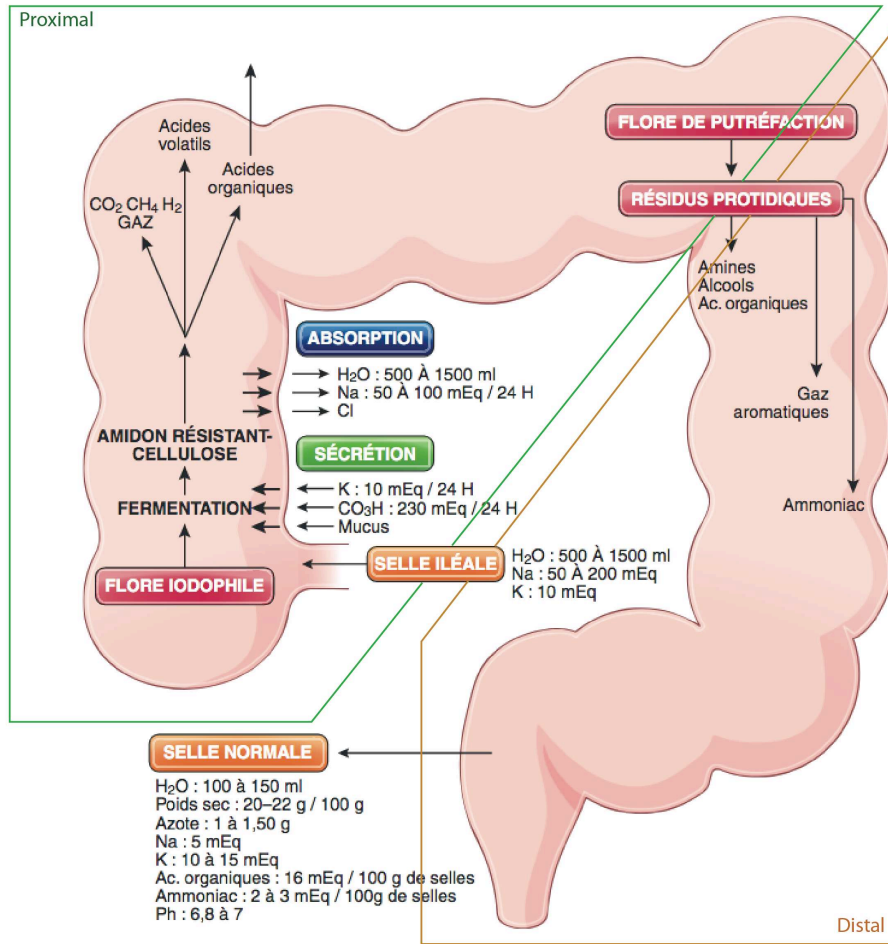


Figure 29. Composantes de la digestion colique. Le colon est séparé en deux parties : proximale à la sortie de l'iléon; et distale, côté anus. Ces deux parties ont des rôles distincts dans la fermentation, la réabsorption de l'eau et des électrolytes, la formation et enfin l'exclusion des fèces. Tiré de Les fondamentaux de la pathologie digestive, 2014.

Illustration : Carole Fumat

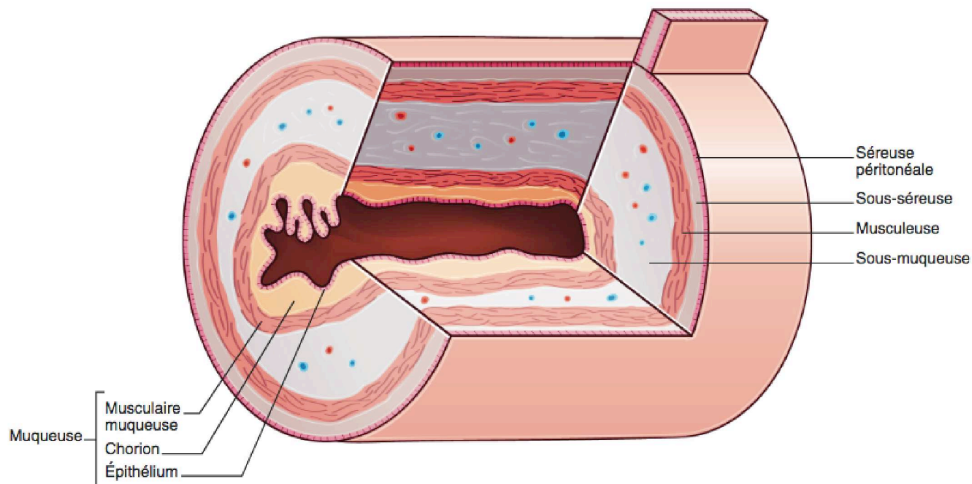


Figure 30. Modélisation de la structure de la paroi digestive chez l'Homme. Tiré de Alder et al., 2006.

1.3. Histologie de la barrière intestinale

La structure et l'histologie de la muqueuse évoluent tout au long du tractus digestif pour s'adapter aux besoins fonctionnels de chaque segment. On retrouve à la sortie de l'estomac et tout au long de l'intestin grêle un épithélium fin présentant des cryptes (appelée de Leberkühn), des villosités et des microvillosités augmentant grandement la surface d'échange et donc d'absorption des éléments nutritifs. Au contraire dans le colon, l'épithélium est épais avec présence de cryptes mais pas de villosités. L'épithélium digestif est un tissu prolifératif qui se renouvelle complètement en 3 à 5 jours dans l'intestin grêle et 4 à 6 jours pour le colon (Bonaz B., 2006). Il se renouvelle par division des cellules souches de la crypte et différenciation lors de la migration vers la lumière sous le contrôle majeur de la voie Wnt-B caténine (Flanagan et al., 2018).

L'épithélium de l'intestin grêle

Caractérisé par des cryptes contenant les cellules souches et les cellules de Paneth qui expriment les peptides antimicrobiens de type α -défensines, et les villosités contenant les cellules épithéliales en brosse pour l'absorption, les cellules de Goblet (ou caliciformes) qui sécrètent le mucus et les cellules entérochromaffines (ou entéroendocrines) sécrétant la sérotonine, la substance P et les enképhalines (figure 31).

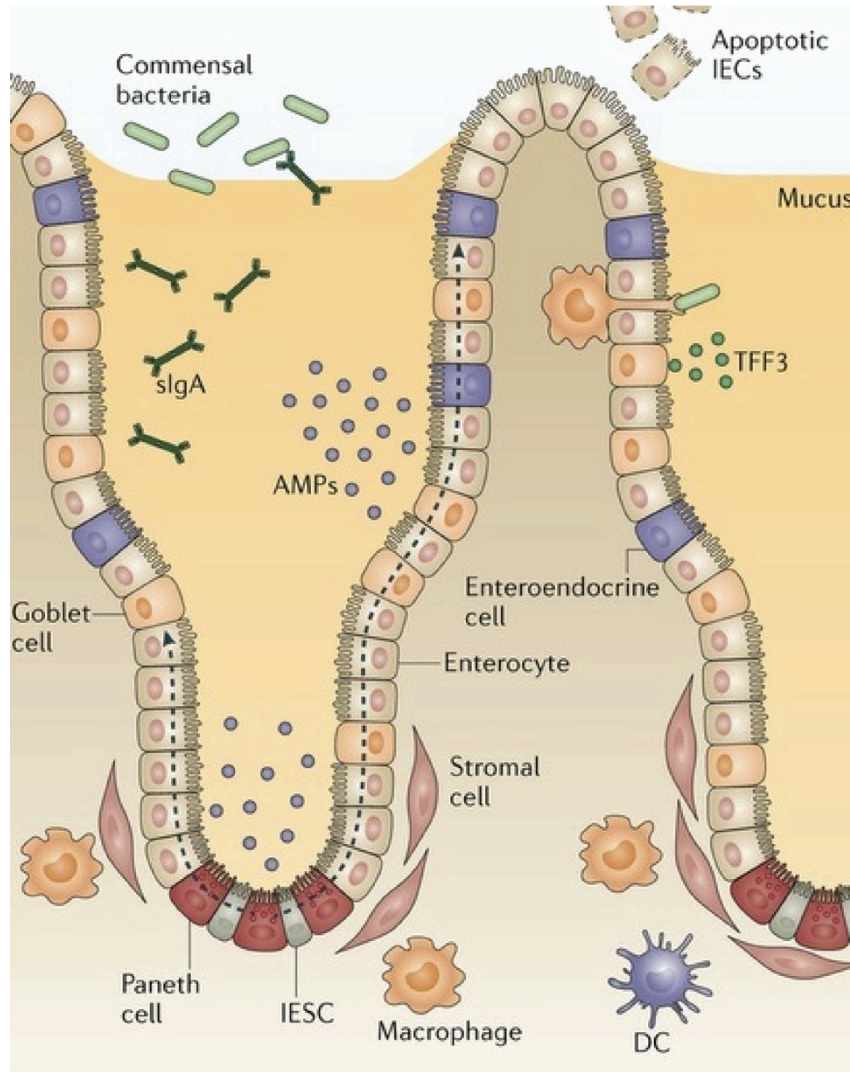


Figure 31. La barrière épithéliale du petit intestin. Les cellules épithéliales de l'intestin (IECs) forment une barrière biochimique et physique qui maintient une ségrégation entre le microbiote luminal et le système immunitaire mucosal. La niche des cellules souches épithéliales intestinales (IESC) contient des cellules épithéliales, stromales et hématopoïétique. Cette niche contrôle le renouvellement continu de la couche de cellules épithéliales. Les IECs différenciées, à l'exception des cellules de Paneth, migrent en dehors de la crypte, vers la villosité dans le sens indiqué par les flèches. Les cellules de Goblet sécrètent le mucus et les cellules de Paneth les peptides antimicrobiens (AMPs) pour garder la surface de l'épithélium stérile, en association avec la libération des IgA. Les dendrites des cellules dendritiques (DC) passent au travers de l'épithélium ce qui permet le transport d'antigènes. Tiré de Peterson et Artis, 2014.

L'épithélium du colon

Dans le colon, l'épithélium est plus épais, dépourvu de villosités. Il est composé des cellules souches intestinales au fond de la crypte, des cellules épithéliales absorbantes en brosse et des cellules de Goblet sécrétant ici deux couches de mucus, afin de préserver une zone stérile et maintenir le microbiote à distance de l'épithélium (figure 32).

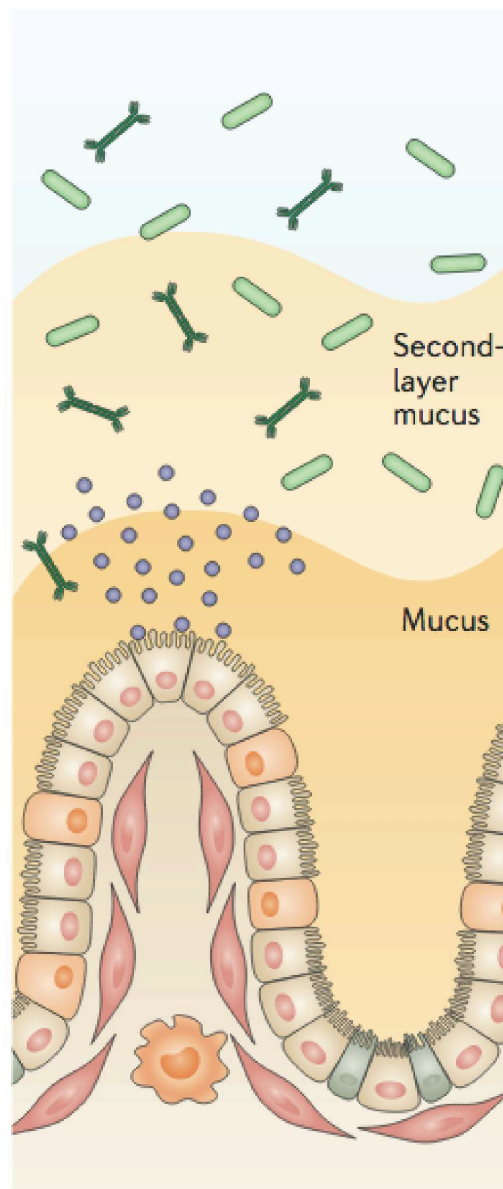


Figure 32. La barrière épithéliale du colon. Dans cette partie de l'intestin, l'épithélium est plus épais et les villosités n'existent plus, seules les cryptes résident. La présence massive de bactéries dans cette zone conduit à la production d'une seconde couche de mucus. Les cellules entéroendocrines sont absentes de cette zone de l'intestin. Tiré de Peterson et Artis, 2014.

La lamina propria

La lamina propria est un tissu conjonctif situé entre l'épithélium digestif et la couche musculieuse. Elle est richement vascularisée et comprend de nombreuses cellules immunitaires. En condition physiologique, les cellules immunitaires ont un pouvoir tolérogène évitant des réponses inflammatoires et la destruction des commensaux non nocifs pour l'hôte. Le matériel microbien antigénique peut passer au travers des cellules épithéliales, des cellules de Goblet ou via des protrusions des cellules dendritiques (DC) au travers de l'épithélium. Cette reconnaissance permet l'acquisition d'une tolérance immunitaire se traduisant par l'expression par les cellules dendritiques et les macrophages résidents de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF β ou l'IL-10 (Morelli and Thomson, 2007). Ces cellules dendritiques agissent aussi comme cellules présentatrices d'antigènes qui peuvent circuler jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires comme les nodules lymphoïdes intestinaux ou les plaques de Peyer du petit intestin pour étendre leur action aux lymphocytes. Ceci permettra d'influencer la différenciation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs (Manicassamy and Pulendran, 2011). De plus, ces DC associent à la présentation d'antigène des signaux d'inhibition, comme PD-L1 ou CD-95L, afin d'éteindre toute réponse inflammatoire de la part des lymphocytes T (Morelli and Thomson, 2007). D'autre part, dans les plaques de Peyer, la présentation d'antigènes tolérogènes aux lymphocytes B abondamment regroupés dans cette structure entraîne la production massive d'IgA, qui sont les immunoglobulines majoritaires dans l'intestin (Gutzeit et al., 2014). Ces immunoglobulines sont activement transportées au travers de l'épithélium pour être libérées dans la couche de mucus où elles seront piégées. Cette forte présence d'immunoglobulines et de peptides antimicrobiens au sein de la couche de mucus participe au maintien à distance du microbiote par la création d'un espace stérile.

En contexte inflammatoire ou infectieux, l'intégrité de la barrière intestinale peut être altérée ou rompue, entraînant le passage d'agents infectieux, la suppression de la réponse tolérogène, l'invasion de cellules immunitaires (en particulier les neutrophiles et les

macrophages) et la mise en place d'une réponse inflammatoire avec l'expression notamment d'IL-17A et F, d'IL-22, de TNF α , d'IL-1 β ou d'IFN γ et IL-12p40. Dans les MICIs, on observe une dérégulation de l'équilibre intestinal conduisant à une augmentation de l'inflammation du tissu de manière chronique résultante de dérèglements de la communication hôte-microbiote pouvant être favorisée par un terrain génétique et épigénétique particulier.

1.4. Le développement des MICIs

Lorsque cette réponse inflammatoire se déroule de manière incontrôlée, chronique ou en l'absence de danger (perte de la tolérogénicité), ceci entraîne l'altération de la barrière intestinale et la dérégulation du microbiote pouvant conduire à des infections ou favoriser l'apparition de cancers colorectaux. A l'inverse, des dérèglements du microbiote (dysbioses) peuvent favoriser des réponses inflammatoires nocives et induire des attaques chroniques de la barrière digestive. Tout ceci peut être favorisé par un contexte génétique et/ou épigénétique néfaste tel que des mutations affectant NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2) (Hugot et al., 2001), CARD9 (Caspase Recruitment Domain 9) (Lamas et al., 2016) ou l'IL23R (IL-23 récepteur) par exemple (Zeng et al., 2019) (figure 33).

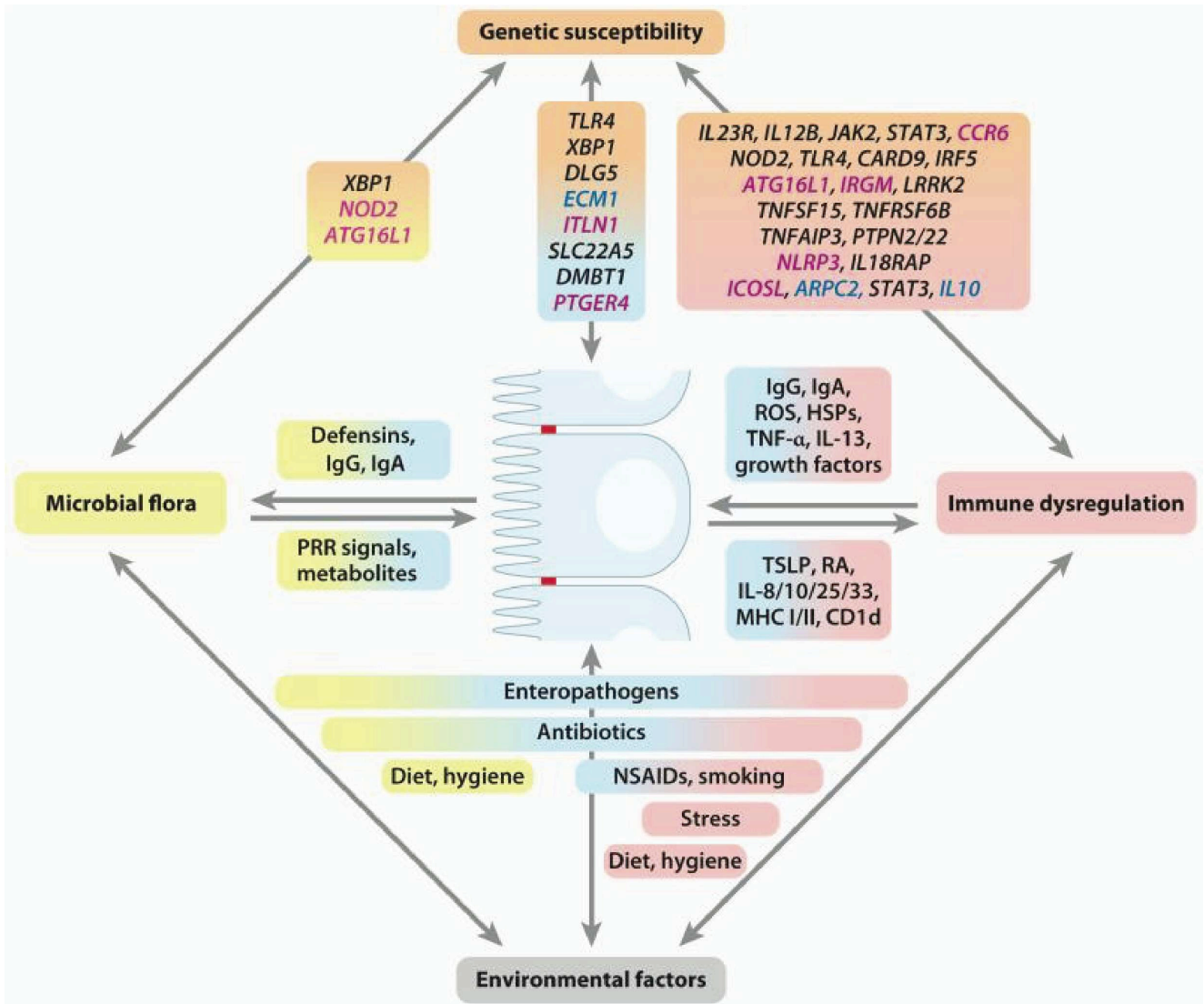


Figure 33. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des désordres multifactoriels. Le développement et l'évolution des MICI sont affectés par de nombreux facteurs qui incluent la susceptibilité génétique de l'hôte, le microbiote intestinal, les facteurs environnementaux et le système immunitaire de l'hôte. Ces facteurs s'influencent mutuellement de façon étroite. Les gènes associés aux MICI sont résumés ici. Les désordres génétiques spécifiquement associés à la maladie de Crohn sont écrits en magenta tandis que ceux spécifiques de la rectocolite ulcéreuse hémorragique sont écrits en bleu. Les gènes pouvant être associés aux deux sont écrits en noir. HSP : heat shock protein; MHC : major histocompatibility complex; NSAIDs : non-steroidal anti-inflammatory drugs; PRR : pattern-recognition receptor; RA : retinoic acid; ROS : reactive oxygen species; TSLP : thymic stromal lymphopoietin. Tiré de Kaser et al., 2010.

L'établissement de ces pathologies est donc complexe avec de nombreux partenaires et un dialogue entre l'hôte et son microbiote. Nous venons de voir que des dysfonctions chez l'hôte peuvent favoriser l'apparition et le développement des MICIs mais à l'inverse, des dérégulations du microbiote peuvent contribuer à leur apparition. En effet, l'étude et la caractérisation des composants du microbiote de personnes atteintes de maladie Crohn ou de rectocolite ulcéreuse a permis l'identification de germes plutôt associés à un contexte bénéfique ou néfaste. On retrouve notamment une perte de richesse du microbiote chez les patients atteints de MICIs associée à une augmentation de Firmicutes et Proteobacteria

		Decreased abundance	Increased abundance	Total bacterial amount	Sample origin
Human	IBD	Bacteroidetes including <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> Clostridia class of Firmicutes including <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> and butyrate-producing spp. Reduced diversity	Proteobacteria including <i>Enterobacteriaceae</i> (relative, not absolute increase) Bacilli class of Firmicutes Increase in mucosal adherent bacteria (particularly in adjacent uninfamed mucosa)	Decreased in recent 16S rRNA studies Increased in DGGE and FISH studies	Intestinal tissue
	Indeterminate colitis	Bacteroidetes	Increase in mucosal adherent bacteria		Intestinal tissue
	Obesity	Bacteroidetes (increase upon calorie restriction)	Firmicutes (decrease upon calorie restriction)		Luminal content
Mouse	DSS colitis	Bacteroidetes (twofold)	Firmicutes (twofold; includes <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> families)	Reduced (0.7-fold)	Colon tissue and luminal content
	<i>Il10^{-/-}</i>	Bacteroidetes (0.7-fold)	Firmicutes (twofold; includes <i>Lachnospiraceae</i> family) <i>Enterobacteriaceae</i> (Proteobacteria)	Unchanged	Colon tissue and luminal content
	<i>Citrobacter rodentium</i> infection	Bacteroidetes (threefold)	<i>Enterobacteriaceae</i> (Proteobacteria)	Reduced (fourfold)	Colon tissue and luminal content
	<i>ob/ob</i> mice	Bacteroidetes (0.5-fold, division-wide)	Firmicutes (division-wide)		Cecal content
	High fat diet (C57BL/6 versus <i>Relmb^{-/-}</i>)	Bacteroidetes (diet-induced, independent of obesity)	Firmicutes (Clostridia class) Proteobacteria (Deltaproteobacteria) (both diet-induced, independent of obesity)		Fecal pellets
	<i>Myd88^{-/-}</i> on NOD background	Reduced Firmicutes/ Bacteroidetes ratio	Bacteroidetes (<i>Rikenellaceae</i> and <i>Porphyromonadaceae</i> families) Firmicutes (<i>Lactobacillaceae</i>)		Cecal content

Tableau 2. Changements dans la composition du microbiote chez des patients atteints de MICIs sélectionnés et dans des modèles murins de MICIs. DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis; DSS, dextran sodium sulfate; FISH, fluorescence in situ hybridization. Tiré de Kaser et al., 2010.

ainsi qu'une diminution des Bacteroidetes (tableau 2). Il est désormais possible d'étudier l'influence du microbiote ou de certains germes spécifiquement grâce à la transplantation fécale d'un germe ou d'un microbiote complet chez des animaux dits axéniques, nés dans un milieu entièrement stérile (Lundberg et al., 2016). En parallèle, il est possible d'évaluer l'effet de substances (telles que des aliments ou des additifs alimentaires) sur la richesse, la diversité et la composition du microbiote uniquement en l'absence de l'hôte (Chassaing et al., 2017).

Le fer étant essentiel pour la croissance bactérienne, il est nécessaire de se demander quelles peuvent être les effets de la régulation du fer par l'hôte, via la sécrétion d'hepcidine, sur la composition du microbiote. En effet, récemment, des interconnexions étroites entre fer de l'hôte et microbiote ont été mise en évidence, avec une modulation de l'absorption du fer de l'hôte par les métabolites microbiens via le régulateur HIF-2 α (Das et al., 2020).

2. Résumé de l'étude sur le rôle de l'hepcidine exprimée par les cellules dendritiques intestinales

Ma contribution dans ce projet a été de réaliser l'évaluation de l'importance de l'hepcidine hépatique dans la résolution de l'inflammation post-DSS, grâce à notre modèle murin délété spécifiquement dans le foie (présenté en figure 1 et nommé par la suite hepcidin ^{Δ liver}). J'ai de plus réalisé les analyses d'expressions d'hepcidine (figure 2E) (ainsi que des marqueurs de macrophages DEC205, CD88 et CD68, et de cellules dendritiques CD11c et CCR7), sur banque d'ADNc humains issus de patients atteints de Crohn et de rectocolite ulcéreuse en comparaison avec leur contrôle sain. Ces données ont ensuite été utilisées pour réaliser les corrélations avec l'expression de l'hepcidine présentées en figure S3.

Les maladies inflammatoires de l'intestin, les cancers colorectaux ainsi que les infections gastro-intestinales induisent une inflammation des tissus gastriques et des dommages

conduisant à des problèmes d'absorption, des douleurs, des diarrhées et des saignements. Les pertes sanguines peuvent conduire à une anémie chez les patients atteints nécessitant des suppléments en fer souvent inefficaces. Les saignements entraînent de plus une augmentation du fer dans la lumière intestinale dont les conséquences sur la composition du microbiote restent à ce jour non élucidées. Afin d'apporter des éclaircissements sur le rôle du fer et de son régulateur majeur, l'hepcidine, dans la régulation de l'inflammation intestinale, nous avons étudié en collaboration avec l'équipe de Gregory Sonnenberg, la contribution de plusieurs sources d'hepcidine dans ces pathologies. Nous avons donc soumis des animaux contrôles ou complètement invalidés pour l'hepcidine dans tous les tissus à un traitement chimique (le Dextran Sodium Sulfate) induisant des dommages intestinaux importants et avons observé une aggravation du phénotype chez les animaux KO, soulignant une contribution bénéfique de l'hepcidine dans la réparation tissulaire post-dommage. Nous avons ensuite écarté le rôle de l'hepcidine hépatique et de la charge martiale systémique dans la régénération tissulaire post-DSS grâce à notre modèle murin de KO spécifique du foie. L'expression de l'hepcidine intestinale étant augmentée chez les patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite ulcéreuse, nous avons souhaité identifier les populations cellulaires pouvant contribuer à cette expression et caractériser leur rôle. Nous avons identifié les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2) comme source principale de production de l'hepcidine dans la lamina propria colonique. Ces cellules répondent aux stimulations par des agents bactériens en augmentant l'hepcidine de manière TLR dépendante. Nous avons donc généré deux modèles où le gène de l'hepcidine est invalidé spécifiquement dans les cellules dendritiques grâce à l'utilisation d'une Cre recombinase sous le contrôle du promoteur CD11c (spécifique des DC, de certains macrophages et certains lymphocytes T) ou du promoteur Zbtb46 (spécifique des DCs). Nous avons pu mettre en évidence une inflammation accrue et un défaut de régénération tissulaire en réponse au DSS chez les animaux délétés pour l'hepcidine dans les DC. Si l'hepcidine exprimée par les cellules dendritiques ne semble

pas agir de façon autocrine, nous avons identifié qu'elle agissait sur les phagocytes coloniques environnants permettant une séquestration du fer en réponse au DSS. En effet, l'utilisation d'un modèle murin Knock In pour une forme de la FPN résistante à l'hepcidine spécifiquement dans les cellules myéloïdes nous a permis de mettre en évidence l'importance de l'axe hepcidine-FPN dans les phagocytes du colon en réponse au DSS. La séquestration du fer semble associée à une meilleure récupération et régénération, notamment grâce à une modulation du microbiote intestinal avec un enrichissement de bactéries bénéfiques pour le maintien de l'intégrité intestinale, comme les *Bifidobacterium*. Cette étude apporte un nouveau rôle local de l'axe hepcidine-FPN dans la régulation de l'inflammation intestinale et la modulation du microbiote alertant sur le besoin de considérer les saignements et donc les niveaux de fer dans le lumen, et leurs conséquences sur l'évolution de la maladie.

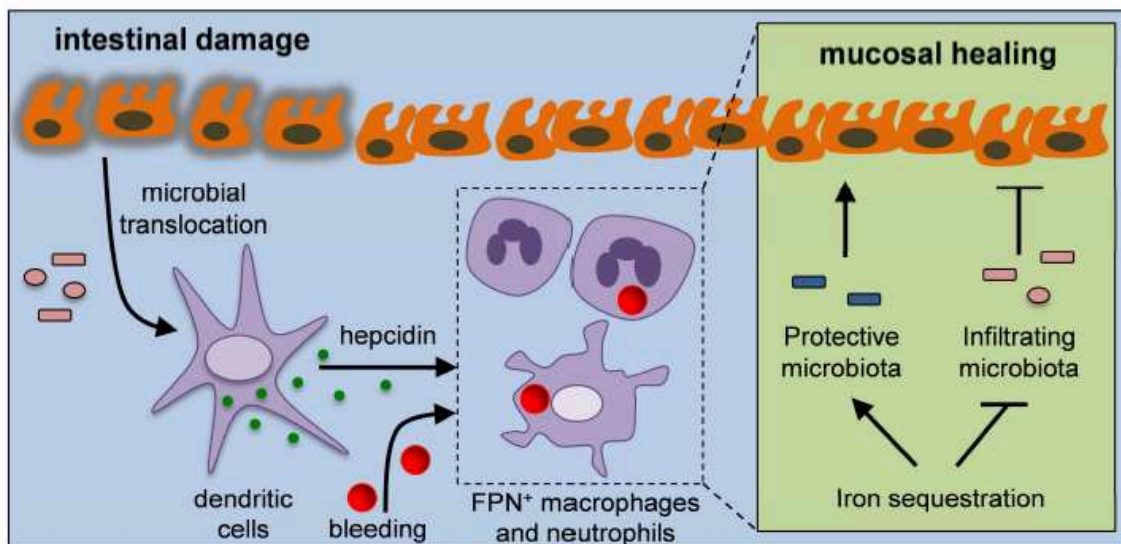


Figure 34. Résumé graphique de l'étude : l'hepcidine exprimée par les cellules dendritiques (DC) séquestre le fer du microbiote pour promouvoir la régénération muqueuse. Nous avons mécaniquement défini une nouvelle voie de régénération de la muqueuse de l'intestin des mammifères. En bref, les saignements et la modification du microbiote résultants de dommages intestinaux active la production d'hepcidine par les DC. L'hepcidine exprimée par les DC cible la ferroportine exprimée par les macrophages et les neutrophiles du gros intestin afin de bloquer le relargage du fer intracellulaire favorisant la colonisation par des bactéries protectrices de la muqueuse telles que les *Bifidobacteria*. De plus, cette séquestration limite la colonisation des microbes infiltrant le tissu à la suite des dommages intestinaux, facilitant ainsi une régénération optimale de la muqueuse intestinale.

3. Publication – Science 2019 – en révision

Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to promote mucosal healing

Nicholas J. Bessman, Jacques R.R. Mathieu, Cyril Renassia*, Lei Zhou, Thomas C. Fung, Keith C. Fernandez, Christine Austin, Jesper B. Moeller, Sara Zumerle, Sabine Louis, Sophie Vaultont, Nadim J. Ajami, Harry Sokol, Gregory G. Putzel, Tara Arvedson, Robbyn E. Sockolow, Samira Lakhali-Littleon, Suzanne M. Cloonan, Manish Arora, Carole Peyssonnaud**, Gregory F. Sonnenberg***

1 **Title: Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to**
2 **promote mucosal healing**

3

4 **Authors:** Nicholas J. Bessman^{1,2,3}, Jacques R.R. Mathieu^{4,5,*}, Cyril Renassia^{4,5,*}, Lei Zhou^{1,2,3},
5 Thomas C. Fung^{1,2,3}, Keith C. Fernandez^{1,2,3}, Christine Austin⁶, Jesper B. Moeller^{1,2,3}, Sara
6 Zumerle^{4,5}, Sabine Louis^{4,5}, Sophie Vaulont^{4,5}, Nadim J. Ajami⁷, Harry Sokol⁸, Gregory G.
7 Putzel¹, Tara Arvedson⁹, Robbyn E. Sockolow¹⁰, Samira Lakhal-Littleon¹¹, Suzanne M.
8 Cloonan¹², Manish Arora⁶, Carole Peyssonnaud^{4,5,**}, Gregory F. Sonnenberg^{1,2,3,**}

9 **Affiliations:**

10 ¹Jill Roberts Institute for Research in Inflammatory Bowel Disease, Weill Cornell Medicine,
11 Cornell University, New York, NY USA

12 ²Joan and Sanford I. Weill Department of Medicine, Division of Gastroenterology and
13 Hepatology, Weill Cornell Medicine, Cornell University, New York, NY USA

14 ³Department of Microbiology and Immunology, Weill Cornell Medicine, Cornell University,
15 New York, NY USA

16 ⁴Université de Paris, INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, 75014, Paris, France

17 ⁵Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France

18 ⁶Department of Environmental Medicine and Public Health, Icahn School of Medicine at Mount
19 Sinai, New York, NY 10029, United States.

20 ⁷Alkek Center for Metagenomics and Microbiome Research, Department of Molecular Virology
21 and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, TX USA

22 ⁸Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Saint
23 Antoine, Service de Gastroenterologie, F-75012 Paris, France

24 ⁹Department of Oncology Research, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA United States

25 ¹⁰Department of Pediatrics, Division of Gastroenterology and Nutrition, Weill Cornell Medicine,
26 Cornell University, New York, NY, USA

27 ¹¹Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, OX1 3PT Oxford,
28 United Kingdom

29 ¹²Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Weill Cornell Medicine, Cornell
30 University, New York, NY USA

31 *These authors contributed equally

32 **Correspondence to: gfsonnenberg@med.cornell.edu and carole.peyssonnaud@inserm.fr

33

1 **Abstract:** Bleeding and altered iron distribution occur in multiple gastrointestinal diseases, but
2 the significance or regulation of these changes remains unclear. Here we report that hepcidin, the
3 master regulator of systemic iron homeostasis, is required for tissue repair in the intestine
4 following experimental damage. This effect was independent of hepatocyte-derived hepcidin or
5 systemic iron levels. Rather, we identified that conventional dendritic cells (DCs) are a source of
6 hepcidin that is induced by microbial stimulation, prominent in the inflamed intestine of humans,
7 and essential for tissue repair. Mechanistically, DC-derived hepcidin acted on ferroportin-
8 expressing phagocytes to promote local iron sequestration, which regulated the microbiota and
9 subsequently facilitated intestinal repair. Collectively, these results identify a novel pathway
10 whereby DC-derived hepcidin promotes mucosal healing in the intestine via nutritional
11 immunity.

12

13 **One Sentence Summary:** Dendritic cells produce an iron-regulatory factor that modulates the
14 intestinal microbiota to promote mucosal healing.

15

1 **Main Text:** Inflammatory bowel disease (IBD), colorectal cancer and gastrointestinal infections
2 result in tissue inflammation and damage that drives bleeding, malabsorption, pain, and diarrhea
3 (1-3). As a result of blood loss or poor absorption of dietary iron, many of these patients suffer
4 from anemia that is difficult to treat with oral or injectable iron supplements (4, 5). Further,
5 bleeding introduces a major new source of iron to the intestine, but the consequences and
6 regulation of this iron influx remain unclear. Accordingly, novel therapies that limit
7 inflammation, support mucosal healing, and normalize iron homeostasis are urgently needed.

8

9 Hepcidin (encoded by the *Hamp* gene) is the master regulator of systemic iron homeostasis in
10 mammals (6-8). This peptide hormone is produced by hepatocytes in the liver, enters the
11 circulation, and functions by causing the degradation of ferroportin (9). Ferroportin is the
12 exclusive iron efflux transporter in mammals, and its expression on red pulp macrophages and
13 the basolateral surface of duodenal enterocytes is required for iron recycling from senescent red
14 blood cells and import of dietary iron, respectively (10). Hepatocyte-derived hepcidin is also an
15 acute phase protein that can be induced by pro-inflammatory cytokines (9, 11). Consistent with
16 this, systemic hepcidin levels are dysregulated in multiple gastrointestinal diseases (12-15) and
17 hepcidin antagonism has emerged as a potential therapeutic strategy for inflammation-associated
18 anemia (16-20). Despite these advances, it remains unclear whether hepcidin directly influences
19 health or disease in the intestine. To address this, we exposed wild-type (hepcidin^{+/+}) control
20 mice and co-housed hepcidin-deficient (hepcidin^{-/-}) mice to an experimental model of intestinal
21 tissue damage, inflammation and repair by administering dextran sodium sulfate (DSS) in the
22 drinking water. During DSS administration, both hepcidin^{+/+} and hepcidin^{-/-} mice exhibited
23 similar weight loss (Fig. 1A), indicative of comparable inflammation and tissue damage. In

1 contrast, upon removal of DSS, hepcidin^{-/-} mice exhibited persistent weight loss (Fig. 1A),
2 continued disruption of epithelial crypt architecture (Fig. 1B), and significantly reduced colon
3 lengths (Fig. 1C) relative to control mice, demonstrating a substantial impairment in mucosal
4 healing.

5

6 To mechanistically explore how hepcidin facilitates mucosal healing in the intestine, we
7 examined the liver of DSS-exposed C57BL/6 mice compared to naïve controls and surprisingly
8 observed a significant reduction in hepcidin expression (Fig. 1D), as well as significant
9 reductions in hepcidin protein in systemic sites such as the serum and spleen of DSS-exposed
10 mice (Fig. 1E). These data are consistent with negative feedback of hepcidin expression due to
11 anemia and erythropoiesis (21-23), but they challenge the notion that hepatocytes are the most
12 likely source of hepcidin that critically facilitates mucosal healing. To directly test this, we bred
13 mice with a floxed *Hamp* gene (hepcidin^{F/F}) to mice expressing Cre recombinase under the
14 control of the albumin promoter to generate hepcidin^{Aliver} mice. These mice were previously
15 found to develop progressive systemic iron overload that is comparable to hepcidin deficient
16 mice (24). Following exposure to DSS, littermate controls and hepcidin^{Aliver} mice exhibited
17 comparable body weights, recovery of normal tissue architecture, and colon lengths (Fig. 1F-H),
18 demonstrating that liver-derived hepcidin is not required for intestinal healing after DSS.
19 Together, these data suggested that an extra-hepatic source of hepcidin may mediate mucosal
20 healing in the gut.

21

22 To interrogate the cellular source(s) of hepcidin that promote mucosal healing, we analyzed local
23 hepcidin expression by qPCR in the mesenteric lymph node (mLN) and colon of naïve C57BL/6

1 mice (Fig. S1A), with a significant enrichment within the lamina propria fraction of the colon
2 (Fig. 2A). Hepcidin expression in mLN and colon were not downregulated upon administration
3 of DSS (Fig. S1B). Previous *in vitro* studies have suggested that macrophages produce hepcidin
4 (25, 26), and therefore we profiled hepcidin expression in sort-purified myeloid cells from the
5 colon of DSS-treated mice. Surprisingly, we found that type 2 conventional DCs (cDC2s), and
6 not macrophages or type 1 conventional DCs (cDC1s), were the dominant myeloid source of
7 hepcidin in this setting (Fig. 2B,C). To define what drives DC expression of hepcidin, we
8 exposed bone marrow-derived DCs (BMDCs) to a variety of stimuli and observed that bacteria
9 and PAMPs were the most potent inducers of hepcidin expression (Fig. S2). This was observed
10 *in ex vivo* sort-purified primary cDC2s as well (Fig. 2D). To extend our findings into humans, we
11 examined intestinal biopsies by qPCR from Crohn’s disease (CD) or ulcerative colitis (UC)
12 patients and observed a significant increase in hepcidin gene expression as compared to healthy
13 controls (Fig. 2E). No correlation was observed between hepcidin RNA levels in IBD patients
14 and the macrophage-associated genes *CD68* or *CD88*, while a significant positive correlation
15 was observed with the DC-associated genes *ITGAX* and *CCR7* for UC and CD, respectively (Fig.
16 S3). To directly assess the cellular sources of hepcidin in the intestine of humans, we utilized a
17 recently described antibody for hepcidin (19) and stained ileum samples from pediatric CD
18 patients. We found that DCs were major producers of hepcidin in this setting, with some protein
19 staining in macrophages (Fig. 2F,G). Together, these data demonstrate that conventional DCs in
20 the intestine are a previously unappreciated source of hepcidin in mice and humans that is
21 induced by direct microbial stimulation.

22

1 To test the functional significance of DC-derived hepcidin *in vivo*, we developed a novel mouse
2 model of hepcidin deficiency by crossing CD11c^{cre} mice with hepcidin^{F/F} mice. Mice lacking
3 DC-derived hepcidin (hepcidin^{ΔDC} mice) exhibited normal expression of hepcidin within the
4 liver and a loss of hepcidin expression in mucosal DCs (Fig. 3A). DC development in mucosal
5 tissues remained intact in the absence of DC-derived hepcidin (Fig. 3B, S4A), and these mice did
6 not exhibit any changes in circulating systemic iron levels relative to littermate controls (Fig.
7 S4B). Additionally, innate lymphoid cell (ILC), CD4⁺ T cell, myeloid cell, and granulocyte
8 profiles were comparable in both littermate control and hepcidin^{ΔDC} mice in naïve conditions
9 (Fig. S4C,D) and following administration of DSS (Fig. S5). Global transcriptional profiling of
10 cDC1s and cDC2s from the colon of DSS-treated mice revealed enrichment for subset-specific
11 genes as expected (Fig. S6A,B), but no impact of hepcidin deficiency on the unbiased clustering
12 of DC subsets (Fig. 3C). Further, expression of cytokines, antigen presentation machinery, and
13 other immune-related genes was statistically indistinguishable by differential expression analysis
14 in cDC2s from hepcidin^{ΔDC} mice versus littermate controls (Fig. 3D, S6C), collectively
15 suggesting that DC-derived hepcidin does not impact immune responses in this context.
16 However, relative to littermate controls, hepcidin^{ΔDC} mice exhibited significantly reduced body
17 weight following removal of DSS (Fig. 3E), abnormal colonic tissue architecture (Fig. 3F), and
18 significantly increased shortening of the colon (Fig. 3G). Further, deletion of hepcidin by
19 Zbtb46^{Cre}, which selectively targets only conventional dendritic cells and not macrophages (27),
20 also resulted in significantly impaired tissue repair as compared to controls (Fig. 3H-J), revealing
21 an essential role for DC-derived hepcidin in mucosal healing.

22

1 We next profiled the colonic expression of *Slc40a1*, which encodes ferroportin and is the only
2 *bona fide* molecular target of hepcidin (28). We found high expression of ferroportin in the colon
3 epithelium, as well as sort-purified neutrophils and macrophages, but not in DCs, T cells or B
4 cells (Fig. 3K). To assess the functional significance of ferroportin on these cell types, we
5 utilized recently-developed *Fpn-C326Y^{F/F}* mice (29), in which a hepcidin-resistant ferroportin
6 variant is expressed from the endogenous locus when Cre recombinase is present (Fig. S7A). We
7 found that expression of *Fpn^{C326Y}* in DCs or intestinal epithelial cells had no impact on mucosal
8 healing (Fig. S7B-E), suggesting that these cells are not the physiologically-relevant targets of
9 hepcidin for mucosal healing. In contrast, *Fpn^{C326Y}* expression in macrophages and neutrophils
10 via *LysM-Cre* resulted in significantly reduced body weight, abnormal colonic tissue
11 architecture, and significantly increased shortening of the colon following removal of DSS,
12 relative to littermate controls (Fig. 3L-N). These data collectively demonstrate that ferroportin-
13 expressing macrophages and/or neutrophils are a critical target of hepcidin that orchestrates
14 mucosal healing.

15

16 Hepcidin binds to ferroportin to cause protein degradation and prevent extracellular iron efflux
17 (4, 9). While our studies revealed normal systemic iron homeostasis in mice lacking DC-derived
18 hepcidin, it remains possible that there could be alterations in local iron distribution. To test this
19 hypothesis, we employed quantitative mass spectrometry imaging of the intestine. Strikingly, we
20 observed a decrease in iron levels within the cecal tissue of DSS-treated hepcidin^{ADC} mice versus
21 littermate controls (Fig. 4A, S8A,B), indicating that DC-derived hepcidin promotes local tissue
22 sequestration of iron. Consistent with this, we found that non-heme iron levels are increased in
23 the luminal content of hepcidin^{ADC} mice versus littermate controls after DSS-induced damage

1 (Fig. 4B, S8C). In contrast, there was no difference in fecal iron levels in naïve mice (Fig. S8D).
2 These data establish that DC-derived hepcidin critically regulates iron distribution within the
3 intestine. Since intestinal macrophages are thought to convert heme-bound iron from tissue-
4 localized senescent erythrocytes into non-heme-bound iron via heme oxygenase 1 in DSS-treated
5 mice and IBD patients (30, 31), these data further suggest DC-derived hepcidin promotes local
6 iron sequestration within ferroportin-expressing macrophages during intestinal damage,
7 inflammation and bleeding.

8

9 Iron sequestration is a key component of nutritional immunity against bacteria (4, 32, 33).
10 Therefore, we sought to clarify whether DC-derived hepcidin modulates the intestinal
11 microbiota, which dramatically impacts multiple aspects of intestinal physiology (34-37).
12 Hepcidin^{ADC} mice exhibited a significant shift in the composition of the luminal microbiome as
13 evidenced in a beta-diversity analysis relative to littermate controls (Fig. 4C). To interrogate the
14 functional impact of these compositional changes, we performed fecal microbiota transplantation
15 (FMT) from conventional littermate control mice or hepcidin^{ADC} mice to wild-type germ free
16 (GF) recipients. Following microbiota reconstitution and DSS administration, ex-GF mice
17 receiving FMT from hepcidin^{ADC} mice exhibited significantly impaired body weight recovery
18 and increased colonic shortening relative to ex-GF mice receiving an FMT from littermate
19 controls (Fig. S9). These results demonstrate that DC-derived hepcidin promotes colonization
20 with a tissue-protective microbiota that can subsequently support mucosal healing following
21 intestinal damage. Among all the genera we analyzed via 16S sequencing, the only significant
22 differences were striking reductions in the abundance of *Catenibacteria* and *Bifidobacteria* in
23 hepcidin^{ADC} mice (Fig. S10A). Notably, *Bifidobacteria* has been shown to ameliorate ulcerative

1 colitis in patients and DSS-induced pathology in mice by supporting epithelial barrier function
2 (38-40). Further, dietary iron supplementation in human infants was recently shown to suppress
3 *Bifidobacteria* levels and exacerbate inflammation (41), suggesting that *Bifidobacteria*
4 colonization is acutely sensitive to iron levels, which we confirmed (Fig. S10B). Additionally,
5 we found that oral administration of *Bifidobacteria* can increase expression of intestinal tight
6 junction genes (Fig. S10C) and can significantly promote mucosal healing in hepcidin^{ΔDC} mice
7 (Fig. S10D,E), indicating that one function of DC-derived hepcidin is to limit iron availability
8 and subsequently promote colonization with the tissue-protective microbe *Bifidobacteria*.

9
10 We also observed that following DSS administration, hepcidin^{ΔDC} mice exhibited significantly
11 increased levels of aerobic and anaerobic microbiota associated with the intestinal tissues relative
12 to littermate control mice (Fig. 4D). Further, we found that antibiotic treatment normalized DSS
13 susceptibility for littermate control and hepcidin^{ΔDC} mice (Fig. S11). These data suggest that DC-
14 derived hepcidin sequesters iron to limit tissue colonization or invasion by the microbiota
15 following intestinal injury. To directly test this possibility we administered deferoxamine (DFO),
16 which sequesters extracellular iron from bacteria by chelation (42), to DSS-treated hepcidin^{ΔDC}
17 mice and observed a complete restoration of mucosal healing (Fig. 4E,F). These data suggest that
18 DC-derived hepcidin also functions to critically limit extracellular iron availability, thus limiting
19 bacterial growth within tissue during intestinal damage, and subsequently promoting healing.

20
21 Collectively, our findings demonstrate that DC-derived hepcidin critically modulates iron release
22 from intestinal phagocytes to control the microbiota and promote healing in the intestine. DCs
23 produced hepcidin locally in the intestine to promote local iron sequestration, in contrast to liver-

1 derived hepcidin that acts as an endocrine hormone (9). It has recently been reported that
2 hepcidin production by hepatocytes protects against infection by limiting systemic iron
3 availability to pathogens (25, 43-45). Our results outline a novel paradigm, whereby DCs
4 respond to local bacterial signals following intestinal damage by producing hepcidin. This
5 subsequently blocks iron release from intestinal phagocytes to promote colonization with a
6 tissue-protective microbiota and inhibit tissue bacterial colonization via nutritional immunity
7 (Fig. S12). Moreover, we found that local hepcidin expression is upregulated in the intestine of
8 IBD patients. These findings have important implications for efforts to develop hepcidin
9 antagonists that treat inflammation-associated anemia, suggesting that blocking hepcidin could
10 potentially lead to detrimental changes to the intestinal microbiota and impaired tissue repair. In
11 parallel, our findings also indicate that hepcidin mimetics may serve a protective role in the
12 context of FMT or gastrointestinal diseases by sequestering local iron, appropriately controlling
13 the intestinal microbiota, and promoting mucosal healing.

1 **References and Notes:**

- 2 1. M. Karin, T. Lawrence, V. Nizet, Innate immunity gone awry: linking microbial
3 infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* **124**, 823-835 (2006).
- 4 2. A. Kaser, S. Zeissig, R. S. Blumberg, Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of*
5 *Immunology* **28**, 573-621 (2010).
- 6 3. B. Khor, A. Gardet, R. J. Xavier, Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel
7 disease. *Nature* **474**, 307-317 (2011).
- 8 4. M. U. Muckenthaler, S. Rivella, M. W. Hentze, B. Galy, A Red Carpet for Iron
9 Metabolism. *Cell* **168**, 344-361 (2017).
- 10 5. G. Weiss, L. T. Goodnough, Anemia of Chronic Disease. *New England Journal of*
11 *Medicine* **352**, 1011-1023 (2005).
- 12 6. N. C. Andrews, P. J. Schmidt, Iron homeostasis. *Annual Review of Physiology*, (2007).
- 13 7. T. Ganz, E. Nemeth, Heparin and Disorders of Iron Metabolism. *Annual Review of*
14 *Medicine* **62**, 347-360 (2011).
- 15 8. E. Nemeth *et al.*, Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and
16 inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 2090-2093 (2004).
- 17 9. H. Drakesmith, E. Nemeth, T. Ganz, Ironing out Ferroportin. *Cell metabolism* **22**, 777-
18 787 (2015).
- 19 10. A. Donovan *et al.*, The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis.
20 *Cell metabolism* **1**, 191-200 (2005).
- 21 11. E. Nemeth *et al.*, Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II
22 acute-phase protein. *Blood* **101**, 2461-2463 (2003).
- 23 12. R. J. Basseri *et al.*, Heparin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's
24 disease. *Journal of Crohn's & colitis* **7**, e286-291 (2013).
- 25 13. M. Martinelli *et al.*, Serum Heparin and Iron Absorption in Paediatric Inflammatory
26 Bowel Disease. *Journal of Crohn's & colitis* **10**, 566-574 (2016).
- 27 14. D. Vela, Z. Vela-Gaxha, Differential regulation of heparin in cancer and non-cancer
28 tissues and its clinical implications. *Experimental & Molecular Medicine* **50**, e436
29 (2018).
- 30 15. T. C. Darton *et al.*, Rapidly Escalating Heparin and Associated Serum Iron Starvation
31 Are Features of the Acute Response to Typhoid Infection in Humans. *PLoS neglected*
32 *tropical diseases* **9**, e0004029 (2015).

- 1 16. E. Fung *et al.*, High-throughput screening of small molecules identifies hepcidin
2 antagonists. *Molecular pharmacology* **83**, 681-690 (2013).
- 3 17. N. Grebentchikov *et al.*, Engineered Human Lipocalin as an Antibody Mimetic:
4 Application to Analysis of the Small Peptide Hormone Hepcidin. *Clinical Chemistry* **60**,
5 897-899 (2014).
- 6 18. E. Khorramian *et al.*, In a Mouse Model of Sepsis, Hepcidin Ablation Ameliorates
7 Anemia More Effectively than Iron and Erythropoietin Treatment. *Shock (Augusta, Ga.)*
8 **48**, 490-497 (2017).
- 9 19. B. J. Sasu *et al.*, Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is
10 effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* **115**, 3616-3624
11 (2010).
- 12 20. L. T. van Eijk *et al.*, Effect of the antihepcidin Spiegelmer lexaptetid on inflammation-
13 induced decrease in serum iron in humans. *Blood* **124**, 2643-2646 (2014).
- 14 21. S. R. Pasricha, K. McHugh, H. Drakesmith, Regulation of Hepcidin by Erythropoiesis:
15 The Story So Far. *Annual review of nutrition* **36**, 417-434 (2016).
- 16 22. N. K. N. eShanmugam, E. Trebicka, L.-l. Fu, H. N. Shi, B. J. Cherayil, Intestinal
17 inflammation modulates expression of the iron regulating hormone hepcidin depending
18 on erythropoietic activity and the commensal microbiota. *Journal of immunology*
19 (*Baltimore, Md. : 1950*) **193**, 1398-1407 (2014).
- 20 23. D. M. Wrighting, N. C. Andrews, in *Current Topics in Developmental Biology*.
21 (Academic Press, 2008), vol. 82, pp. 141-167.
- 22 24. S. Zumerle *et al.*, Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the
23 hemochromatotic phenotype. *Blood* **123**, 3646-3650 (2014).
- 24 25. R. Ben-Othman *et al.*, Leishmania-Mediated Inhibition of Iron Export Promotes Parasite
25 Replication in Macrophages. *PLOS Pathogens* **10**, e1003901 (2014).
- 26 26. C. Peyssonnaud *et al.*, TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response
27 to bacterial pathogens. *Blood* **107**, 3727-3732 (2006).
- 28 27. J. Loschko *et al.*, Absence of MHC class II on cDCs results in microbial-dependent
29 intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* **213**, 517-534 (2016).
- 30 28. K. Michels, E. Nemeth, T. Ganz, B. Mehrad, Hepcidin and Host Defense against
31 Infectious Diseases. *PLOS Pathogens* **11**, e1004998 (2015).
- 32 29. S. Lakhal-Littleton *et al.*, An essential cell-autonomous role for hepcidin in cardiac iron
33 homeostasis. *eLife* **5**, (2016).

- 1 30. H. Kayama *et al.*, Heme ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis through
2 providing intestinal macrophages with noninflammatory profiles. *Proceedings of the*
3 *National Academy of Sciences* **115**, 8418 (2018).
- 4 31. V. P. Sebastián *et al.*, Heme Oxygenase-1 as a Modulator of Intestinal Inflammation
5 Development and Progression. *Frontiers in immunology* **9**, 1956 (2018).
- 6 32. C. A. Lopez, E. P. Skaar, The Impact of Dietary Transition Metals on Host-Bacterial
7 Interactions. *Cell host & microbe* **23**, 737-748 (2018).
- 8 33. H. Drakesmith, A. M. Prentice, Hepcidin and the iron-infection axis. *Science (New York,*
9 *N.Y.)* **338**, 768-772 (2012).
- 10 34. C. Huttenhower, Aleksandar D. Kostic, Ramnik J. Xavier, Inflammatory Bowel Disease
11 as a Model for Translating the Microbiome. *Immunity* **40**, 843-854.
- 12 35. Noah W. Palm *et al.*, Immunoglobulin A Coating Identifies Colitogenic Bacteria in
13 Inflammatory Bowel Disease. *Cell* **158**, 1000-1010.
- 14 36. J. L. Round, S. K. Mazmanian, The gut microbiota shapes intestinal immune responses
15 during health and disease. *Nature Reviews Immunology* **9**, 313 (2009).
- 16 37. J. L. Round, N. W. Palm, Causal effects of the microbiota on immune-mediated diseases.
17 *Science Immunology* **3**, (2018).
- 18 38. S. Guo *et al.*, Secretions of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*
19 Protect Intestinal Epithelial Barrier Function. *Journal of Pediatric Gastroenterology and*
20 *Nutrition* **64**, 404-412 (2017).
- 21 39. J. S. Frick *et al.*, Identification of Commensal Bacterial Strains That Modulate *Yersinia*
22 *enterocolitica* and Dextran Sodium Sulfate-Induced Inflammatory Responses:
23 Implications for the Development of Probiotics. *Infection and Immunity* **75**, 3490-3497
24 (2007).
- 25 40. H. Tamaki *et al.*, Efficacy of probiotic treatment with *Bifidobacterium longum* 536 for
26 induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded,
27 placebo-controlled multicenter trial. *Digestive Endoscopy* **28**, 67-74 (2016).
- 28 41. T. Jaeggi *et al.*, Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases
29 pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut* **64**, 731
30 (2015).
- 31 42. R. C. Hider, A. V. Hoffbrand, The Role of Deferiprone in Iron Chelation. *New England*
32 *Journal of Medicine* **379**, 2140-2150 (2018).
- 33 43. J. Arezes *et al.*, Hepcidin-induced hypoferremia is a critical host defense mechanism
34 against the siderophilic bacterium *Vibrio vulnificus*. *Cell host & microbe* **17**, 47-57
35 (2015).

- 1 44. K. R. Michels *et al.*, Hepcidin-mediated iron sequestration protects against bacterial
2 dissemination during pneumonia. *JCI insight* **2**, e92002 (2017).
- 3 45. D. Stefanova *et al.*, Endogenous hepcidin and its agonist mediate resistance to selected
4 infections by clearing non-transferrin-bound iron. *Blood*, (2017).
- 5 46. M. Dodt, J. T. Roehr, R. Ahmed, C. Dieterich, FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter
6 Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology* **1**, 895-905 (2012).
- 7 47. A. Dobin *et al.*, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford,*
8 *England)* **29**, 15-21 (2013).
- 9 48. Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi, featureCounts: an efficient general purpose program for
10 assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**, 923-
11 930 (2014).
- 12 49. M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for
13 RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
- 14 50. Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and
15 Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*
16 *(Methodological)* **57**, 289-300 (1995).
- 17 51. M. J. Anderson, A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.
18 *Austral Ecology* **26**, 32-46 (2001).
- 19 52. F. J. Oksanen *et al.*, *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-4. http*
20 *s.* (2017).
- 21
- 22

1 **Acknowledgments:** We thank members of the Sonnenberg Laboratory for discussions and
2 critical reading of the manuscript. **Funding:** Research in the Sonnenberg Laboratory is supported
3 by the National Institutes of Health (NIH) fellowship to NJB (F32AI124517), a Crohn’s and
4 Colitis Foundation fellowship to LZ (608975) and the following to GFS: NIH (R01AI143842,
5 R01AI123368, R01AI145989, and U01AI095608), the NIAID Mucosal Immunology Studies
6 Team (MIST), the Crohn’s and Colitis Foundation, the Searle Scholars Program, the American
7 Asthma Foundation Scholar Award, Pilot Project Funding from the Center for Advanced
8 Digestive Care (CADC), an Investigators in the Pathogenesis of Infectious Disease Award from
9 the Burroughs Wellcome Fund, a Wade F.B. Thompson/Cancer Research Institute (CRI) CLIP
10 Investigator grant, the Meyer Cancer Center Collaborative Research Initiative, and the Roberts
11 Institute for Research in IBD (JRI). G.F. Sonnenberg is a CRI Lloyd J. Old STAR. This work
12 was also supported by funding from the European Research Council under the European
13 Community’s Seventh Framework Program (FP7/2011-2015 Grant agreement no 261296), the
14 “Fondation pour la Recherche Médicale” (DEQ20160334903) the Laboratory of Excellence GR-
15 Ex, reference ANR-11-LABX-0051, funded by the program “Investissements d’avenir” of the
16 French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02. JM and SL were
17 supported by a labex GR-Ex fellowship and SZ by a fellowship from the “Fondation ARC pour
18 la recherche sur le cancer”. S.M.C. is supported by NIH grant R00-HL125899. We would like to
19 thank Kihwan Kim for technical assistance, the Epigenomics Core of Weill Cornell Medicine,
20 and all contributing members of the JRI IBD Live Cell Bank, which is supported by the JRI, Jill
21 Roberts Center for IBD, Cure for IBD, the Rosanne H. Silbermann Foundation and Weill Cornell
22 Medicine Division of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. **Author contributions:** N.J.B.
23 and G.F.S. conceived the project. N.J.B., L.Z., T.C.F., K.C.F., and J.B.M. performed mouse and

1 cell culture experiments and analyzed data. J.R.R.M., C.R. S.L. and S.Z. generated mouse
2 models, performed mouse experiments and analyzed the data. J.R.R.M. and C.R. designed some
3 experiments and analyzed the tissuescan array. S.V. provided essential material and analyzed the
4 data. H.S. performed pathological analyses. S.L-L. provided essential mouse models and
5 expertise. T.A. provided essential tools and expertise. C.P. provided mouse models, designed and
6 supervised some experiments, and analyzed the data. N.J.A. and G.G.P. analyzed RNA and 16S
7 sequencing. C.A. and M.A. performed and analyzed cecal iron imaging. R.E.S. provided
8 essential advice and guidance. S.M.C. provided crucial guidance on iron assays and performed
9 luminal iron measurements. N.J.B. and G.F.S. wrote the manuscript, with input from all the
10 authors. **Competing interests:** the authors declare no financial or competing interests **Data and**
11 **materials availability:** Microarray data are available in the Gene Expression Omnibus (GEO)
12 repository with accession ID 'XXXXXXX'. 16S rRNA sequencing data are available from the
13 authors upon request. Hepcidin-floxed mice are available from C.P. with a material transfer
14 agreement.

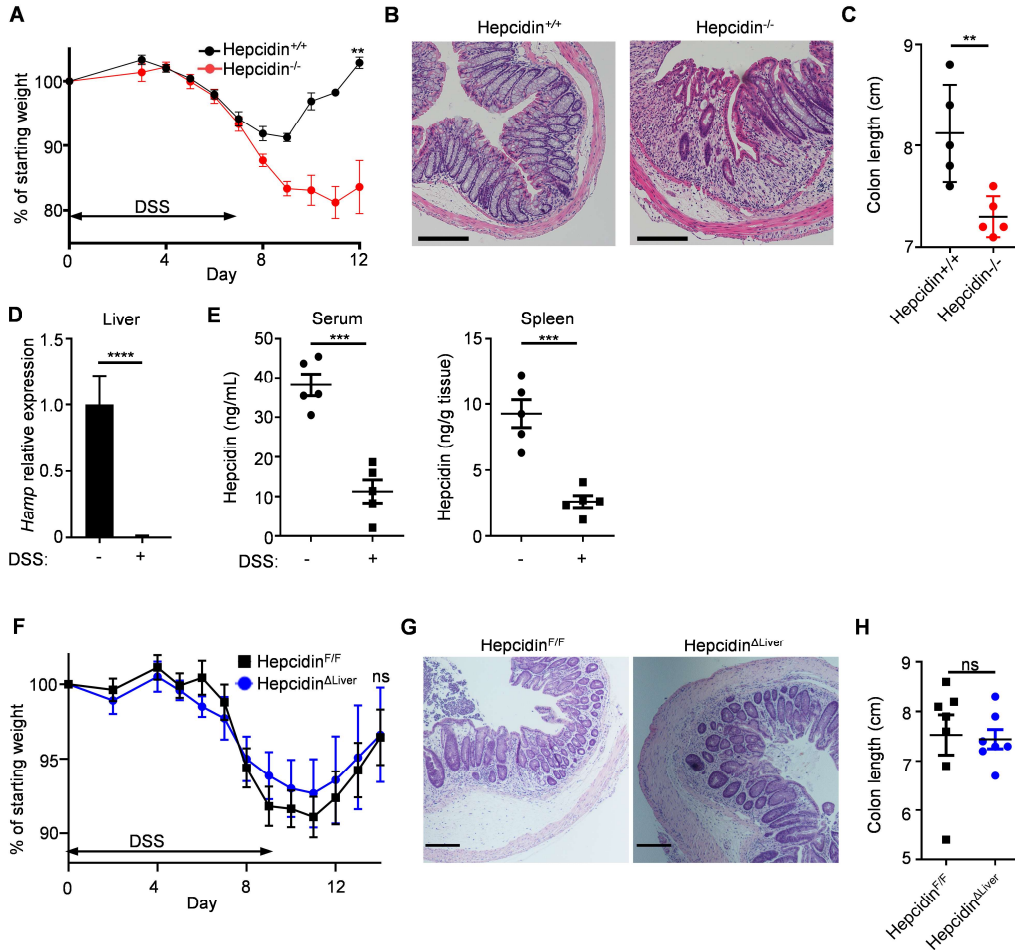
15

Supplementary Materials:

17 Materials and Methods

18 Figures S1-S12

19

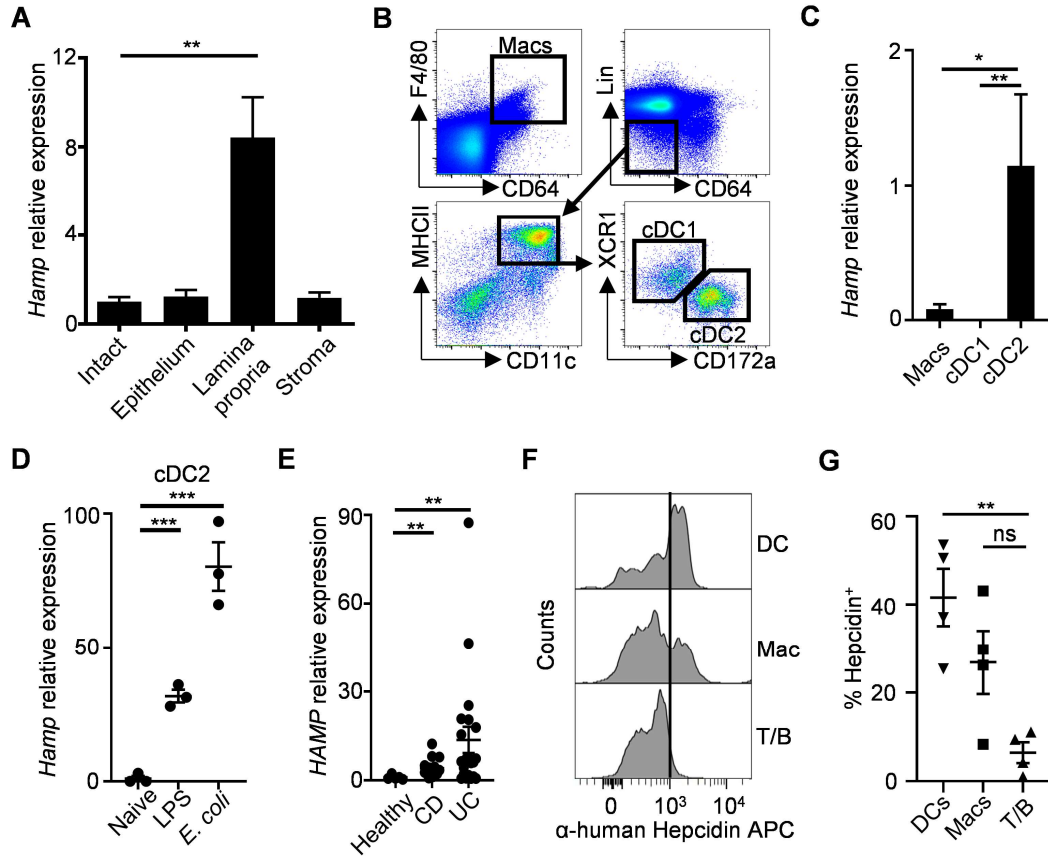


1

2 **Fig. 1. Non-hepatocyte production of hepcidin is critical for mucosal healing.** Hepcidin^{+/+}
 3 and hepcidin^{-/-} mice were given DSS in drinking water. DSS-induced disease and recovery was
 4 monitored by weight loss (A), H&E staining of distal colon (B), and colon shortening (C) at day
 5 12. For studies of hepcidin expression, C57BL/6 mice were given normal drinking water or DSS
 6 for 7 days. Expression levels were measured by qPCR for RNA (D), and protein levels were
 7 measured by ELISA (E). Hepcidin^{ΔLiver} mice and littermate hepcidin^{F/F} mice were given DSS in
 8 drinking water and DSS-induced disease and recovery was monitored by weight loss (F), H&E

1 staining of distal colon (G), and colon shortening (H). All scale bars are 200 microns. Data in (A-
2 E) are representative of five individual mice per group (n=5) replicated in two or more
3 independent experiments, and data in F and H are pooled from two independent experiments
4 with n=3-4. Data in G is representative of two independent experiments with n=3-4. Data are
5 shown as the mean \pm SEM. Statistics comparing genotypes used unpaired two-tailed Student's T
6 test (**:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001). In (A) and (F), weights at sacrifice, normalized
7 to starting weight, were analyzed by unpaired two-tailed Student's T test.

8

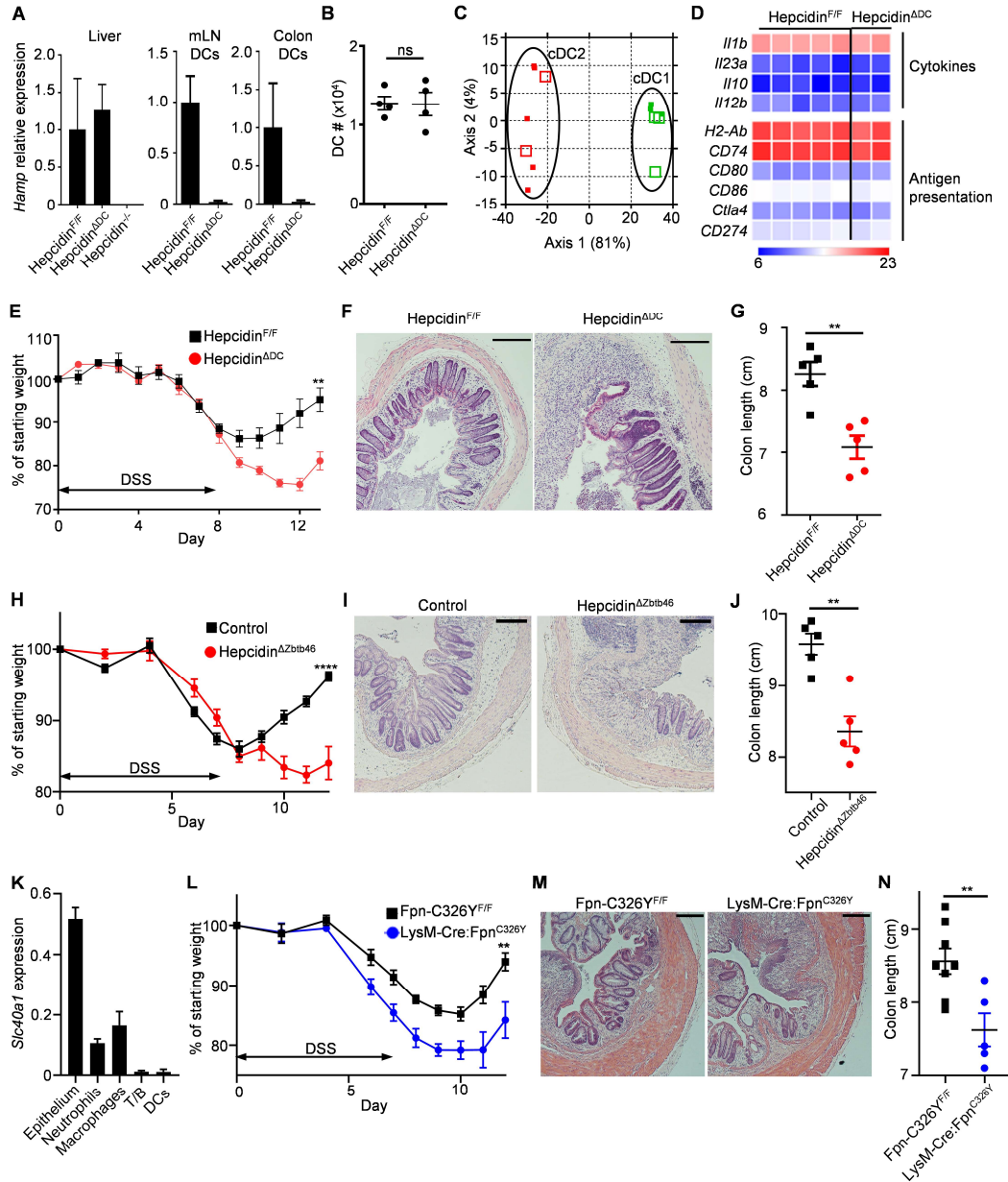


1

2 **Fig. 2. Dendritic cells are a local source of hepcidin in the inflamed intestine of mice and**
 3 **humans.** Hepcidin expression was analyzed by qPCR in naïve mouse tissue and normalized to
 4 the 'intact' sample (A). Mice were given 3.5% DSS in drinking water for 7 days and colon
 5 lamina propria myeloid cells were sorted into macrophage (Live, CD45⁺, CD64⁺, F4/80⁺),
 6 cDC1 (Live, CD45⁺, CD64⁻, F4/80⁻, Lin⁻, MHCII⁺, CD11c⁺, XCR1^{High}, CD172a^{Low}), and
 7 cDC2 (Live, CD45⁺, CD64⁻, F4/80⁻, Lin⁻, MHCII⁺, CD11c⁺, XCR1^{Low}, CD172a^{High})
 8 populations (B) and hepcidin expression was analyzed by qPCR and normalized to the cDC2
 9 samples (C). cDC2s sorted from spleen were stimulated for 16 hours and hepcidin expression
 10 was analyzed by qPCR and normalized to the naïve condition (D). Human RNA was isolated

1 from intestinal tissue samples of healthy controls, and CD or UC patients, and hepcidin
2 expression was measured by qPCR and normalized to the healthy samples (E). Lamina propria
3 cells from inflamed ileum of pediatric CD patients were analyzed for hepcidin protein expression
4 by flow cytometry (F-G). For (A, C, and D), representative data with n=3-5 per group are shown,
5 and data were replicated in at least two independent trials. In (E), N=5 for the healthy group and
6 N=21 for the UC and CD groups. In (F), representative histograms are shown, and in (G), 4
7 independent patients were tested and all data was pooled. All data are shown as mean \pm SEM. In
8 (A, D, and E) data were analyzed by unpaired two-tailed Student's T test; in (C), data were
9 analyzed by the Mann-Whitney test; in (G), data were analyzed by one-way ANOVA with
10 Tukey's multiple comparisons test (*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001).

11

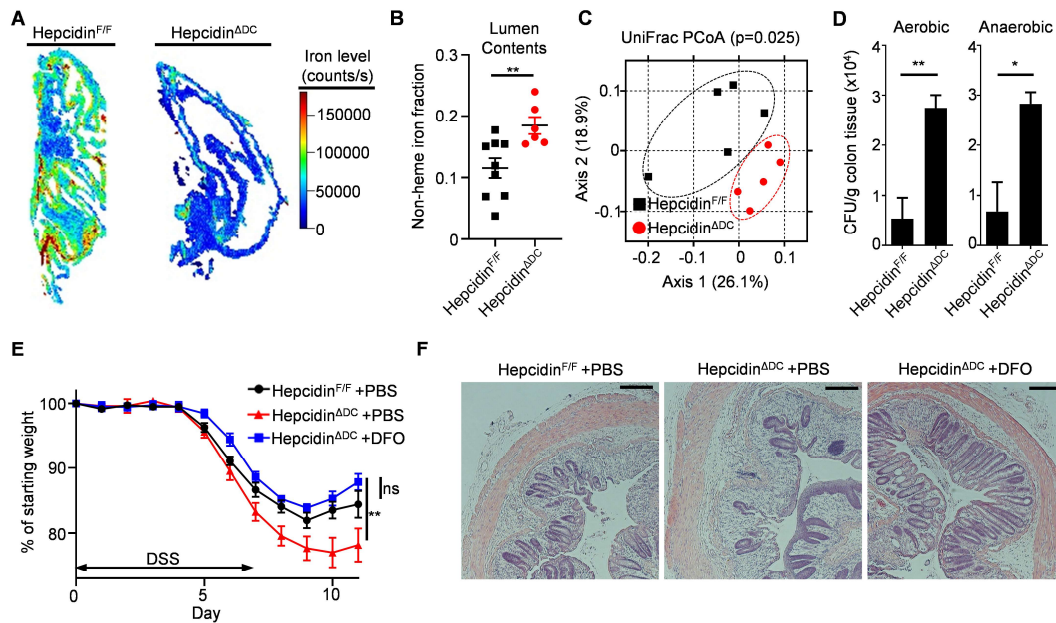


1

2 **Fig. 3. Dendritic cell-derived hepcidin acts on ferroportin-expressing phagocytes to**
 3 **promote mucosal healing.** Hepcidin expression in the liver and mucosal DCs was determined
 4 by qPCR in mice exposed to 3.5% DSS for 7 days (A). Colonic lamina propria DC populations

1 were quantified in absolute numbers (B). cDC1s and cDC2s were sorted from colon lamina
 2 propria of hepcidin^{ΔDC} and littermate control hepcidin^{F/F} mice exposed to 3.5% DSS for 7 days,
 3 transcription was analyzed globally by RNAseq, and principal components analysis is shown (C;
 4 hepcidin^{F/F} cDC1s: Green squares, filled; hepcidin^{ΔDC} cDC1s: Green squares, unfilled;
 5 hepcidin^{F/F} cDC2s: Red squares, filled; hepcidin^{ΔDC} cDC2s: Red squares, unfilled). Transcript
 6 levels of selected immune-relevant genes are shown for cDC2s from hepcidin^{F/F} and hepcidin^{ΔDC}
 7 mice, plotted as Log2(normalized counts) (D). Hepcidin^{ΔDC} and littermate control hepcidin^{F/F}
 8 were given DSS in drinking water, and DSS-induced disease and recovery was monitored by
 9 weight loss (E), H&E staining of distal colon (F), and colon shortening (G). Hepcidin^{ΔZbtb46} and
 10 co-housed control hepcidin^{+/+} mice were given DSS in drinking water, and DSS-induced disease
 11 and recovery was monitored by weight loss (H), H&E staining of distal colon (I), and colon
 12 shortening (J). Epithelial cells and sorted neutrophils, macrophages, T and B cells, and DCs were
 13 sorted from naïve mouse colon lamina propria, and examined for *Slc40a1* expression by qPCR
 14 (K). LysM-Cre:Fpn^{C326Y} and littermate control Fpn-C326Y^{F/F} mice were given DSS in drinking
 15 water, and DSS-induced disease and recovery was monitored by weight loss (L), H&E staining
 16 of distal colon (M), and colon shortening (N). All scale bars are 200 microns. All data are shown
 17 as mean ±SEM. Data in (B, G, J, and N) were analyzed by unpaired two-tailed Student's T test.
 18 In (E, H, and L), weights at sacrifice, normalized to starting weight, were analyzed by unpaired
 19 two-tailed Student's T test. For all statistical tests, *:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001;
 20 ****:p<0.0001. Data in (A-B, E-K, and M) are representative of at least two independent
 21 experiments with n=3-5 per group. Data in (L and N) are pooled from three independent
 22 experiments with n=1-3 per group.

23



1

2 **Fig. 4. Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the intestinal microbiota.**3 Hepcidin^{ADC} and littermate control hepcidin^{F/F} mice were exposed to 3.5% DSS for 7 days.

4 Whole ceca were thoroughly flushed and analyzed for iron levels (in counts/second) by laser-

5 ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (A), and colon lumen contents were

6 collected and iron levels were analyzed (B). Fecal microbiota of naïve hepcidin^{ADC} and littermate7 control hepcidin^{F/F} mice were analyzed by 16S rRNA gene sequencing. The similarity of the

8 fecal microbiota of the two groups was analyzed by principal coordinate analysis (C).

9 Hepcidin^{ADC} and littermate control hepcidin^{F/F} mice were exposed to DSS for 7 days and10 bacterial CFU were quantified from colon tissue homogenates (D). Hepcidin^{ADC} and littermate11 control hepcidin^{F/F} were given DSS in drinking water, and mice were given daily intraperitoneal

12 injections of either sterile PBS vehicle or 2 mg of deferoxamine (DFO) starting at day 0 and

13 continuing through day 11. DSS-induced disease and recovery was monitored by weight loss (E)

14 and H&E staining of distal colon (F). In (A), two independent experiments with $n=1-5$ per group

1 were performed and representative data is shown. In (C), p value was determined using a
2 PERMANOVA test. In (F), representative data are shown from two independent experiments
3 with n=3-5 per group, and scale bars are 200 microns. In (E) weights at sacrifice, normalized to
4 starting weight, were analyzed by one-way ANOVA using Tukey's multiple comparisons. In (B)
5 and (D), groups were compared using unpaired two-tailed Student's T test. Data in (C) and (D)
6 are representative of two independent experiments with n=5 per group. Data in (B) and (E) are
7 pooled data from two independent experiments, each with n=3-5 per group. For all statistical
8 tests, (*:p<0.05; **:p<0.01).

9

Données supplémentaires - Science 2019 en révision



Submitted Manuscript: Confidential



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Supplementary Materials for

Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to promote mucosal healing

Authors: Nicholas J. Bessman^{1,2,3}, Jacques R.R. Mathieu^{4,5,*}, Cyril Renassia^{4,5,*}, Lei Zhou^{1,2,3}, Thomas C. Fung^{1,2,3}, Keith C. Fernandez^{1,2,3}, Christine Austin⁶, Jesper B. Moeller^{1,2,3}, Sara Zumerle^{4,5}, Sabine Louis^{4,5}, Sophie Vaultont^{4,5}, Nadim J. Ajami⁷, Harry Sokol⁸, Gregory G. Putzel¹, Tara Arvedson⁹, Robbyn E. Sockolow¹⁰, Samira Lakhall-Littleon¹¹, Suzanne M. Cloonan¹², Manish Arora⁶, Carole Peyssonnaud^{4,5,**}, Gregory F. Sonnenberg^{1,2,3,**}

correspondence to: gfsonnenberg@med.cornell.edu and carole.peyssonnaud@inserm.fr

This PDF file includes:

Materials and Methods
Figs. S1 to S12

1 **Materials and Methods**

2 Mice, antibiotics and fecal microbiota transplantation

3 C57BL/6 were purchased from Jackson Laboratories and used at 6–12 weeks of age. All
4 conventional mice were maintained in specific pathogen-free facilities at Weill Cornell
5 Medicine. Hepcidin-/- mice were generated by Dr. Sophie Vaultont. Hepcidin-floxed mice were
6 generated by Dr. Carole Peyssonnaud. Fpn^{C326Y} mice were generated by Dr. Samira Lakkhal-
7 Littleton. Zbtb46-Cre mice were kindly provided by Dr. Michel Nussenzweig. Albumin-Cre,
8 Villin-Cre, and CD11c-Cre mice were purchased from Jackson Laboratories. For FMT studies,
9 donor fecal samples were collected, weighed, and re-suspended at 150 ng/mL in anaerobic PBS
10 supplemented with 10% glycerol in an anaerobic chamber. Fresh fecal suspension (200 µL per
11 mouse) was then administered to recipient germ-free C57BL/6 mice by oral gavage. Germ-free
12 C57BL/6 were maintained within sterile vinyl isolators at Weill Cornell Gnotobiotic Mouse
13 Facility and monitored for germ-free status by weekly aerobic and anaerobic culturing. After
14 FMT, ex-germ free mice were housed in sterile cages. For antibiotic experiments, ampicillin (1
15 g/L) and gentamicin (1 g/L) were supplemented with 1 packet of artificial sweetener (Sweet'N
16 Low) per 250 mL of drinking water. Antibiotics were administered beginning 2 weeks prior to
17 DSS administration, and antibiotic treatment continued throughout the DSS experiment. For
18 *Bifidobacteria* administration, a mixture of lyophilized *Bifidobacterium* species (*B. bifidum*, *B.*
19 *longum*, *B. lactis* and *B. breve*, Seeking Health) was suspended in sterile aerobic PBS at 2.5x10⁹
20 CFU/mL and 200 µL per mouse were given by oral gavage. For DSS experiments,
21 *Bifidobacteria* was administered 3x/week for 2 weeks prior to the administration of DSS. For
22 measurement of colon gene expression, *Bifidobacteria* was administered 3x/week for 2 weeks
23 and before analysis of colon gene expression. Deferoxamine mesylate (Sigma) was suspended in
24 sterile PBS at 20 mg/mL. 100 µL (2 mg) of DFO or PBS was administered daily via
25 intraperitoneal injection starting at Day 0 of DSS. Modified iron diets were purchased from
26 Envigo. Low-iron diet (TD.10210) contained 2-6 ppm iron, and control diet (TD.10211)
27 contained 35 ppm iron as ferric citrate. Mice were maintained on modified-iron diets for 4 weeks
28 and fecal *Bifidobacteria* levels were compared to baseline. All experiments were performed
29 according to the guidelines of the Weill Cornell Medical College Institutional Animal Care and
30 Use Committee or by the Ethical Committee for Animal Experimentation of Paris Descartes
31 University (Agreement n° CEEA34.CP.003.13) and in accordance with the principles and
32 guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals
33 (Council of Europe, ETS 123, 1991).
34

35 DSS administration

36 Colitis-grade dextran sulfate sodium salt with average MW of 36,000-50,000 Da (MP
37 Biomedicals) was added to drinking water at day 0. Mice were weighed at the same time of day
38 at indicated time points. All DSS experiments used sex-matched mice at age 7-10 weeks. DSS
39 was administered ad libitum until substantial inflammation was induced as evidenced by
40 significant weight loss. For experiments with Fpn-326Y^{F/F} and hepcidin^{ADC} mice, littermate mice
41 were used as controls. For experiments with hepcidin-/- and hepcidin^{ΔZbtb46} mice, wild-type
42 C57BL/6 mice were used as controls after co-housing for at least 3 weeks. After DSS was
43 removed, mice were euthanized when significant weight recovery had occurred in at least one
44 group. To compare recovery between experimental groups, weights at sacrifice (as a fraction of
45

the starting mouse weight) were compared by an unpaired two-tailed Student's T-test for the last day (*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001). Additionally, colon length was measured (and compared by an unpaired two-tailed Student's T-test), and distal colon tissue samples were collected for histology. DSS was used at a concentration of either 2.5% or 3.5%, depending on the manufacturer lot used (titration experiments were performed to determine the DSS concentration required to induce similar inflammation and weight loss across manufacturer lots).

Inflammatory bowel disease TissueScan Arrays

cDNAs in OriGene TissueScan Arrays (CCRT101) were used to assess gene expression in characterized biopsies of ulcerative colitis (N=21), Crohn's disease (N=21) and control (N=5) tissue biopsies. Clinical information, histology slides of each biopsy, and the quality control data for RNA isolation and cDNA preparations are available (<https://www.origene.com/catalog/tissues/tissuescan/ccrt501/tissuescan-crohn-s-colitis-cdna-array-i>). The original tissues were collected from accredited medical institutions in the United States using IRB-approved protocols, selected by board-certified pathologists and then deposited into the OriGene tissue biorepository along with all of the available clinical data supporting the pathology diagnoses. The specific array plates used contained cDNA prepared from RNA extracted from these pathologist-verified tissues.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR were performed as previously described (24). All samples were normalized to the threshold cycle value for cyclophilin-A. The primers used are presented in the table below. Spearman correlation analysis was used to test the correlation between *HAMP* expression and *ITGAX* (CD11c), *CCR7*, *DEC205*, *CD88* or *CD68*.

Name	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
<i>CYCLOA</i>	GTCAACCCCACCGTGTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
<i>HAMP</i>	CTCTGTTTTCCACAACAGACG	CGTCTTGCAGCACATCCCACAC
<i>ITGAX</i>	ACGTTTCGACACATCCGTGTA	TTGCCTCCTCCATCATTTC
<i>CD68</i>	GCAACTCGAGCATCATTCTTTC ACC	GATGCAGGAGGTGGTGCCTT
<i>CD88</i>	GTGGTCCGGGAGGAGTACTTT	GCCGTTTGTCGTGGCTGTA
<i>CCR7</i>	TGCATCAGCATTGACCGCTA	TATCCAGATGCCACACAGGA
<i>DEC205</i>	TGGCTTCATGGGTTCATGTTA	CCAGCCAAAACTTCTCATT

Histologic analyses

For histological analysis, distal colon tissues were fixed in 4% paraformaldehyde and sent to IDEXX Laboratories (USA) for paraffin embedding, cutting, slide preparation and staining. Images were acquired on a Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon).

Iron measurements

Serum iron was determined using a ferrozine-based colorimetric assay (Pointe Scientific). For iron measurements, each condition was compared to the control group by an unpaired two-tailed Student's T test (*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001).

To measure iron in colon lumen contents, either 2-3 fresh pellets were collected from live mice (for the naïve condition), or complete colon contents were collected at sacrifice (for the DSS-treated condition). Samples were dried for 72 hours in iron-free tubes at 60°C. For non-heme iron measurements, oven dried samples (8-84 mg) were digested with 300 µl of NHI Acid

(10% trichloroacetic acid in 3 M HCl) overnight at 65°C. Samples were cooled, vortexed and centrifuged at 2,000 rpm for 15 seconds. Equal volumes of sample or iron standard (25 µg/ml-0.39 µg/ml using NHI Acid) were incubated in a 1-ml cuvette for 5-10 minutes at RT with 800 µl BAT Buffer (0.2% thioglycolic acid, 0.02% bathophenanthroline sulfonate in 1/2 saturated NaAc solution). Samples were read at 535 nm with unknowns calculated from a standard curve. For heme iron measurements, the remaining pellet after NHI Acid digestion was digested in a 1:3 v/v dilution of ultra-pure HNO₃ for 2 hours at 95°C, cooled, and then further diluted 1:1 with 30% H₂O₂ and digested for another 1 hour at 95°C. Equal volumes of sample or iron standard were then measure by graphite furnace atomic absorption spectroscopy, with sample iron concentrations calculated from a standard curve. Total iron was calculated as [heme iron] + [non-heme iron], and non-heme iron fraction was calculated as [non-heme iron] / [total iron].

Flow cytometry and cell sorting

Mouse mesenteric lymph nodes were harvested at necropsy and single-cell suspensions were prepared by mechanical disruption through a 70 micron nylon mesh. For mouse colon lamina propria preparations, attached fat was removed and tissues were cut open longitudinally. All luminal contents were removed by gentle scraping and subsequent washes with cold PBS. Epithelial cells and intra-epithelial lymphocytes were collected by 2 sequential incubations with shaking in strip buffer (1mM EDTA, 1mM DTT, and 5% FCS in PBS) at 37°C for 10 minutes. To isolate lamina propria lymphocytes, the remaining tissue was digested with 0.5 mg/mL collagenase/dispase (Roche), and 20 µg/mL DNaseI (Sigma) for 30 minutes at 37°C. For flow cytometric analyses, cells were stained with the following mouse-specific antibodies: anti-CD3 (clone 145-2C11, eBioscience), anti-CD4 (clone GF1.4, Biolegend), anti-CD11c (clone N418, Biolegend), anti-CD11b (clone M1/70, eBioscience), anti-CD103 (clone 2E7, Biolegend), anti-MHCII (clone M5/114.15.2, eBioscience), anti-CD64 (clone X54-5/7.1, Biolegend), anti-Ly6G (clone RB6-8C5, eBioscience), anti-FoxP3 (clone FJK-16S, eBioscience), anti-Tbet (clone 4B10, Biolegend), anti-IFN γ (clone XMG1.2, eBioscience), anti-ROR γ t (clone B2D, eBioscience), anti-IL-22 (clone IL22JOP, eBioscience), anti-CD90.2 (clone 30-H12, Biolegend), anti-CD127 (clone A7R34, eBioscience), anti-F4/80 (clone BM8, Biolegend), anti-XCR1 (clone ZET, Biolegend), anti-CD172a (clone P84, Biolegend), anti-CD19 (eBio1D3, eBioscience), anti-NK1.1 (PK136, eBioscience), anti-CD138 (281-2, Biolegend), and anti-IL-17A (clone eBioTC11-18H10.1, eBioscience). Unlabeled anti-CD16/32 (clone 93, Biolegend) was used to block Fc receptors when analyzing myeloid cells. Dead cells were excluded from analysis using the Live/Dead Aqua viability kit (Invitrogen). For staining cytokines, cells were stimulated with 50 ng/mL PMA, 750 ng/mL ionomycin, 10 µg/mL Brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) for 4 hours at 37°C ex vivo. For staining of transcription factors and cytokines, cells were fixed and permeabilized with the Cytotfix/Cytoperm kit (BD biosciences).

Ileum samples from pediatric Crohn's patients were obtained through Institutional Review Board approved protocols. Single cell suspensions from intestinal tissues were obtained by incubating adjacent non-malignant tissue for 30 min at 37°C with shaking in stripping buffer (1 mM EDTA, 1 mM DTT and 5% FCS) to remove the epithelial layer. Supernatants were then discarded. Remaining tissues were then mechanically dissociated with a sterile scalpel. The lamina propria fraction was obtained by incubating the dissociated tissues for 1 hour at 37°C with shaking in 2 mg/ml collagenase D (Roche), 0.1 mg/ml DNase I (Sigma) and 1 mg/ml of Trypsin Inhibitor (Gibco) digestion solution. Remaining tissues were then filtered through a 70 µm cell strainer. All cells were then viably cryopreserved in 90% FBS and 10% DMSO for side-

1 by-side analysis at a later time point. Following thawing and filtration through a 70 μm cell
2 strainer, cells were stained with antibodies for flow cytometry acquisition. Samples were stained
3 with the following human-specific antibodies: anti-CD45 (clone HI30, Biolegend), anti-CD14
4 (clone M5E2, Biolegend), anti-CD16 (clone 3G8, Biolegend), anti-HLA-DR (clone LN3,
5 eBioscience), anti-CD3 (clone UCHT1, Biolegend), anti-CD19 (clone SJ25C1, Biolegend), anti-
6 CD20 (clone 2H7, Biolegend), anti-CD11c (clone 3.9, Biolegend), anti-hepcidin (Ab 2.7,
7 Amgen). The anti-hepcidin antibody was labeled with an AlexaFluor-647 protein labeling kit
8 (Invitrogen). For hepcidin staining, cells were fixed and permeabilized using the eBioscience
9 Foxp3/Transcription factor staining buffer set (eBioscience).

10 Stained cells were analyzed on a custom-configured 5 laser, 18 color BD LSRFortessa, or
11 sorted on an identically-configured FACSAria III (BD) with a 100 micron flow cell. DCs were
12 isolated by sorting on live, CD45+MHCII+CD11c+CD64- cells from both the mLN and the
13 colonic lamina propria. Macrophages were sorted as live, CD45+CD64+F4/80+. cDC1 were
14 sorted as live, CD45+CD64-F4/80-Lin-MHCII+CD11c+XCR1+CD172a- and cDC2 as live,
15 CD45+CD64-F4/80-Lin-MHCII+CD11c+XCR1-CD172a+, where ‘Lin’ includes CD3, CD19,
16 NK1.1, and CD138. Neutrophils were sorted as live, CD45+CD11b+Ly6G+. ‘T and B cells’
17 were sorted as live, CD45+, and either CD3+ or CD19+.

18 Intestinal iron imaging

19 Ceca from DSS-treated mice were excised, fat was carefully removed, and cecal content
20 was removed by flushing extensively with 25% (V/V) OCT compound. Samples were frozen in
21 100% OCT and 5 micron sections were cut. A Teledyne Cetac Technologies LSX-213 G2+ laser
22 ablation system was connected to an Agilent Technologies 8900 ICP-MS by Tygon® tubing. A
23 flow of 0.75 L min^{-1} He gas carried ablated material from the ablation chamber and was mixed
24 with 0.55 L min^{-1} Ar via a y-piece prior to the ICP-MS. A 50 μm diameter laser beam was
25 rastered at a speed of 100 $\mu\text{m s}^{-1}$. Laser fluence and repetition rate was optimized for ablation of
26 the tissue whilst preventing ablation of the underlying glass slide (0.05 J cm^{-2} , 20 Hz). A 3.0
27 mL min^{-1} flow of H_2 in the ICP-MS octopole reaction system (ORS®) was used to minimize
28 interferences and improve signal stability. Following LA-ICP-MS imaging, ablation line-specific
29 .csv files generated by the MassHunter Workstation software (Agilent) were read into RStudio
30 (version 0.98.1102), and counts/second (CPS) values for each element were coerced into a list of
31 m by n element-specific matrices, where m = number of ablation lines and n = number of
32 ablation spots per ablation line. For each matrix, row-specific gas blank CPS medians (which
33 here corresponded to the median values in pixels (ablation spots) collected during the first 10 s of
34 each ablation line) were subtracted from each pixel in the corresponding row. Gas-blank
35 corrected matrices were converted to the RasterStack format using the R package ‘raster’, where
36 each $X_{m \times n}$ matrix was converted to a RasterLayer with spatial extent ($x_{\text{min}} = 0$, $x_{\text{max}} = n$, $y_{\text{min}} = 0$,
37 $y_{\text{max}} = m$). For matched hematoxylin and eosin staining, 5 micron serial sections were cut and
38 stained according to manufacturer recommendations using an H&E staining kit (Abcam).
39
40

41 Bone marrow-derived dendritic cell assays

42 Bone marrow-derived DCs were generated by culturing bone marrow cells in the presence
43 of 20 ng/mL GM-CSF for 8–10 days. Culture media was replaced with fresh media every 3 days.
44 Frequencies of CD11c+ cells were $\geq 95\%$. All cell incubations were performed at 37°C and 5%
45 CO_2 . For TLR, cytokine, and heat-killed E. coli stimulations, the stimulus was applied for 24
46 hours before RNA isolation. For live E. coli stimulation, bacteria were applied (MOI=50) for 2

1 hours and then washed away and killed by the addition of gentamicin. Heat-killed bacteria were
2 added at a concentration corresponding to MOI=50. All cytokines were added at a concentration
3 of 20 ng/mL, and TLR ligands were added at 100 ng/mL (LPS, Pam3CSK4), 500 ng/mL
4 (flagellin), or 10 µg/mL (CpG). All TLR ligands were purchased from Invivogen, except LPS
5 (Sigma, *E. coli* O111:B4, IEX-purified).

6 Ex vivo cell stimulation

7
8 Mouse spleens were chopped into small pieces and digested for 30 minutes at 37°C with
9 shaking in digestion buffer (1 mg/mL Collagenase D, 20 µg/mL DNaseI, and 2% FCS in
10 HEPES-buffered RPMI 1640), and passed through a 70 µm cell strainer, and erythrocytes were
11 lysed in ACK lysis buffer. CD11c⁺ cells were pre-selected with magnetic beads (Miltenyi), and
12 cDC2s were sorted and cultured for 16 hours in myeloid culture media
13 (RPMI/Pen/Strep/10%FCS). 200k cells per well were stimulated in 1 mL with media alone, or
14 media supplemented with either 500 ng/mL LPS (Sigma, *E. coli* O111:B4, IEX-purified) or heat-
15 killed *E. coli* equivalent to 5x10⁸ CFU/mL.

16 Hepcidin protein analyses

17
18 Tissues from naïve- or DSS-treated C57BL/6 mouse tissues were homogenized and
19 hepcidin protein was determined by a quantitative ELISA assay (Intrinsic Lifesciences).

20 Gene expression profiling and quantitative real-time PCR

21
22 RNA was isolated using TRIzol reagent (Life Technologies) according to the
23 manufacturer's instructions. RNA isolated from tissues of DSS-treated animals was further
24 purified by precipitating in 2.5 M Lithium chloride on ice for 30 minutes, centrifuging at 14,000g
25 for 30 minutes at 4°C, washing sequentially in 100% and 70% ethanol, and resuspending in
26 purified water. cDNA was generated using Superscript reverse transcriptase II (Invitrogen).
27 Quantitative real-time PCR was performed using SYBR green chemistry (Invitrogen) or TaqMan
28 on the ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). For qPCR measurements, each
29 condition was compared to the mock-treated group or the MyD88^{-/-} group by an unpaired two-
30 tailed Student's T test (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001). Mouse hepcidin
31 qPCR primers were purchased from ThermoFisher (reference # Mm00519025_m1). Samples
32 were normalized to either *Actb* (Figs. 1D, 3A, S1B, and S2) or *Hprt1* (all other figures), and
33 displayed as fold change over PBS-treated BMDCs or naive mice. For microarray analysis,
34 BMDCs in antibiotic free media were treated with *E. coli* (MOI=50) or an equivalent volume of
35 PBS for 2 hours, then cells were washed extensively and plated in media containing gentamicin
36 (100 µg/mL). After 4 subsequent days of culture, cells were lysed directly in TRIzol. RNA was
37 isolated, amplified, reverse-transcribed to cDNA and hybridized to an Affymetrix GeneChip
38 (Mouse Gene 1.0ST). Relative expression data was normalized by Z score transformation.

39 RNA sequencing

40
41 RNAseq library preparation and sequencing were performed by the Genomics and
42 Epigenomics Core Facility at Weill Cornell Medicine. Libraries were prepared from sorted DCs
43 using the Clontech SMARTer® Ultra® Low Input RNA Kit V4 (Clontech Laboratories), and
44 were sequenced on an Illumina HiSeq 4000 instrument, producing 50bp single-end reads. Reads
45 were demultiplexed using Illumina CASAVA v1.8.2 and adapters were trimmed using
46 FLEXBAR v2.4 (46). Reads were aligned to the GRCm38/mm10 mouse genome using STAR

1 v2.3.0 (47), and aligned reads were counted at the gene level using the R package Rsubread (48).
 2 Differential expression and principal components analysis were performed using DESeq2
 3 v1.22.2 (49), using only genes having 50 or more counts in at least 2 samples. Differential
 4 expression p values were corrected for multiple comparisons using the method of (50) using a
 5 false discovery rate of 0.1. PCA plots were generated using the 500 genes with the highest
 6 variance after applying the DESeq2 varianceStabilizingTransformation function. Heatmaps were
 7 produced using the Morpheus software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

8 9 Colon tissue fractionation for RNA extraction

10 Colon tissue was removed, cleaned from remaining fat tissue and opened longitudinally
 11 before being washed in ice-cold PBS. Dissociation of epithelial cells was performed by
 12 incubation on a shaker at 37 °C in PBS containing 2% FBS, 5 mM EDTA, and 1 mM DTT two
 13 times for 20 minutes. After each step, samples were vortexed and the epithelial cell fraction was
 14 passed through a 100 µm filter and collected. Afterwards, remaining tissue was chopped into
 15 small pieces and enzymatic digestion was performed on a shaker at 37 °C for 40 minutes in
 16 RPMI 1640 media containing 5% FBS, 0.4 U/ml dispase, 1 mg/ml collagenase III and 20 µg/ml
 17 DNaseI. Dissociated leukocytes were passed through a 70µm filter and collected. Remaining
 18 tissue (stromal fraction) was washed twice in ice-cold PBS and then homogenized in Trizol.
 19 Collected epithelial cells and leukocytes were further enriched by a 20%/40% or 40%/80%
 20 Percoll gradient, respectively, before homogenization in Trizol.

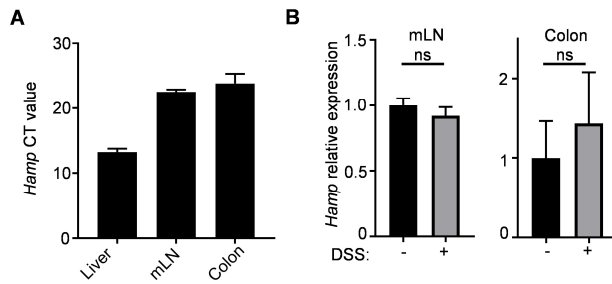
21 22 Fecal 16S and *Bifidobacteria* colonization analyses

23 16S rRNA gene sequencing methods were adapted from the methods developed for the
 24 NIH-Human Microbiome Project and the Earth Microbiome Project. Briefly, bacterial genomic
 25 DNA was extracted using MO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories). The
 26 16S rDNA V4 region was amplified by PCR and sequenced in the MiSeq platform (Illumina)
 27 using the 2x250 bp paired-end protocol. The 16S rRNA gene pipeline data incorporates
 28 phylogenetic and alignment-based approaches to maximize data resolution. The read pairs were
 29 demultiplexed based on the unique molecular barcodes, and reads were merged using
 30 USEARCH v7.0.1090, allowing zero mismatches and a minimum overlap of 50 bases. Merged
 31 reads were trimmed at the first base with Q5. In addition, a quality filter was applied to the
 32 resulting merged reads and reads with > 0.05 expected errors were discarded. 16S rRNA gene
 33 sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) at a similarity cutoff value
 34 of 97% using the UPARSE algorithm⁴⁴. OTUs were mapped to an optimized version of the
 35 SILVA Database containing only the 16S V4 region to determine taxonomies. Abundances were
 36 recovered by mapping the demultiplexed reads to the UPARSE OTUs. A rarefied OTU table
 37 from the output files generated in the previous two steps was used for downstream analyses of α -
 38 diversity, β -diversity, and phylogenetic trends. Differential abundance testing was performed
 39 using DESeq2 with default parameters after exporting the data using the phyloseq function
 40 phyloseq_to_deseq2. The resulting p values were corrected for multiple comparisons. Significant
 41 clustering of samples by genotype was assessed using PERMANOVA (51) with 10,000
 42 permutations, as implemented in the vegan R package⁽⁵²⁾. For analysis of *Bifidobacteria*
 43 colonization by qPCR, fecal DNA was purified using the PowerSoil kit (Qiagen). *Bifidobacteria*
 44 was quantified using a species-specific primer pair (F: 5'-CGGGTGAGTAATGCGTGACC-3',
 45 R: 5'-TGATAGGACGCGACCCCA-3') normalized to universal 16s primers (UniF340: 5'-
 46 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'; UniR514: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3').

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Colon tissue bacterial colonization

Mice were given 3.5% DSS for 7 days, and colon tissue was isolated at necropsy and fat was removed. Tissue was cut longitudinally and feces and luminal content was removed by gentle scraping. Tissues were washed 4 times sequentially in ice-cold sterile PBS by vortexing for 30 seconds. Tissues were then weighed and homogenized by bead-beating for 3 minutes at a frequency of 30/s. Tissue homogenate was then plated on aerobic or anaerobic brain heart infusion agar (BHI) (Sigma). Plates were incubated 96 hours at 37°C before counting CFU.



1

2

Fig. S1.

3

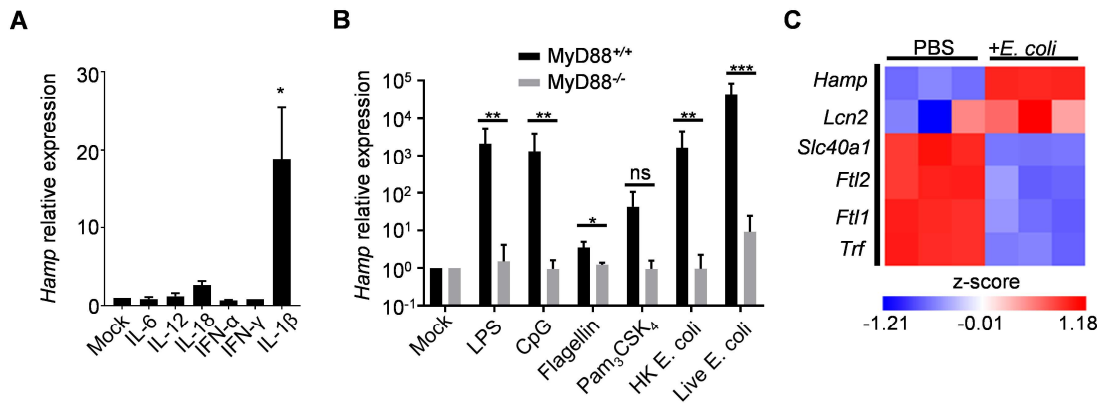
4

5

6

7

Hepcidin is expressed in the intestine and associated lymphoid tissues. Hepcidin expression was analyzed by qPCR in naive (A-B) or DSS-treated (B) mouse tissues, and data were analyzed by unpaired two-tailed Student's T test. Representative data are shown from two independent experiments, each with n=5 per group. Data are shown as the mean \pm SEM.

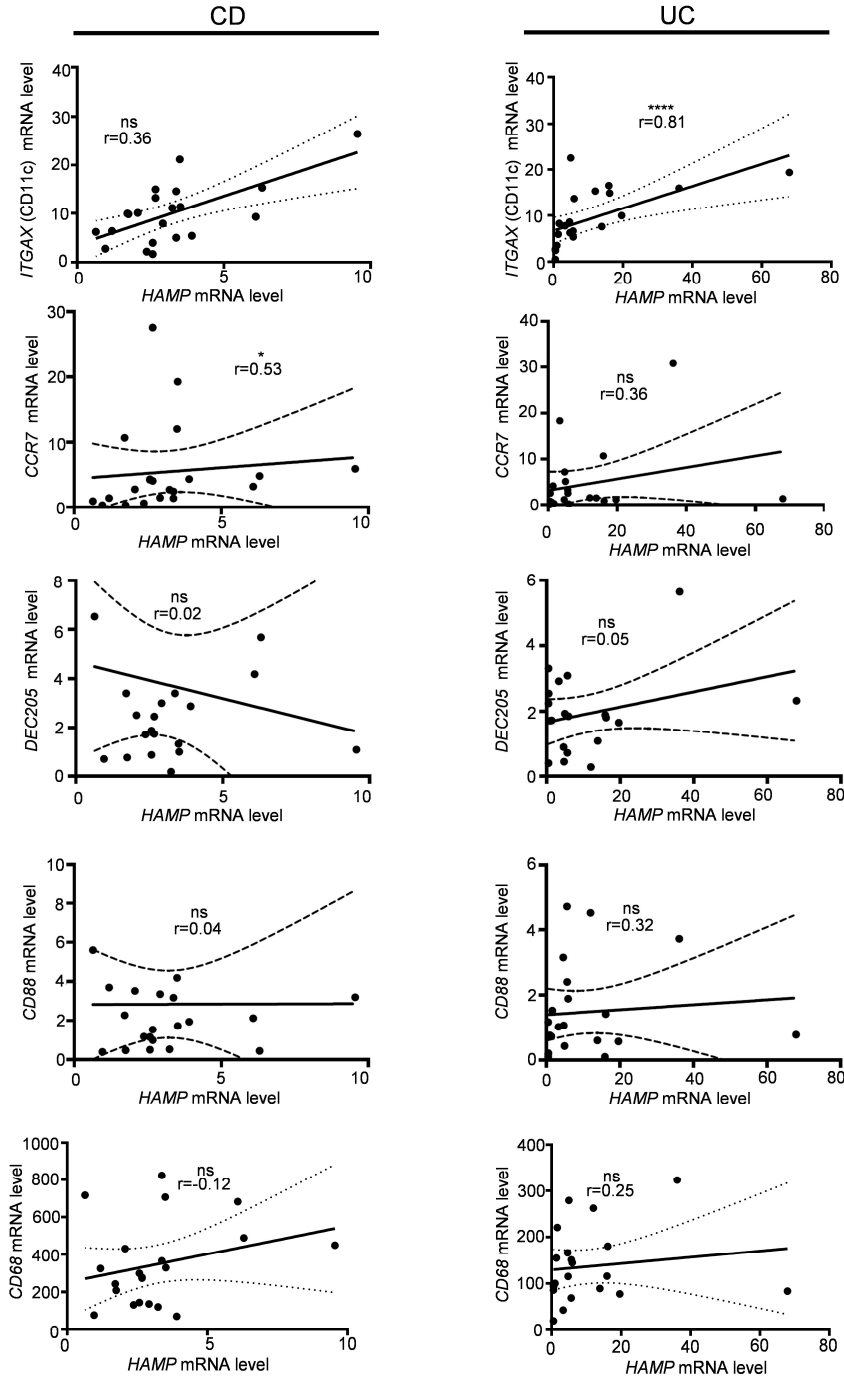


1

2 **Fig. S2**

3 Dendritic cells express hepcidin in response to microbial stimulation. BM-DCs were exposed to
 4 a panel of inflammatory cytokines and Hamp expression was determined by qPCR (A). TLR
 5 ligands or live or heat-killed bacteria were used to stimulate BM-DCs and Hamp expression was
 6 determined by qPCR (B). BM-DCs exposed to live *E. coli* or PBS were analyzed by an
 7 expression microarray (C). Data are shown as the mean \pm SEM. Statistics comparing genotypes
 8 used unpaired two-tailed Student's T test (*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001)

9



1

2

Fig. S3

3

Hepcidin expression correlates with DC markers in IBD patients. Human RNA was isolated from affected tissue samples of CD or UC patients, and hepcidin expression was measured by qPCR.

4

1 Hepcidin (*HAMP*) mRNA levels were analyzed for correlation with DC (*ITGAX*, *CCR7*,
2 *DEC205*) and macrophage (*CD88*, *CD68*) marker mRNA levels in patient samples by Spearman
3 correlation analysis (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.0001$). Significant correlations were found between
4 hepcidin expression and DC marker genes *ITGAX* (in UC) and *CCR7* (in Crohn's), but no
5 correlations were detected with macrophage marker genes.
6

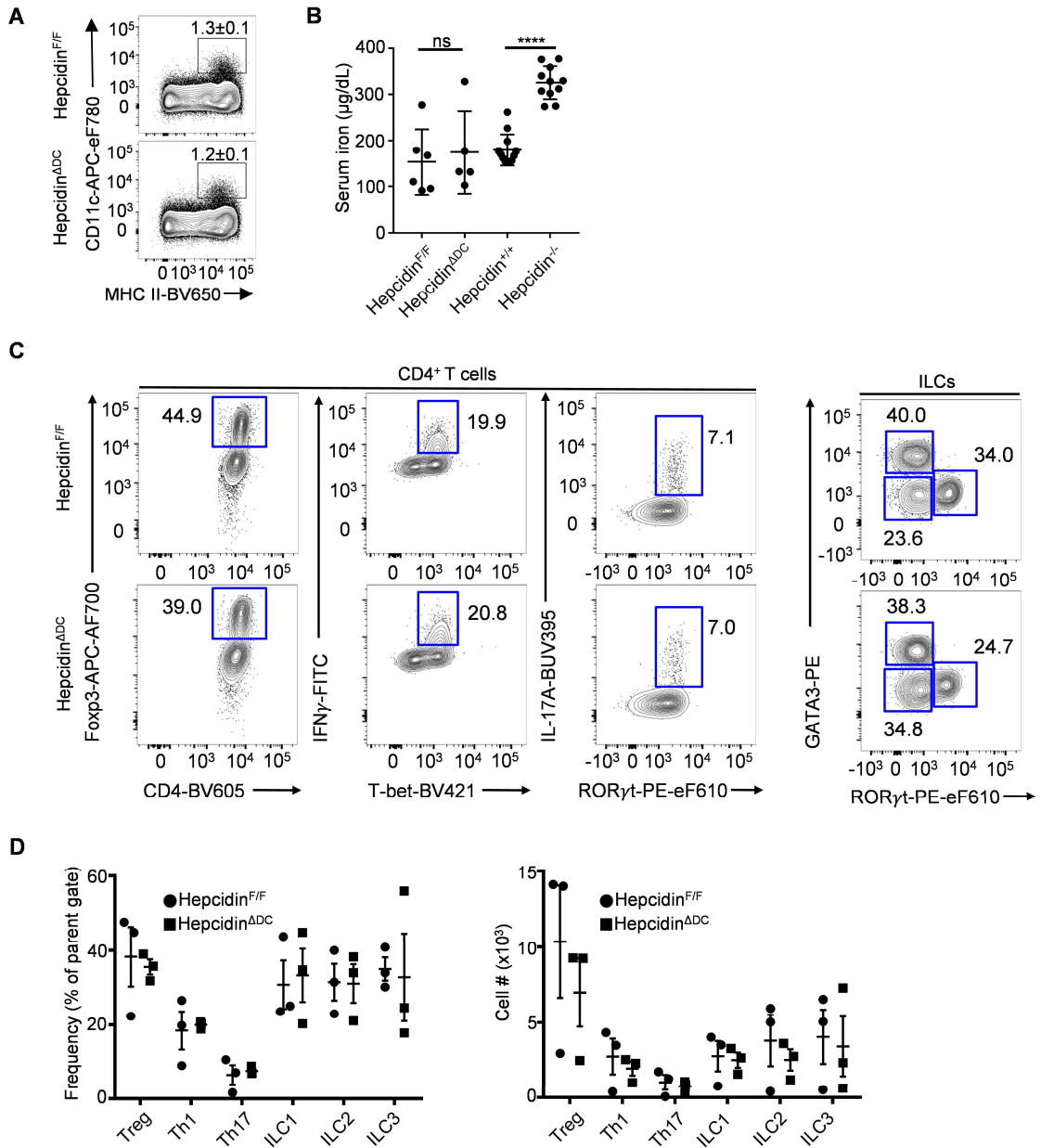
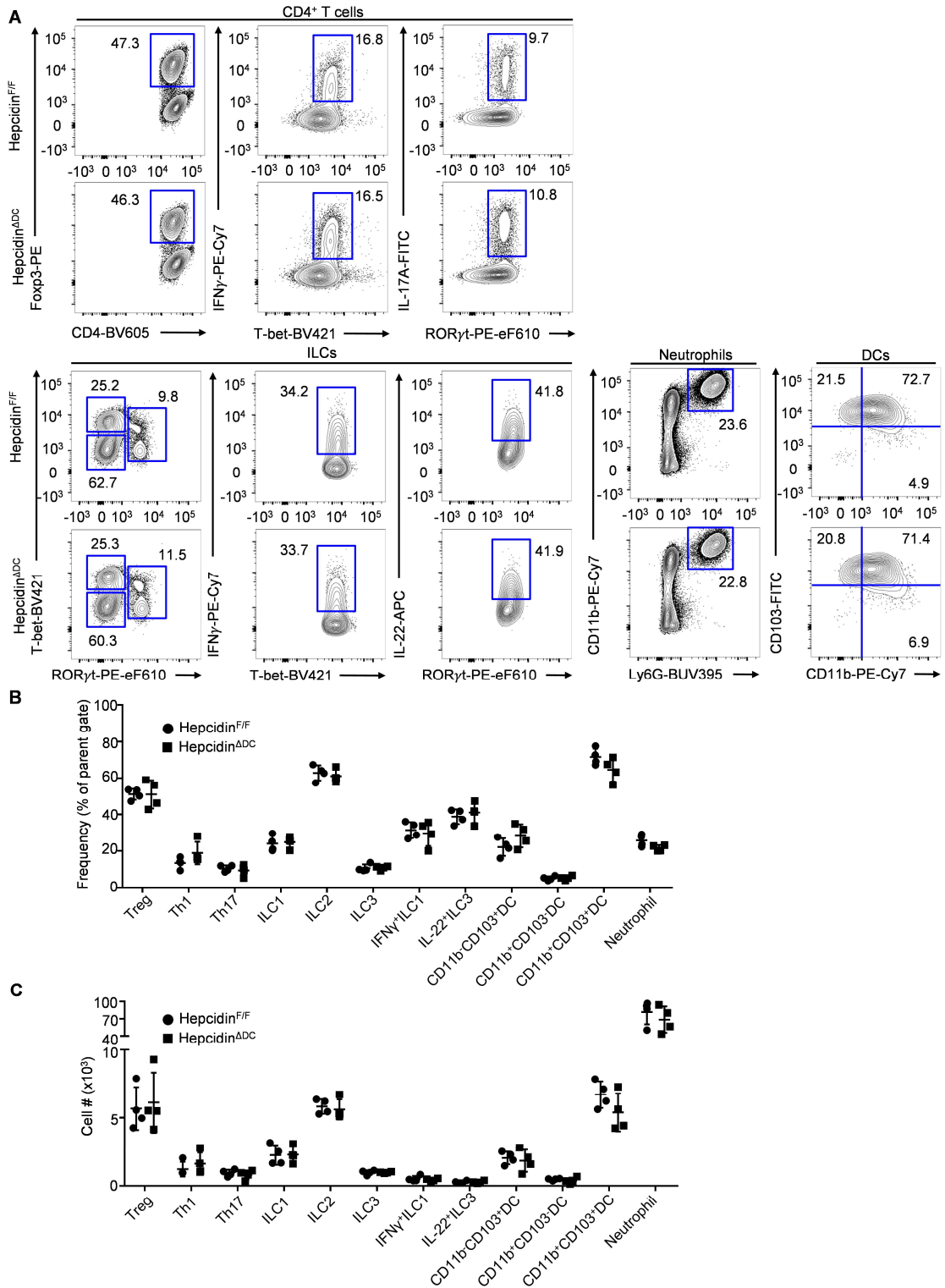


Fig. S4

DC-derived Hepcidin does not impact systemic iron or immune cell homeostasis in naïve mice. Colon lamina propria cells were isolated and pre-gated for single, live, CD45⁺ events, and analyzed by surface markers to elucidate DC, CD4 T cell and ILC cell populations (A, C). Serum iron was measure by a ferrozine-based colorimetric assay (B). Cell subset frequencies and total numbers (D) are shown from one representative experiment (of 2 independent trials) with n=3 mice. Cell populations among the two genotypes were compared by an unpaired two-tailed Student's T-test, and no significant differences were found (using p=0.05 as a cutoff). Serum

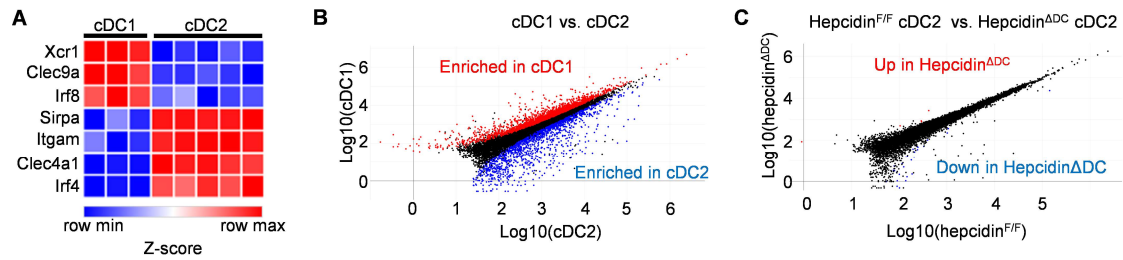
1 iron levels were compared by an unpaired two-tailed Student's T-test between control mice and
2 knockouts (****; $p < 0.0001$).
3



1

1 Fig. S5

2 DC-derived Hepcidin does not impact innate or adaptive immunity during intestinal damage and
3 inflammation. Hepcidin^{ΔDC} and littermate control hepcidin^{F/F} mice were given 3.5% DSS for 7
4 days, and colon lamina propria lymphocytes were analyzed by flow cytometry, pre-gating on
5 live, single, CD45⁺ events (A). Cell subset frequencies (B) and total numbers (C) are shown from
6 one representative experiment (of 2 independent trials) with n=4 individual mice. Cell
7 populations among the two genotypes were compared by an unpaired two-tailed Student's T-test,
8 and no significant differences were found (using p=0.05 as a cutoff).
9



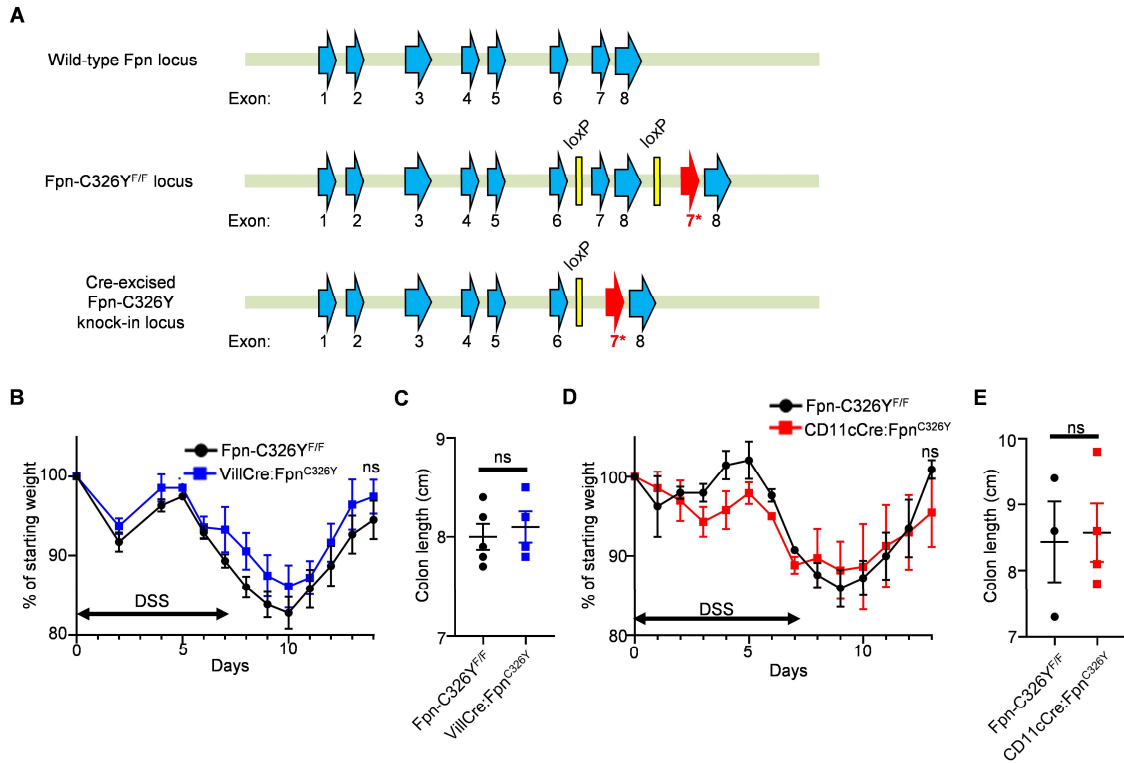
1

2

Fig. S6

3 Comparison of gene expression in DC subsets during intestinal inflammation. cDC1s and cDC2s
4 were sorted from colon lamina propria of control hepcidin^{F/F} mice (n=3 for cDC1 and n=5 for
5 cDC2) and littermate hepcidin^{ΔDC} mice (n=3 for cDC1 and n=2 for cDC2) exposed to 3.5% DSS
6 for 7 days, transcription was analyzed globally by RNAseq, and samples were analyzed for
7 differentially-expressed genes between DC subsets. Canonical cDC1 and cDC2 marker genes
8 were significantly different in agreement with previous reports (A). Differentially expressed
9 genes between cDC1s and cDC2 from hepcidin^{F/F} mice are highlighted in (B). Differentially
10 expressed genes between cDC2s from hepcidin^{F/F} and littermate hepcidin^{ΔDC} are highlighted in
11 (C). Z-scores of Log₂(normalized counts), normalized by row, are shown in (A), while
12 Log₁₀(normalized counts) are shown in (B,C).

13



1

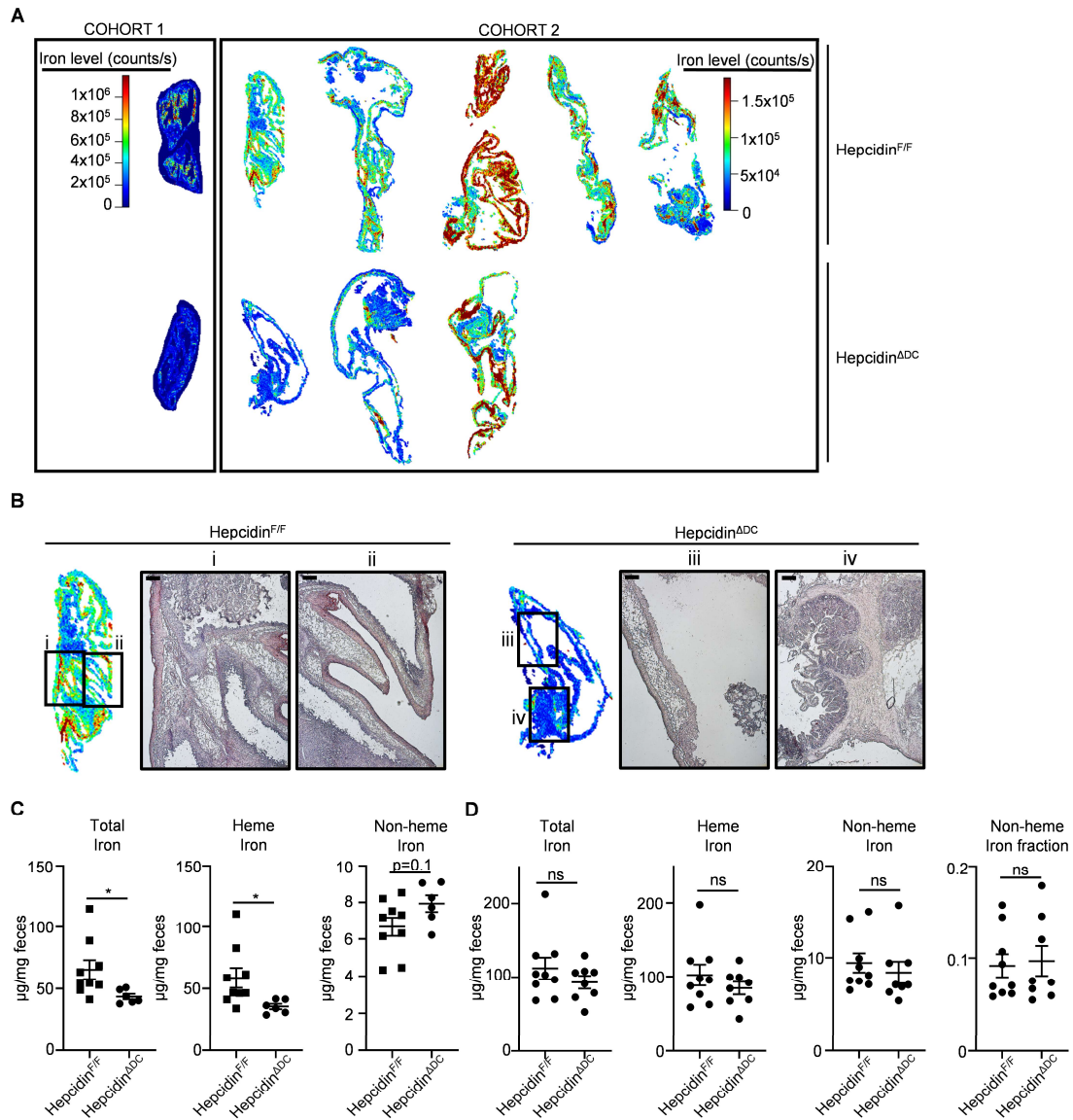
2

Fig. S7

Hepcidin does not act on DCs or intestinal epithelial cells to promote mucosal healing. The genetic structure of the Fpn-C326Y^{F/F} mouse strain is illustrated (A). VillCre:Fpn^{C326Y} mice and littermate control Fpn-C326Y^{F/F} mice were given 3.5% DSS in drinking water for 7 days and disease was monitored by weight development (B) and colon shortening (C).

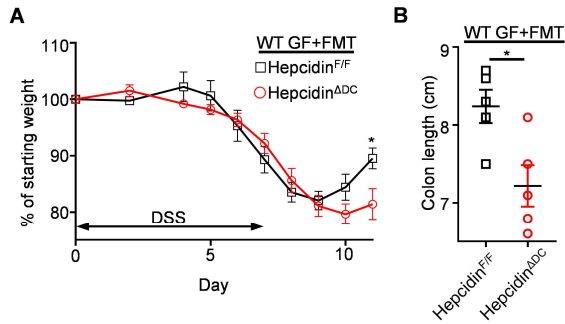
CD11cCre:Fpn^{C326Y} mice and littermate control Fpn-C326Y^{F/F} mice were given 3.5% DSS in drinking water for 7 days and disease was monitored by weight development (D) and colon shortening (E). Data in (C) and (E) were analyzed by unpaired two-tailed Student's T-test. In (B) and (D), weights at sacrifice, normalized to starting weight, were analyzed by unpaired two-tailed Student's T test. Data are shown as the mean \pm SEM. Data in (B-E) are representative of at least two independent experiments with (n=3-5) per group).

13

**Fig. S8**

DC-derived hepcidin modulates colon iron in DSS-treated mice. Two independent cohorts ($n=1-5$ per group) of littermate hepcidin^{ADC} and control hepcidin^{F/F} mice were given 3.5% DSS for 7 days, ceca were collected and thoroughly flushed, and iron levels were determined by quantitative mass spectrometry (A). Each individual hepcidin^{ADC} cecum is displayed in the bottom row, and hepcidin^{F/F} ceca are displayed in the top row. Representative H&E staining, confirming that iron signals co-localize with cecal epithelium and lamina propria but not lumen, are shown in expanded panels in (B), with labels (i)-(iv) corresponding to inset labels. Scale bars in (B) are 200 microns. Colon contents were collected from either mice given 3.5% DSS for 7 days (C) or naïve mice (D). Non-heme-bound iron and heme-bound iron were measured, and

1 total iron and non-heme-iron fraction were calculated. All experiments utilized littermate
2 hepcidin^{ΔDC} and control hepcidin^{F/F} mice. Data in (C,D) are shown as mean ±SEM, and are
3 shown pooled from two independent experiments (n=3-5 per group). Data were analyzed by
4 unpaired two-tailed Student's T test (*:p<0.05).
5



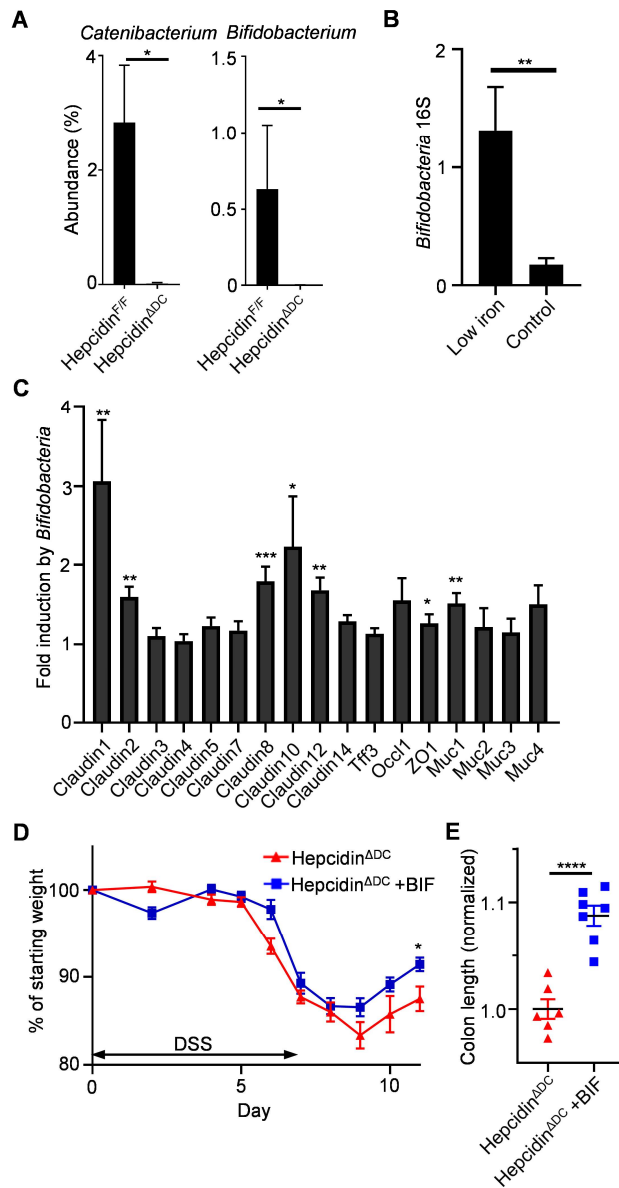
1

2

Fig. S9

Hepcidin^{ΔDC} mice exhibit a transmissible dysbiosis that inhibits mucosal healing. Fecal microbiota from hepcidin^{ΔDC} and littermate control hepcidin^{F/F} were transferred to germ-free wild-type C57BL/6 recipients by a single gavage. DSS treatment was then initiated 6 weeks after transfer. Representative weight loss (A) and colon length data (B) were quantified. Weights at sacrifice, normalized to starting weight, as well as colon length, were analyzed by unpaired two-tailed Student's T test (*:p<0.05). Data are shown as mean ±SEM and are representative of three independent experiments with n=4-5 per group.

10

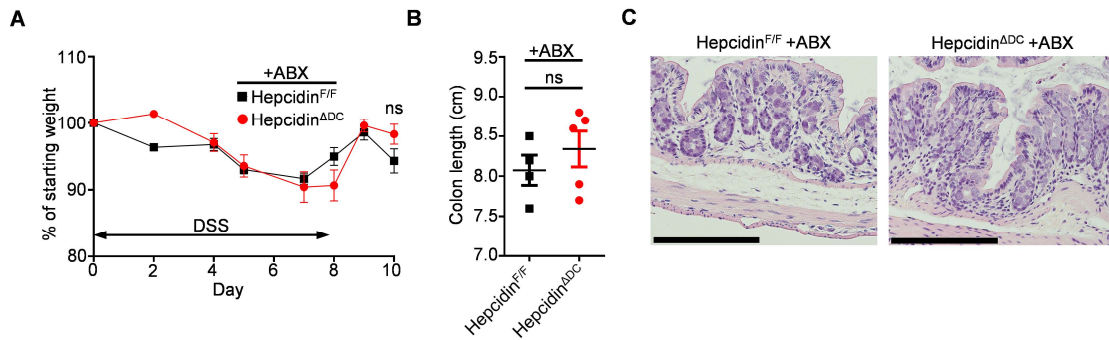


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Fig. S10

DC-derived hepcidin promotes colonization with tissue-protective and iron-sensitive Bifidobacteria. Fecal microbiota of naïve hepcidin^{ADC} and littermate control hepcidin^{F/F} mice were analyzed by 16S rRNA gene sequencing and differential abundance testing was performed. Abundance for the only two differentially-abundant genera, Catenibacterium and Bifidobacterium, is displayed as a percentage of total bacterial 16S (A). Unpaired two-tailed Student's T test was used to compare samples (*:p<0.05). Wild-type mice were placed on iron-modified diets at 3.5 weeks of age and maintained for 4 weeks, and Bifidobacteria colonization was determined by qPCR and normalized to day 0 of the modified diet administration (B). Data

1 shown are representative of two independent experiments with n=5 per group, and data were
2 analyzed by the Mann-Whitney test (**:p<0.01). In (C), mice were given Bifidobacteria by oral
3 gavage or no treatment 3x/week for two weeks and gene expression in colon tissue was
4 examined by qPCR. Data from two independent experiments, each n=5, were pooled, and gene
5 expression was normalized to the ‘no treatment’ group. Unpaired two-tailed Student’s t-test was
6 used to compare the Bifidobacteria-treated group to the control group (*:p<0.05; **:p<0.01;
7 ***:p<0.001). Hepcidin^{ΔDC} were given Bifidobacteria by oral gavage or no treatment 3x/week
8 for two weeks and then given 3.5% DSS for 7 days, and disease was monitored by weight loss
9 (D) and colon length (E). Data shown are pooled from two independent experiments each with
10 n=3-4 per group. Weights at sacrifice, normalized to starting weight, as well as colon length,
11 were analyzed by unpaired two-tailed Student’s T test (*:p<0.05; ****:p<0.0001). Colon length
12 was also normalized to the ‘no treatment’ group within each independent experiment. All data
13 shown are depicted as mean ±SEM.
14



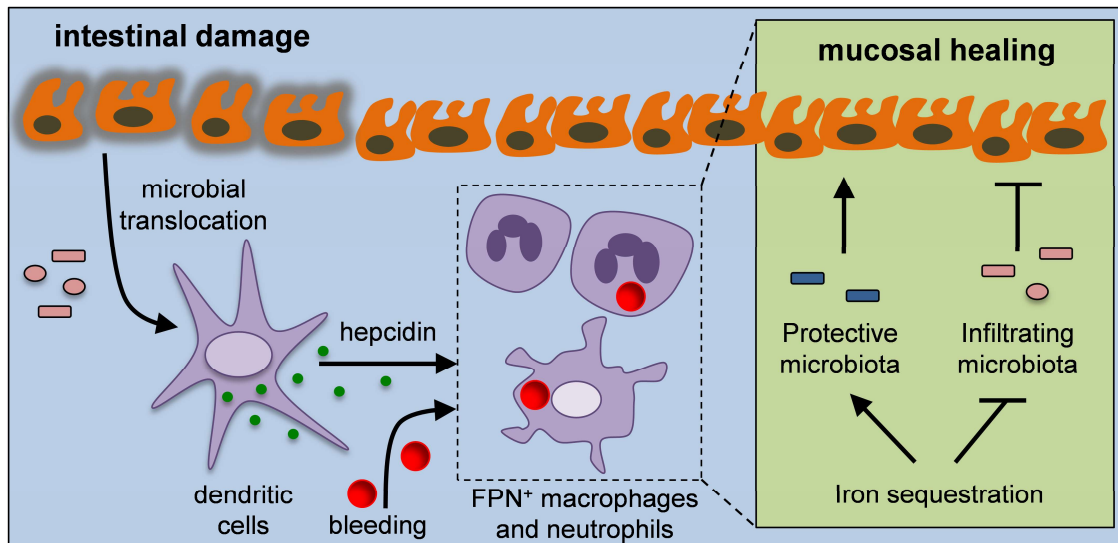
1

2

Fig. S11

Antibiotic treatment normalizes mucosal healing in hepcidin^{ΔDC} mice. Hepcidin^{ΔDC} and littermate control hepcidin^{F/F} mice on a broad-spectrum antibiotic cocktail were given DSS, and disease was monitored by weight loss (A), colon length (B), and colon histology (C). Scale bars are 200 microns. All data are representative of four to five individual mice (n=4-5) replicated in three independent experiments. Data are shown as the mean ±SEM.

8



1

2

Fig. S12

3 Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to promote mucosal healing.
 4 We mechanistically define a novel pathway of mucosal healing in the mammalian intestine. In
 5 brief, upon intestinal damage there is intestinal bleeding and an influx of microbes that activate
 6 DCs to produce hepcidin. DC-derived hepcidin targets ferroportin-expressing macrophages and
 7 neutrophils in the large intestine in order to block iron release into the extracellular compartment.
 8 This subsequently supports colonization with tissue-protective *Bifidobacterium* and limits
 9 colonization of tissue-infiltrating microbes following intestinal damage, collectively supporting
 10 optimal mucosal healing in the gut.

11

4. Résultats complémentaires et discussion

L'hepcidine, désormais bien connue pour sa régulation du fer via son action sur la FPN, a été initialement découverte comme un peptide antimicrobien de type β -Défensine (Krause et al., 2000). Ces peptides sont connus pour être exprimés par les épithélia et présentent des capacités bactéricides et/ou immuno-modulatrices. Nous nous sommes donc tout d'abord demandé si l'hepcidine est exprimée par l'épithélium intestinal. Nous avons isolé mécaniquement l'épithélium intestinal d'animaux sauvages et évalué l'expression de l'hepcidine dans les différents segments par RT-qPCR. Nous avons observé, du duodénum vers le colon, un gradient croissant d'expression de l'hepcidine par les cellules épithéliales (figure 35).

Afin de comprendre si l'hepcidine pouvait être impliquée dans les MICIs, nous avons évalué à nouveau par RT-qPCR le niveau d'expression de l'hepcidine chez des patients atteints de maladie de Crohn et de rectocolite ulcéreuse (UC) par rapport à des biopsies de tissus sains. L'expression de l'hepcidine est significativement augmentée aussi bien chez les patients Crohn que UC par rapport aux contrôles (figure 35). Afin de confirmer l'augmentation transcriptionnelle de l'hepcidine au niveau protéique, nous avons réalisé des marquages de l'hepcidine sur des biopsies de patients atteints de MICIs, grâce à une collaboration avec l'équipe du Professeur Sokol à l'Hôpital Saint-Antoine. Nous retrouvons bien l'augmentation de l'expression de l'hepcidine, majoritairement localisée du côté apical de l'épithélium chez les patients atteints de maladie de Crohn et du côté baso-latéral et apical chez les patients atteints de UC (figure 35).

Ces résultats suggèrent un rôle de l'hepcidine dans les MICIs : soit comme acteur bénéfique du maintien de l'homéostasie intestinale, et donc une surexpression chez les patients atteints pourrait s'expliquer comme une tentative de résolution de la situation inflammatoire; ou au contraire comme un acteur néfaste sur l'intégrité de la fonction de barrière intestinale, et sa surexpression serait associée à une situation inflammatoire aiguë.

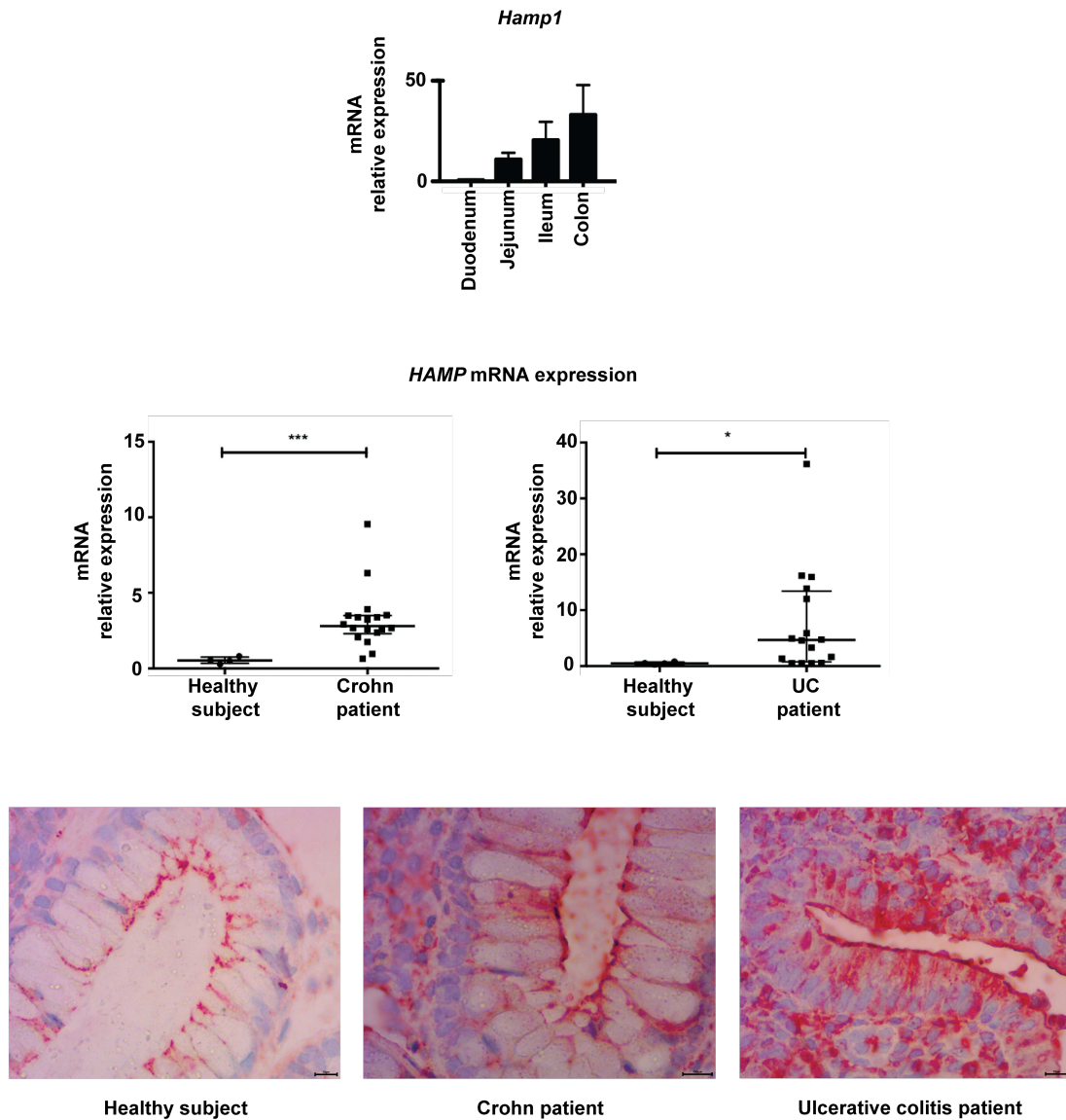


Figure 35. L'hepcidine est exprimée par l'intestin et dans les MICIs. En haut, gradient d'expression d'hepcidine évalué par RT-qPCR à partir d'extraits des différents segments intestinaux enrichis en cellules épithéliales intestinales. N=3. Au milieu, évaluation de l'expression de l'hepcidine dans des échantillons de patients atteints de Crohn ou de rectocolite hémorragique (UC) en comparaison avec des tissus sains. N>15. En bas, marquage immunohistochimique avec amplification de l'hepcidine sur des échantillons de patients atteints de Crohn ou de rectocolite hémorragique. On observe une expression de l'hepcidine en rouge de part et d'autre de l'épithélium. Contre-coloration hémalum. Grossissement 20X.

Dans ces deux contextes il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur le rôle de ce peptide dans les MICIs car il est probable de concevoir l'hepcidine comme une cible thérapeutique. De par son double aspect de peptide antimicrobien et de régulateur du fer intracellulaire, nous avons souhaité comprendre quel pouvait être le rôle de l'hepcidine dans le développement des MICIs. L'hepcidine, majoritairement produite par le foie, peut être aussi produite par d'autres organes, notamment en réponse à l'inflammation (Peyssonnaud et al., 2006; Smith et al., 2013). Afin de comprendre quelle source d'hepcidine pouvait être impliquée dans les MICIs, nous avons généré deux modèles d'inactivation du gène *Hamp1* spécifiquement 1) soit dans le foie, grâce au croisement d'animaux *Hamp1*^{lox/lox} avec des animaux exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de l'albumine; 2) soit dans les cellules épithéliales intestinales grâce au croisement d'animaux *Hamp1*^{lox/lox} avec des animaux exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de la villine (Madison et al., 2002). L'étude de ces deux modèles a pour but d'évaluer leur contribution propre dans les MICIs. Nous avons choisi de tirer avantage de deux différents modèles de MICIs classiquement utilisés : premièrement la colite induite par traitement au Dextran Sodium Sulfate (DSS), qui permet d'étudier la régénération du tissu après sa destruction par l'agent chimique et l'inflammation sévère qu'il provoque; et deuxièmement l'infection avec une bactérie Gram négatif : *Citrobacter Rodentium*. Ce second modèle permet de mimer un environnement similaire à celui retrouvé chez les patients atteints de MICIs où des bactéries formant des lésions attachantes et effaçantes sont fréquemment retrouvées (de type *Escherichia Coli* Entéro Hémorragique ou Entéro Pathogénique – EHEC ou EPEC).

4.1. Etude du rôle de l'hepcidine dans des modèles de colite induite au DSS

Etude de l'effet du DSS dans un modèle KO hepcidine hépatique élevé en animalerie EOPS

Nous avons tout d'abord souhaité comprendre si l'hepcidine produite par le foie pouvait avoir un rôle dans la re-épithélisation intestinale post-DSS. Les saignements générés par le DSS peuvent entraîner une stimulation de l'érythropoïèse et donc une modulation des besoins en fer du corps dans laquelle l'hepcidine hépatique peut être impliquée. Nous avons soumis des animaux contrôles ou invalidés pour l'hepcidine hépatique à un traitement de 7 jours au DSS administré dans l'eau de boisson.

Après ces 7 jours d'induction de la destruction de l'épithélium, nous avons remplacé le DSS par de l'eau de boisson habituelle pour permettre d'observer la régénération de la barrière intestinale. Afin de limiter les effets de modifications du microbiote intestinal, nous avons utilisé des animaux issus de la même portée et maintenus ensemble.

La surcharge en fer que présentent ces animaux n'impacte pas la régénération tissulaire intestinale comme le montre l'absence de différence de récupération du poids entre les animaux contrôles et *Hamp1Δ^{liver}* (figure 36). De plus, lors du sacrifice des animaux à J12, nous n'avons pas observé de différences de raccourcissement du colon entre les deux groupes (figure 36).

Nous nous sommes alors demandé si les saignements importants engendrés par le DSS pouvait entraîner une anémie chez les animaux contrôles ou une réduction de la surcharge en fer systémique chez les animaux *Hamp1Δ^{liver}* mais n'avons observé aucune différence de fer plasmatique après traitement au DSS (figure 36). De plus, l'étude de cytokines IL-10, IL-22, TNF α (figure 36) mais aussi IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-1 β , TGF β (Non montré) essentielles dans l'inflammation et la réponse immunitaire intestinale n'ont permis de

détecter aucune différence de réponse inflammatoire et immunitaire entre les animaux contrôles et les animaux *Hamp1* Δ^{liver} . Ces résultats indiquent que chez des animaux de 12 semaines, la surcharge martiale systémique et l'hepcidine hépatique ne sont pas impliqués dans le développement ou la résolution des colites chimiquement induites.

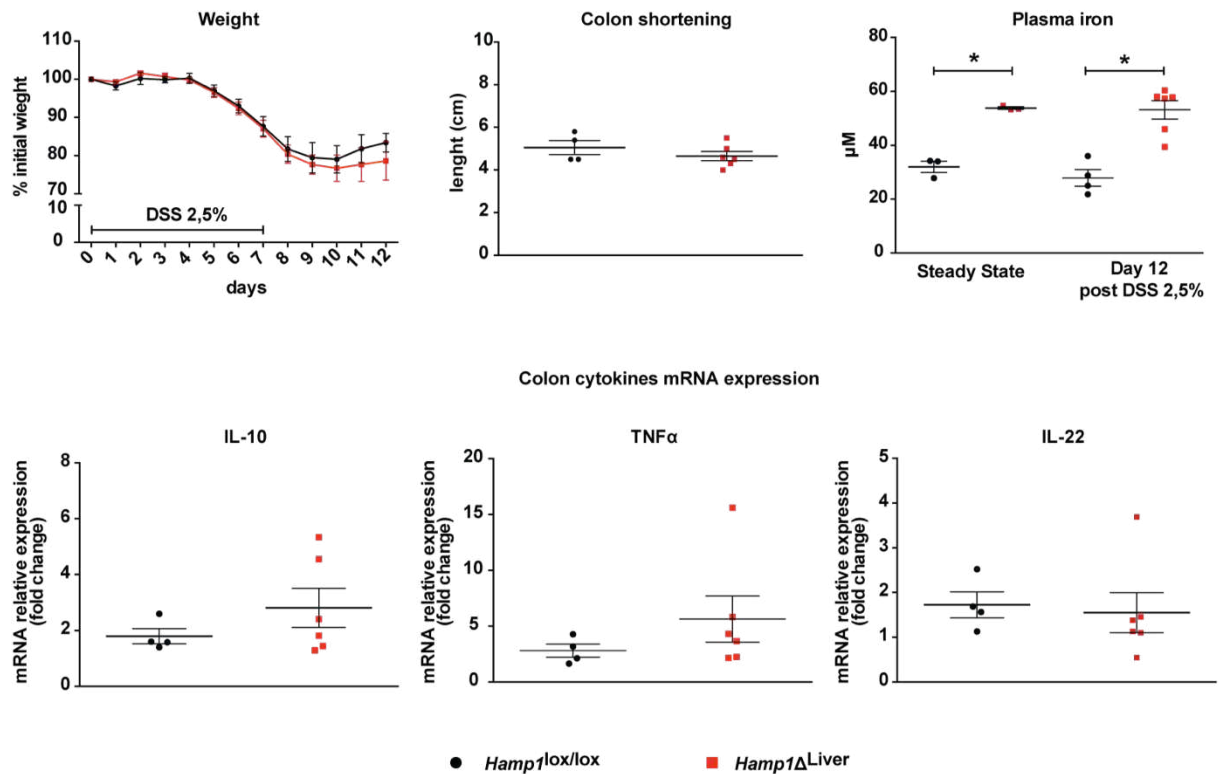


Figure 36. L'hepcidine hépatique n'est pas impliquée dans la régénération tissulaire après dommage au DSS 2,5%. En haut à gauche, suivi du poids des animaux au cours de l'expérience. En haut au milieu, mesure de la taille du colon à J12. En haut à droite, quantification colorimétrique du fer plasmatique à l'état basal et à J12. En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARNs issus du colon des animaux étudiés. Trois marqueurs représentatifs de la réponse inflammatoire sont présentés. Contrôles N=4; *Hamp1* Δ^{liver} N=6.

Etude de l'effet du DSS dans un modèle KO hepcidine IEC élevé en animalerie EOPS

Si l'hepcidine hépatique et la surcharge en fer systémique n'influencent pas le développement et la résolution des colites induites au DSS, il est possible que l'hepcidine intestinale exprimée par les cellules épithéliales de l'intestin puissent avoir un rôle soit de modulation locale du fer, particulièrement au niveau des cellules immunitaires; et/ou un rôle sur la modulation et la sélection du microbiote intestinal.

A l'aide de notre modèle *Hamp1* Δ^{IEC} , nous avons tout d'abord réalisé les mêmes expériences d'évaluation du développement et de la résolution de l'inflammation intestinale induite au DSS. A nouveau, ces expériences ont été réalisées sur des animaux issus d'une même portée maintenus ensemble pour limiter les effets de potentielles variations du microbiote intestinal sur l'éventuel phénotype.

Après avoir confirmé l'absence d'expression de l'hepcidine tout au long du tractus digestif des animaux invalidés en comparaison aux animaux sauvages, par RT-qPCR comme précédemment (figure 37), nous avons suivi l'évolution du poids des animaux jusqu'au sacrifice à J12. Aucune différence significative de poids n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes (figure 37). De plus, aucune différence de raccourcissement du colon post-DSS n'a été observée (figure 37). Nous pouvons cependant observer une absence de résolution de l'inflammation au cours de 12 jours, mais sans différence entre les deux groupes (figure 37). N'ayant observé aucune différence phénotypique, nous n'avons pas poussé notre étude au niveau transcriptionnel, protéique ou cellulaire dans ces conditions.

Etude de l'effet du DSS dans un modèle KO hepcidine IEC élevé en animalerie conventionnelle

N'ayant pas obtenu de différences significatives entre les souris *Hamp1* Δ^{IEC} et contrôle en animalerie EOPS, nous avons souhaité réévaluer l'effet du DSS sur ces mêmes deux

groupes génétiques mais dans des conditions d'élevage en animalerie conventionnelle. Le microbiote est connu pour réguler l'expression des peptides antimicrobiens, il était donc important de comprendre si la modification du microbiote en condition d'animalerie conventionnelle pouvait augmenter l'expression de l'hepcidine intestinale et exacerber son rôle en réponse au DSS. Cependant, nous n'avons pu observer de différences de perte de poids ou de taille du colon à J14 entre les deux groupes (figure 37). De plus l'étude des ARNm de cytokines participant à l'inflammation n'a pu mettre en évidence aucune variation entre les deux groupes (figure 37).

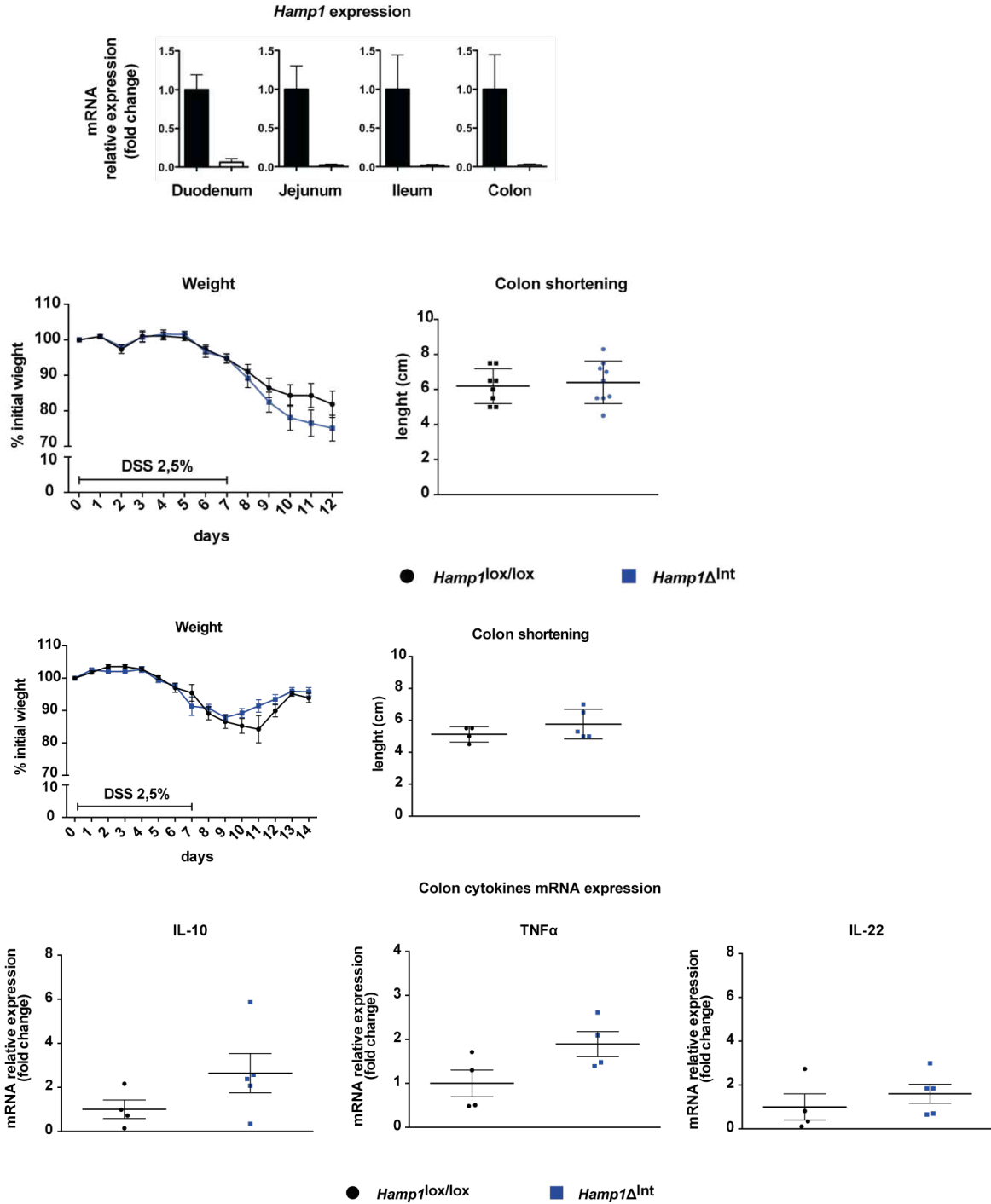


Figure 37. L'hepcidine des cellules épithéliales intestinales (IEC) n'est pas impliquée dans la régénération tissulaire après dommage au DSS 2,5%. En haut, vérification de l'absence d'expression de l'hepcidine par RT-qPCR dans les différents segments intestinaux enrichis en IEC chez des animaux contrôles (N=3) ou *Hamp1 Δ ^{IEC}* (N=3). Au milieu à gauche, suivi du poids des animaux issus d'une animalerie EOPS. au milieu à droite, mesure de la taille du colon à J12 issu d'une animalerie EOPS. Au milieu bas à gauche, suivi du poids des animaux issus d'une animalerie conventionnelle. Au milieu bas à droite, mesure de la taille du colon à J12 des animaux issus d'une animalerie conventionnelle. En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARNs issus du colon des animaux étudiés issus de l'animalerie conventionnelle. Trois marqueurs représentatifs de la réponse inflammatoire sont présentés. Contrôles N=4; *Hamp1 Δ ^{IEC}* N=65.

4.2. Etude de l'interaction hôte pathogène dans la colite induite par infection au *Citrobacter rodentium*

Citrobacter Rodentium est un pathogène spécifique de la souris. C'est une bactérie à Gram négatif de type *Escherichia Coli* adhérente, présentant 67% de gènes en commun avec les Entéro Hémorragiques *Escherichia Coli* (EHEC) ou les Entéro Pathogéniques *Escherichia Coli* (EPEC), notamment au niveau des facteurs de virulence, comme l'îlot de pathogénicité LEE (pour Locus of Enterocyte Effacement) permettant l'expression du facteur Ler, essentiel à la virulence du pathogène (Deng et al., 2004). Elle infecte l'intestin des souris en réalisant des lésions d'attachement et d'effacement avec une cinétique particulière entraînant des réactions immunitaires importantes et des diarrhées. Elle colonise en premier lieu le caecum au cours des 3-5 premiers jours post-infection, puis envahit le colon entre J5 et J14, avec un pic d'infection maximale aux alentours du 14e jour; et est enfin éliminée par les fèces en moyenne 21 jours après l'infection (Collins et al., 2014; Mullineaux-Sanders et al., 2017; Wiles et al., 2004; Wong et al., 2011) (figure 38).

Nous avons soumis des animaux contrôles et *Hamp1Δ^{IEC}* à une infection orale avec 10^{11} CFU de *C. rodentium* en phase exponentielle de croissance et avons réalisé le suivi de l'infection pendant 14 jours puis sacrifié les animaux pour récupérer les bactéries présentes dans le caecum, le colon, le foie, la rate et le sang. Le poids des animaux contrôles ne semble pas impacté par l'infection tandis que celui des animaux *Hamp1Δ^{IEC}* est fortement diminué à partir du 10e jour post-infection (figure 38). La quantité de bactéries retrouvée dans les excréments au cours de l'infection est de la même façon supérieure à J10 chez les animaux KO. En ce qui concerne la quantité de bactéries présentes de manière adhérente aux tissus du colon et du caecum, nous observons une légère tendance à l'augmentation chez les animaux KO sans différence significative (figure 38). Cette tendance se retrouve aussi dans les fèces de ces deux segments intestinaux (figure 38).

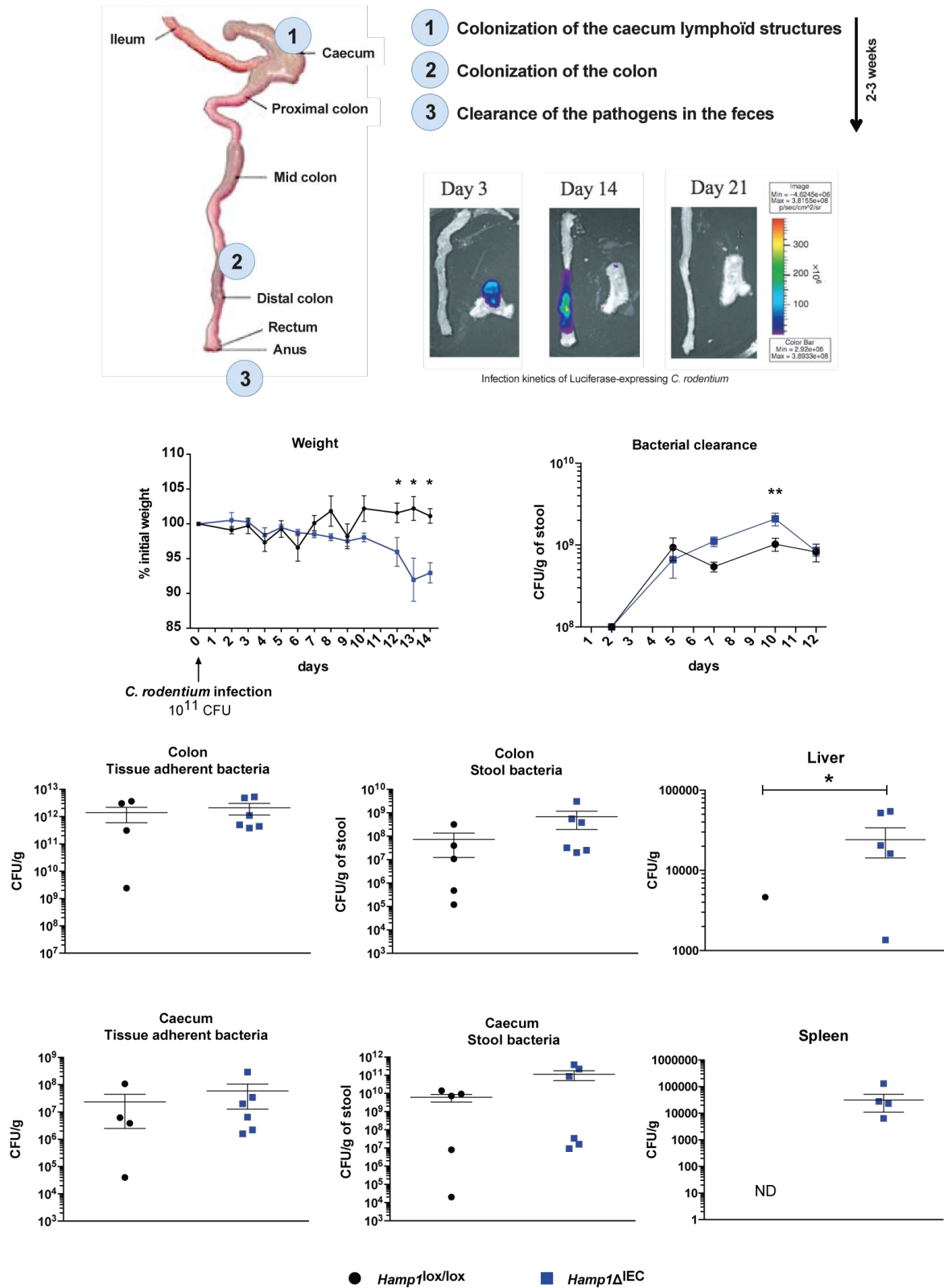


Figure 38. L'hepcidine des cellules épithéliales intestinales participe à la réponse immunitaire face à l'infection au *Citrobacter rodentium*. En haut, cinétique d'infection du tractus gastrique chez la souris. Adapté de James W. Collins, et al 2014; Alexander R. C. Wong et al 2011; Siouxsie Wiles et al., 2004 et Caroline Mullineaux-Sanders et al 2017. Au milieu haut à gauche, suivi du poids des animaux lors de l'infection. Au milieu haut à gauche, évaluation de la quantité de bactéries en CFU/g de fèces au cours de l'infection. En bas, évaluation de la quantité de bactéries en CFU/G d'organe ou de fèces chez les animaux contrôles (N=4) ou *Hamp1*^{ΔIEC} (N=6) dans le contenu du caecum, du colon, le tissu du caecum, du colon et les organes cibles de la dissémination du *Citrobacter rodentium*.

De façon surprenante, aucune bactérie n'a été retrouvée dans le sang des animaux mais nous avons observé une forte présence de bactéries dans le foie et dans la rate uniquement des animaux KO (figure 38). Ces résultats indiquent une susceptibilité accrue pour l'infection chez les animaux dépourvus d'hepcidine des cellules épithéliales de l'intestin. Cela semble avoir un impact important sur la dissémination systémique des bactéries soulignant un potentiel effet local protecteur de l'hepcidine intestinale.

Nous avons vu que l'hepcidine des cellules épithéliales de l'intestin est exprimée à la fois du côté apical et basolatéral de l'épithélium. Il est donc possible que l'hepcidine agisse par une ou plusieurs des fonctions suivantes : 1) activité antimicrobienne directe sur la pousse du *Citrobacter rodentium*; 2) Modulation de la réponse immunitaire; 3) Modulation indirecte de l'infection par régulation du microbiote et compétition (figure 39).

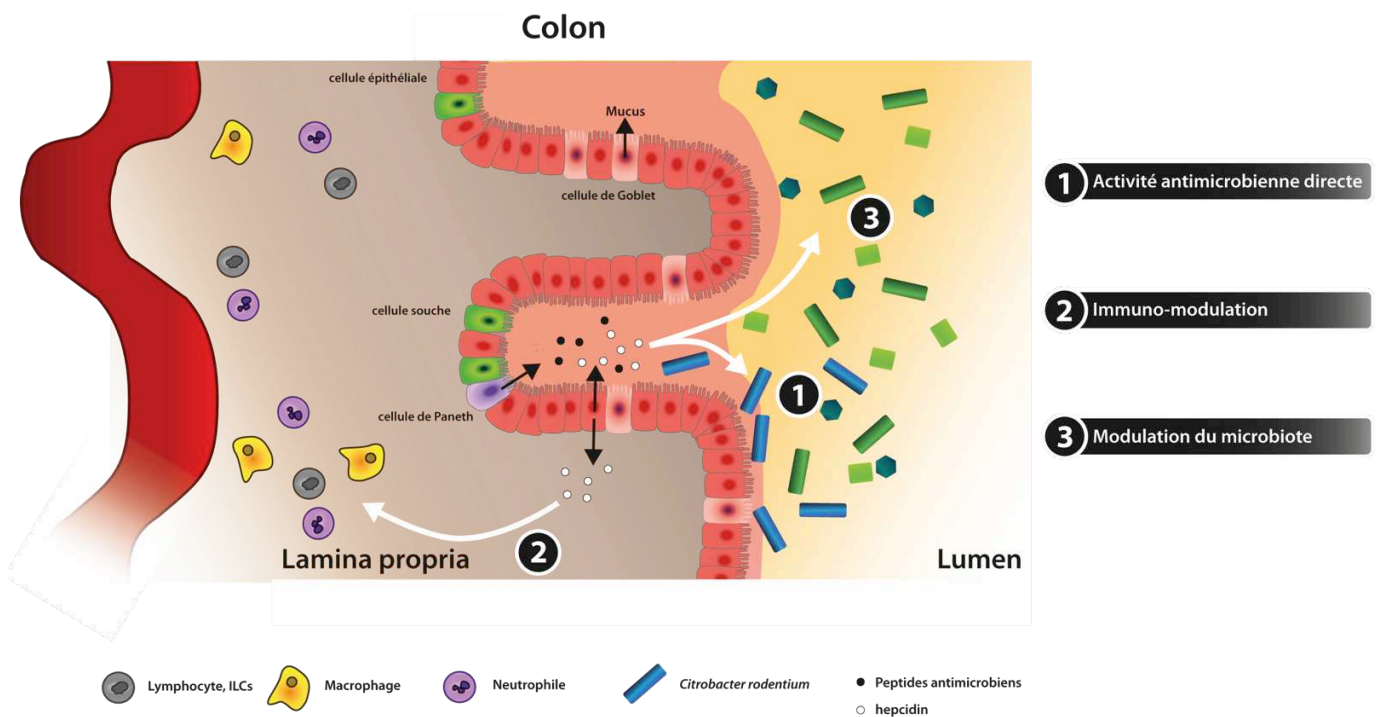


Figure 39. Résumé graphique des modes d'action possibles de l'hepcidine dans la réponse à l'infection par *Citrobacter rodentium*. 1) l'hepcidine peut avoir des propriétés d'action antimicrobienne directe par ses similarités avec les Beta-défensines. 2) L'hepcidine peut agir en tant qu'immunomodulateur par ses propriétés de peptide antimicrobien (chimioattraction et immunomodulation) ou en modifiant les quantités de fer intracellulaire des phagocytes de la lamina propria. 3) L'hepcidine peut moduler la composition du microbiote et ainsi favoriser les défenses de l'hôte contre l'infection au *Citrobacter rodentium*.

4.2.1. L'hepcidine - action bactériostatique directe sur la croissance de *Citrobacter rodentium*

Afin d'évaluer l'effet direct comme agent répresseur de la croissance du *Citrobacter rodentium*, nous avons suivi la pousse du *C. rodentium* dans un incubateur à 37°C équipé d'un spectrophotomètre pour réaliser des lectures de l'OD600nm au cours du temps, en présence ou en absence d'hepcidine en doses croissantes. L'hepcidine ayant été retrouvée sous différentes formes de 25, 22 et 20 acides aminés, nous avons voulu comprendre si une de ces trois formes pouvait être bioactive pour ralentir la pousse du *Citrobacter rodentium*. De plus, il est bien établi que les conditions physicochimiques, tel que le pH, peuvent influencer grandement l'effet d'un peptide antimicrobien. Nous avons donc réalisé ces tests à pH=7 et à pH=5, pouvant faciliter l'action antimicrobienne. L'ajout de pénicilline/streptomycine aux doses les plus faibles (1%) entraîne la mort de l'intégralité des bactéries de la même façon quelque soit le pH. En revanche il semble qu'aucune des formes 25, 22 ou 20 ne possède une activité bactériostatique directe sur la croissance du *C. rodentium* et ce quelque soit le pH (figure 40). En revanche il serait important de réitérer l'expérience en utilisant comme contrôle positif un peptide antimicrobien comme wrwycr (Lackraj et al., 2016) afin de pouvoir comparer dans ces mêmes conditions l'activité antimicrobienne connu pour être efficace. Il serait aussi important de compléter l'évaluation de l'activité bactériostatique par l'évaluation d'une activité bactéricide directe en mesurant le nombre CFU après 1,3 et 6h d'incubation en présence de chacune des formes de l'hepcidine par exemple.

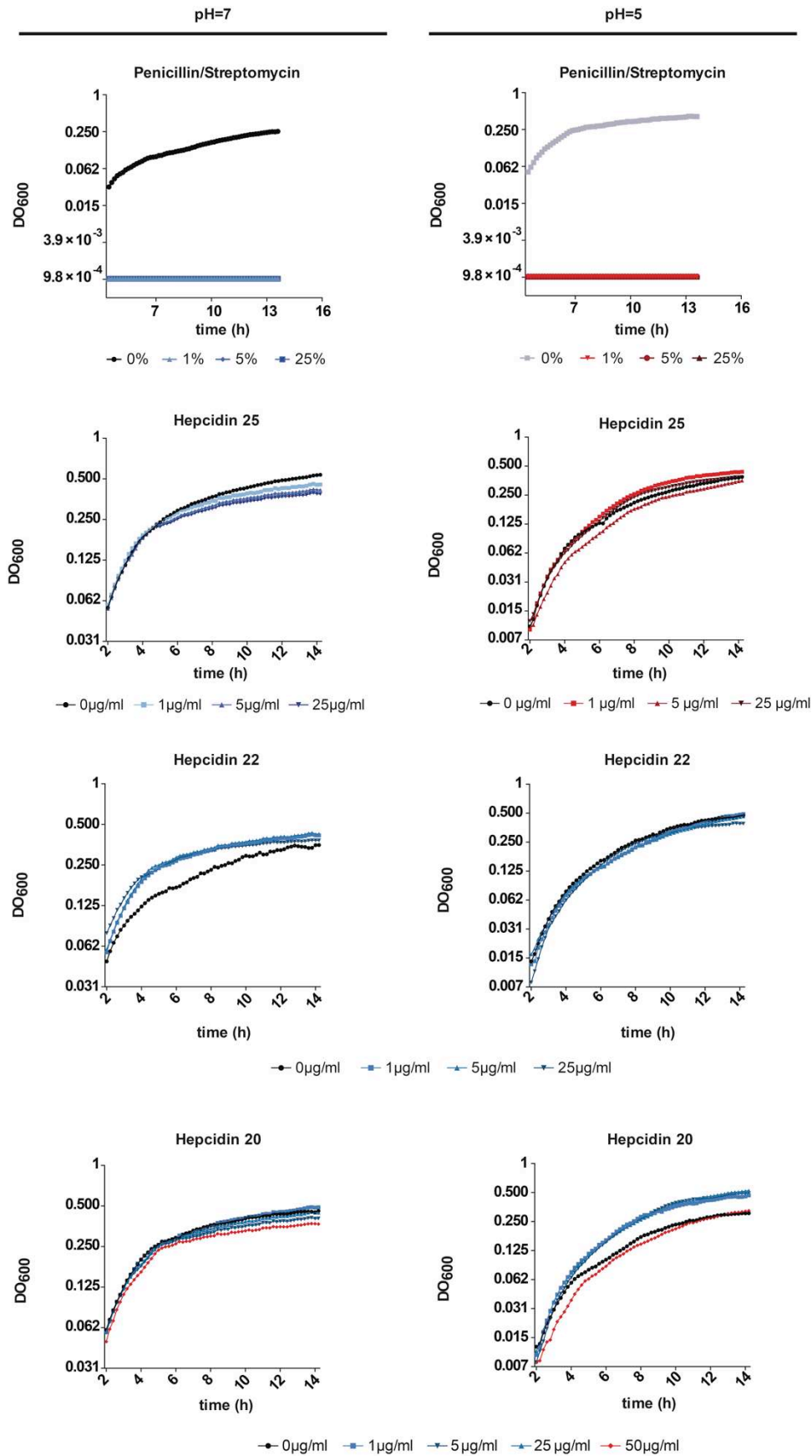


Figure 40. Les différentes formes de l'hepcidine ne possèdent pas d'activité bactériostatique directe sur la croissance du *C. rodentium*. A gauche, cinétique de croissance du *C. rodentium* en présence de chaque forme de l'hepcidine en comparaison avec la présence de Penicilline/streptomycine (P/S) à pH=7. A droite, cinétique de croissance du *C. rodentium* en présence de chaque forme de l'hepcidine en comparaison avec la présence de Penicilline/streptomycine (P/S) à pH=5.

4.2.2. L'hepcidine - action d'immunomodulation et maintien de l'intégrité de la barrière intestinale

Dans le but d'identifier le rôle de l'hepcidine dans la réponse à l'infection au *C. rodentium*, nous avons évalué l'intégrité de la barrière intestinale et l'inflammation locale par RT-qPCR sur lysats de tissus totaux. Au niveau du caecum, nous avons observé des diminutions des ARNm codants pour des protéines de jonctions serrées tels que ZO-1 et Occludine, mais aussi du peptide antimicrobien β -Défensine 1 chez les animaux KO (figure 41). Ceci suggère une altération de l'intégrité de la barrière chez les animaux KO au niveau caecal à J14. Cette altération peut être à l'origine du passage en systémique des bactéries chez les animaux KO. L'inflammation locale du caecum à J14 semble être moins forte chez les animaux KO avec une diminution du TGF β . A l'inverse par contre, nous observons chez les animaux KO une tendance à l'augmentation de l'expression de l'IL-10, de Granzyme B, de REGIIIIB, et des s100a8 et s100a9 sans variation de l'IL-22 et l'IL-17A et F (non montrés) suggérant une réponse complexe et contradictoire avec la présence à la fois de signaux de défense mais aussi de tolérogénicité (figure 41).

Au niveau du colon, nous n'observons aucune différence d'expression transcriptionnelle de ces protéines de jonctions ou de ces peptides antimicrobiens. De la même façon, nous observons une absence d'augmentation du TNF α associée à une tendance à l'augmentation de l'IL-10 et du s100a8 et s100a9 suggérant un défaut de réponse inflammatoire potentiellement de au maintien d'un signal anti-inflammatoire soutenu (figure 41). Le TNF α est une cytokine inflammatoire exprimée par la quasi-totalité des cellules immunitaires, épithéliales et endothéliales, assurant un rôle de signalisation de l'inflammation majeur. Sa réduction ici semble être à l'origine d'un défaut de réponse inflammatoire face à l'infection.

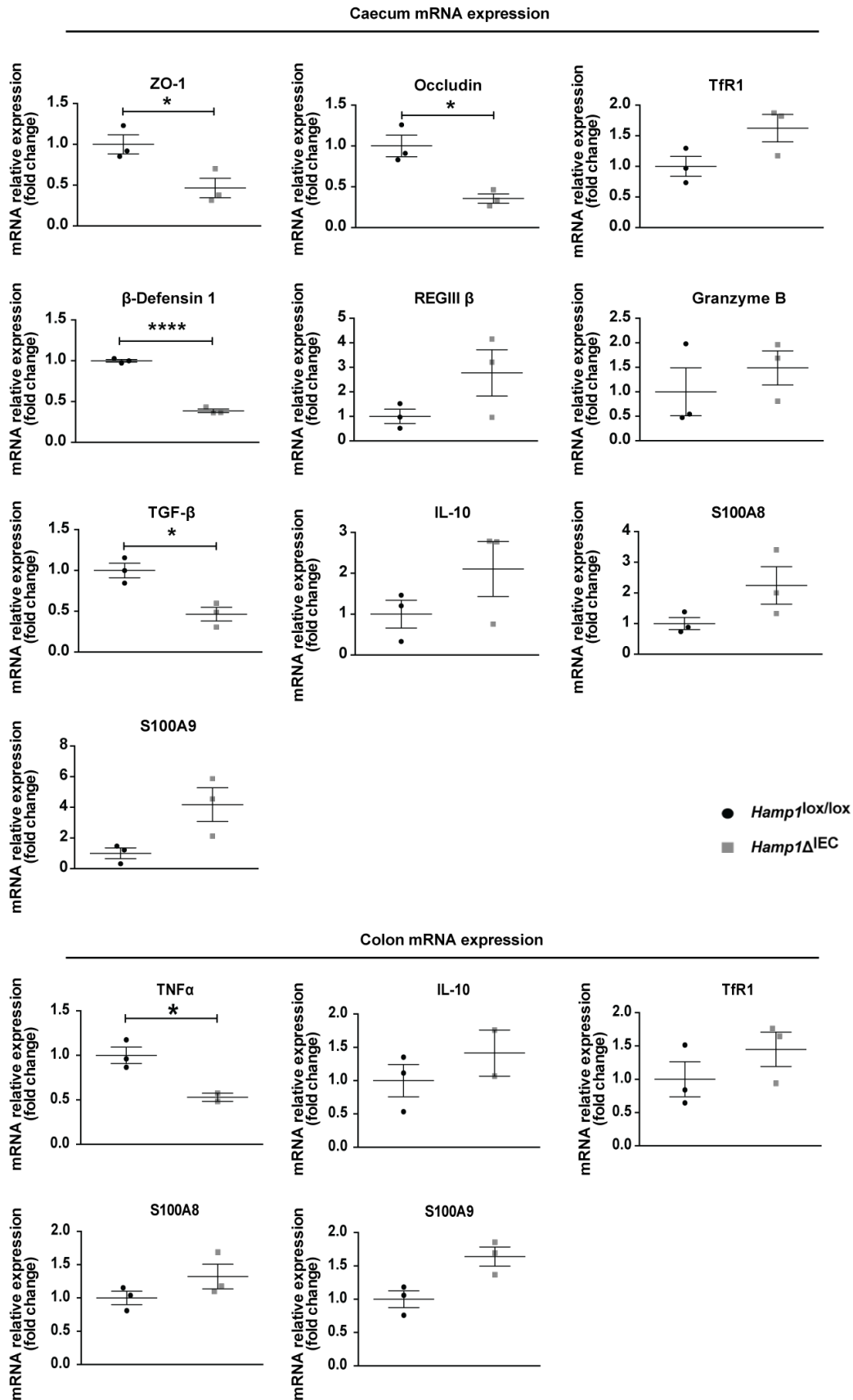


Figure 41. L'hepcidine semble impliquée dans l'intégrité de la barrière intestinale à J14 en réponse à l'infection par *C. rodentium*. En haut, RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux issus du caecum des animaux contrôles ou *Hamp1^{ΔIEC}* à J14. En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux issus du colon distal des animaux contrôles ou *Hamp1^{ΔIEC}* à J14. Contrôle N= 3; *Hamp1^{ΔIEC}* N= 3.

L'IL-10 est connue pour être une cytokine anti-inflammatoire associée à une différenciation lymphocytaire régulatrice limitant les réponses inflammatoires de type Th17 et Th1. Les s100a8 et s100a9 sont des protéines liant le calcium, majoritairement exprimées par les neutrophiles et les monocytes, jouant un rôle dans la chimio-attraction des leucocytes sur le site inflammatoire. Les substances antimicrobiennes actives telles que la Beta-Défensine 1, REGIIIIB ou le Granzyme B sont des acteurs directs dans la destruction des pathogènes. Leur réduction semble ici suggérer un manque de réponse bactéricide face à l'infection au *C. rodentium*.

De façon intéressante, dans ces deux parties de l'intestin, il semble que le Récepteur à la Transferrine (TfR1) tende à être augmenté chez les animaux KO suggérant un rôle local de l'hepcidine sur les cellules de la lamina propria en réponse à l'infection au *C. rodentium* à J14 (figure 41). En effet, si l'hepcidine agit du côté baso-latéral sur la FPN des cellules immunes, son absence pourrait induire une stabilisation de la FPN et consécutivement une perte du fer intracellulaire résultant en une augmentation du messenger de TfR1 par le système IRE/IRP.

Si l'étude de ces messagers reste informative et facile à réaliser et à exploiter, il est essentiel de quantifier ces cytokines et protéines de jonctions au niveau protéique via des quantifications par ELISAs et des marquages immuno-histochimiques. De plus, il serait impératif d'évaluer la présence en nombre et en qualité des différentes populations immunitaires d'intérêt, notamment les neutrophiles et les cellules dendritiques, en réponse à l'infection au *C. rodentium* chez ces deux groupes d'animaux. Ainsi nous pourrions identifier des différences d'activation ou des défauts de recrutement de certaines cellules immunitaires qui pourrait expliquer la dissémination systémique du *C. rodentium* uniquement chez les animaux KO. Nous avons ensuite voulu évaluer la réponse immunitaire systémique à J14. Pour cela nous avons analysé le sang de chaque animal pour obtenir la Numération de la Formule Sanguine (NFS). Les deux groupes contrôles et *Hamp1* Δ^{IEC} semblent avoir une réponse immunitaire similaire à J14 avec une augmentation

des lymphocytes, des monocytes et des granulocytes dans les mêmes proportions entre les deux groupes (figure 42).

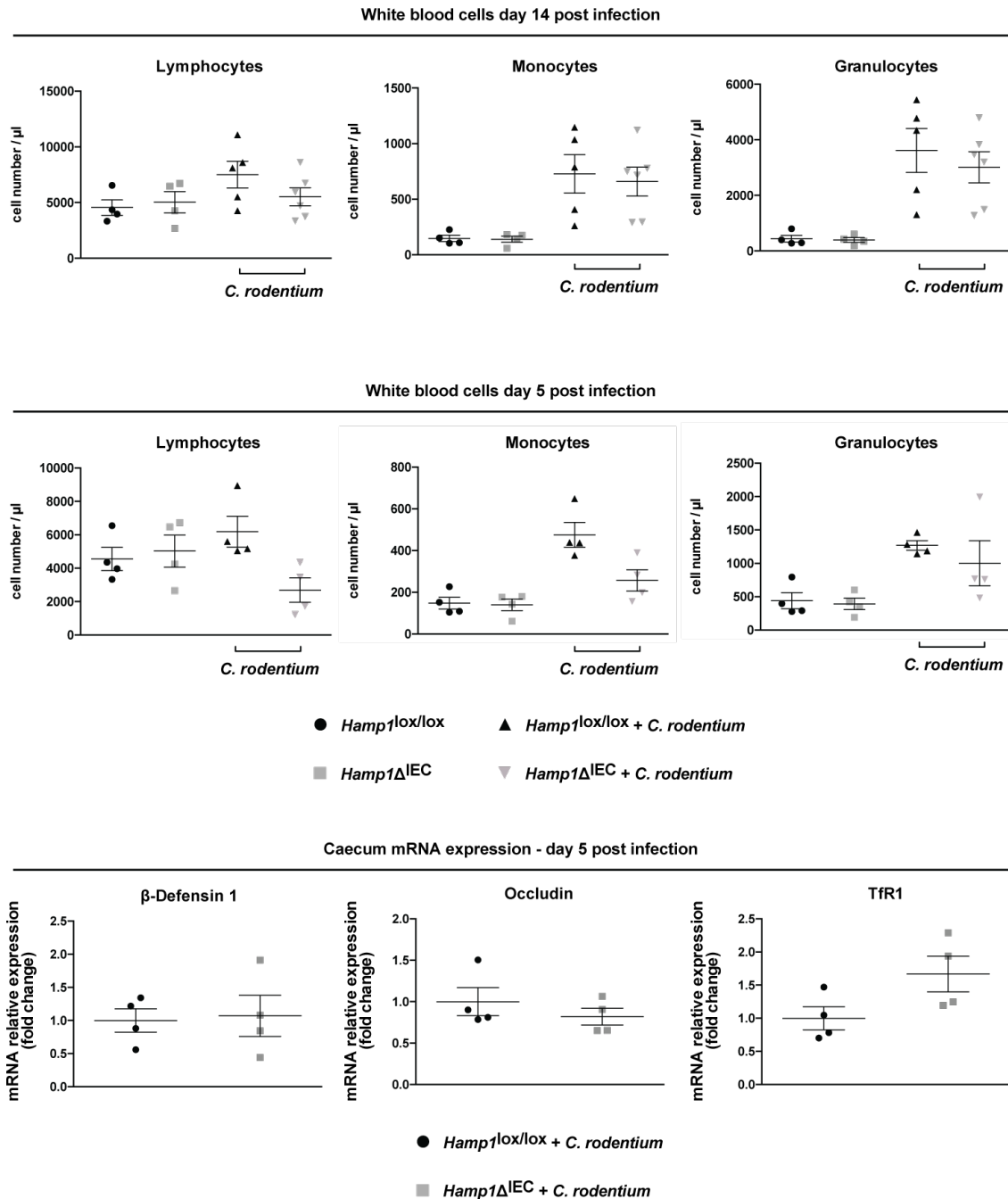


Figure 42. L'hepcidine participe à la réponse immunitaire systémique lors de l'infection par *Citrobacter rodentium*. En haut, numération sanguine en conditions basales ou à J14 post-infection chez des animaux contrôles (N>4) ou *Hamp1*^{ΔIEC} (N>4). Au milieu, numération sanguine en conditions basales ou à J5 post-infection chez des animaux contrôles (N=4) ou *Hamp1*^{ΔIEC} (N=4). En bas, RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux issus du caecum des animaux contrôles ou *Hamp1*^{ΔIEC} à J5. Contrôle N= 4; *Hamp1*^{ΔIEC} N= 4.

Afin de comprendre la cinétique d'infection et les défauts potentiels de réponse des souris mutantes lors de l'infection au *C. rodentium*, nous avons réitéré l'infection en sacrifiant cette fois-ci les animaux à J5 afin d'évaluer plus en détail les phases précoces de l'infection au niveau du caecum notamment.

Comme précédemment, aucune différence de perte de poids n'est observable à cette période de l'infection (non montré). En revanche à J5, nous observons une absence d'augmentation de la réponse immunitaire systémique chez les animaux KO, aussi bien au niveau lymphocytaire, monocytaire que granulocytaire (figure 42). A ce stade de l'infection, les différences observées au niveau de l'expression des protéines de jonctions serrées ou des peptides antimicrobiens ne sont pas présentes (figure 42). Ceci suggère que les animaux KO ne présentent pas une altération de la barrière intestinale en basal (qu'il serait important de confirmer à J0) mais plutôt que le pathogène *C. rodentium* a une facilité chez ces animaux à réaliser ses lésions attachantes et effaçantes, et à pénétrer en systémique chez l'hôte. Cette facilité peut être dû à un défaut de capacité de chimioattraction des neutrophiles comme décrit récemment par notre équipe dans la peau (Malerba et al., 2020). Nous pouvons aussi suspecter une modification de l'activation des cellules immunitaires du chorion par modification des niveaux de fer intracellulaires potentiellement (cf TfR1 figure 42) et de la transmission du message infectieux/inflammatoire en systémique. Il serait intéressant d'évaluer l'état de l'infection à plus long terme (à J21 par exemple) afin de comprendre si l'infection qui est connue pour être complètement éliminée chez des animaux sains persiste chez les animaux KO.

4.2.3. Effet de l'hepcidine sur la barrière intestinale lors du développement

Afin de comprendre le rôle de l'hepcidine sur l'intégrité de la barrière intestinale, nous avons généré des cultures d'organoïdes *in vitro* à partir de cryptes du petit intestin issues de souris contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} . Après 4 jours de différenciation des organoïdes en matrigel en milieu supplémenté en facteurs de croissances (Miyoshi and Stappenbeck, 2013), et réalisé une extraction d'ARN à partir de ces cellules. L'expression de ZO-1, Occludine et REGIIIB ne varie pas entre les conditions WT et KO (figure 43) comme observé dans les expériences d'infections au *C. rodentium* à J5. En revanche, il semble que l'expression de la REGIIIG et la Beta-Défensine 1 soit réduite en basal dans les organoïdes issus de souris KO (figure 43) soulignant une modification de la capacité de défense de la barrière en basal. De plus, nous retrouvons en l'absence des cellules immunitaires, la tendance à l'augmentation de Tfr1 (figure 43).

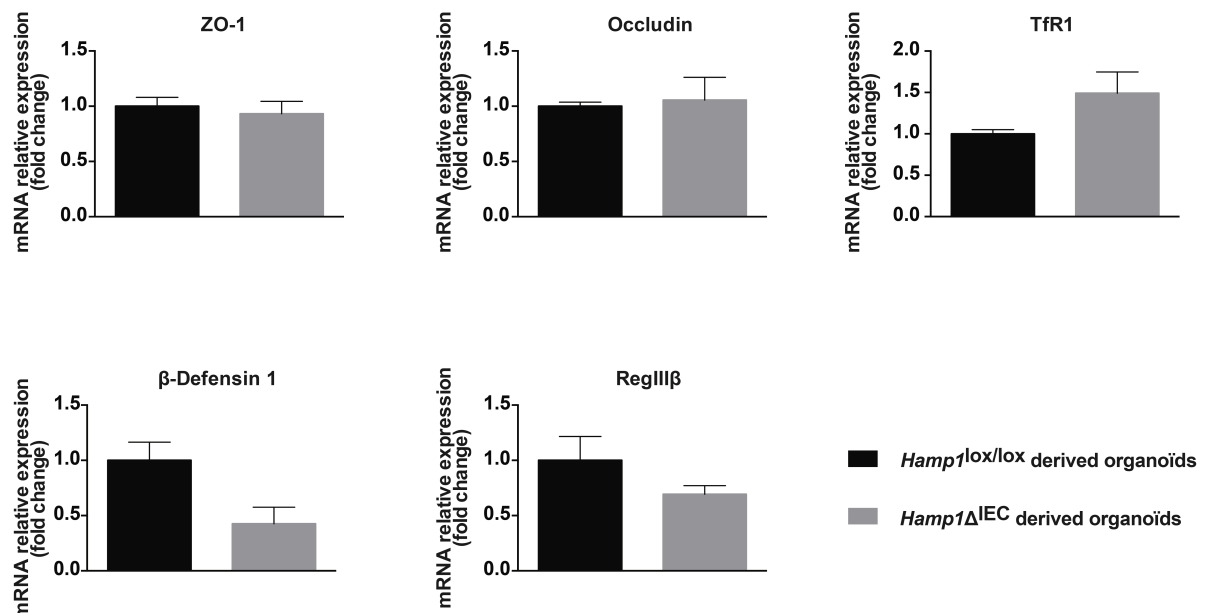


Figure 43. L'hepcidine exprimée par les cellules épithéliales influence les défenses immunitaires de l'épithélium intestinal. Evaluation par RT-qPCR des marqueurs d'intégrité et de défense de l'épithélium intestinal dans des extraits d'ARN totaux issus d'organoïdes intestinaux. Les organoïdes ont été générés à partir de cryptes du petit intestin d'animaux contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} cultivés en matrigel en présence de facteurs de croissance. Expérience représentative de deux expériences indépendantes, N=3 dans chaque groupe.

4.2.4. L'hepcidine - modulateur du microbiote intestinal

Comme observé dans les coupes histologiques de biopsies de patients atteints de Crohn et d'UC, l'hepcidine est à la fois exprimée du côté apical et basolatéral de l'entérocyte. De part sa structure de type Beta-défensine et sa fonction restreinte de peptide antimicrobien, nous avons fait l'hypothèse que, l'hepcidine pouvait participer à la régulation du microbiote intestinal. Afin d'investiguer cet axe de recherche, nous avons séparé les animaux contrôles ou *Hamp1Δ^{IEC}* au sevrage avant de réaliser des prélèvements de fèces et d'organes pour une évaluation de la dysbiose intestinale par l'étude de l'ADN 16s bactérien (Janda and Abbott, 2007). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que l'absence d'hepcidine est associée à une diminution de l' α diversité au niveau de l'iléon et du colon comme l'indiquent la diminution de valeur de Shannon et de Simpson chez les animaux *Hamp1Δ^{IEC}* (figure 44). Les animaux invalidés pour l'hepcidine des cellules épithéliales intestinales présentent une augmentation des Bactéries Filamenteuses Segmentées (SFB), du phylum Firmicutes et apparentées aux Clostridium, connues pour être associées à une réponse de type Th17 (figure 44) (Ivanov et al., 2009). Ces bactéries sont connues pour favoriser l'apparition de sévères colites (Stepankova et al., 2007). Cependant, à l'inverse des corrélations observées ici, les SFB ont aussi été décrites comme induisant une protection face à l'infection au *C. rodentium* (Ivanov et al., 2009). Il est important de noter que cette acquisition de protection est possible chez des animaux axéniques mono colonisés par des SFB et que dans notre contexte, l'augmentation des SFB associée aux autres acteurs du microbiote et à la diminution de la diversité peut au contraire induire une facilité de colonisation du *C. rodentium*.

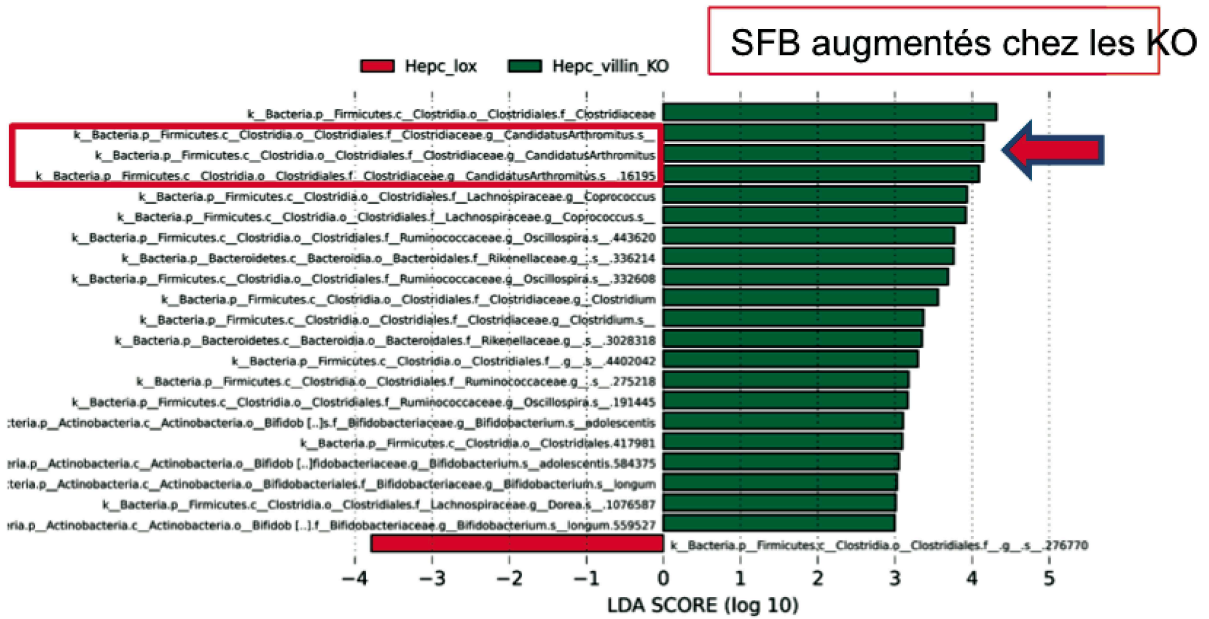
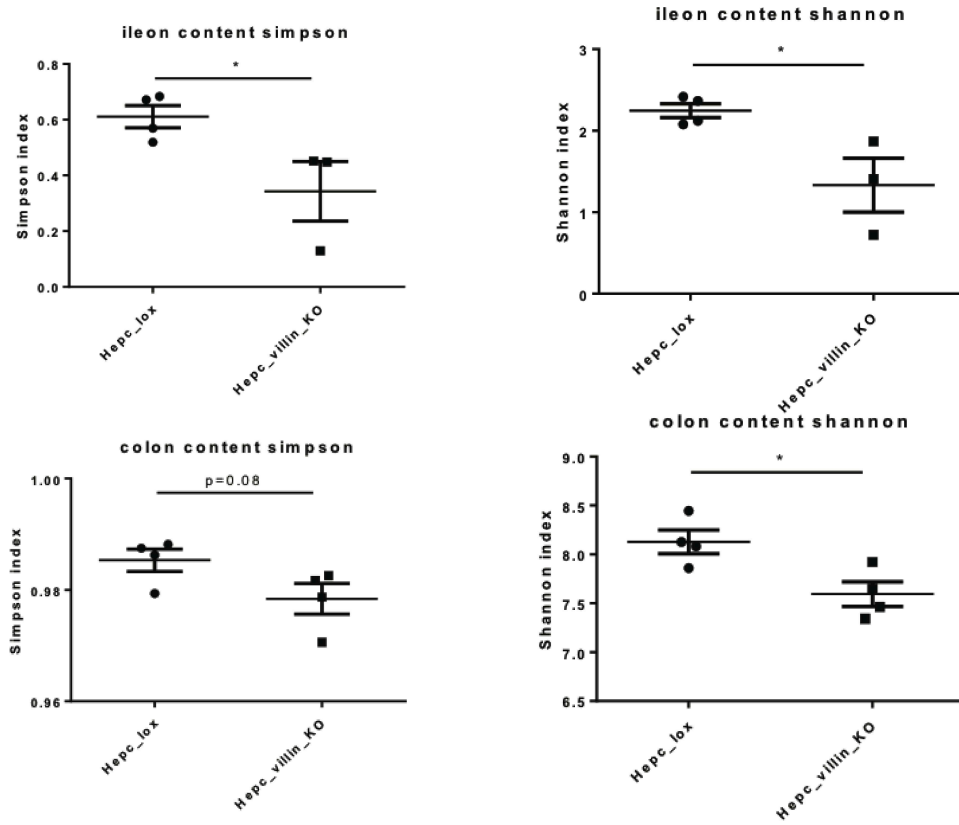


Figure 44. Les animaux *Hamp1Δ^{IEC}* présentent une dysbiose en comparaison aux animaux contrôles. En haut, évaluation de l'alpha diversité de la richesse du microbiote par les index de Shannon et de Simpson sur des échantillons de contenu intestinal de l'iléon et du colon. En bas, analyse comparative de l'enrichissement dans chaque phylum de bactéries retrouvés chez les animaux *Hamp1Δ^{IEC}* en comparaison aux contrôles. N=4.

Afin d'évaluer si la dysbiose observée chez les animaux *Hamp1* Δ^{IEC} est impliquée dans le développement ou la résolution des colites, nous avons transplanté le microbiote d'animaux contrôles ou *Hamp1* Δ^{IEC} dans des hôtes prétraités aux antibiotiques pendant 3 semaines et élevés ensemble. A la suite de 5 semaines de transplantations fécales, nous avons réalisé une induction de colite par ajout de DSS dans l'eau de boisson pendant 7 jours, comme précédemment. Après 7 jours de retour à l'eau de boisson classique nous avons sacrifié les animaux. L'évolution du poids des animaux s'est révélée similaire entre les deux groupes transplantés de même que le raccourcissement du colon à J14 (figure 45). De plus, aucune variation de réponse des différentes populations immunitaires n'a pu être observée en systémique (figure 45). Si la dysbiose ne semble pas avoir induit de modification de la réponse au DSS, nous n'avons aucune preuve d'un maintien d'une colonisation complète du microbiote issu des animaux KO chez l'hôte. De plus, il est possible que l'hepcidine présente ait induit des sélections dans le microbiote issu des animaux KO. Cependant, il serait intéressant d'évaluer l'effet du transfert de la dysbiose des animaux KO sur la susceptibilité à l'infection par *C. rodentium*. Il est donc difficile de conclure de ces expériences et il est essentiel de réitérer les expériences de DSS sur des animaux *Hamp1*^{lox/lox} et *Hamp1* Δ^{IEC} séparés depuis la naissance afin de comprendre l'influence de la dysbiose sur la régénération intestinale post-DSS. De plus, après confirmation de l'efficacité du transfert fécal, il est nécessaire d'évaluer la capacité d'infection du *C. rodentium* chez des animaux transplantés avec le microbiote de souris contrôles versus *Hamp1* Δ^{IEC} . Nous pourrions envisager l'utilisation de bioréacteurs simulants le tractus digestif (Pro-Digest SHIME pour évaluer *ex vivo* l'effet de l'hepcidine sur la modulation et la dérive d'un microbiote issu de souris KO. De plus, il serait important d'envisager la transplantation fécale chez des animaux axéniques pour favoriser la colonisation du microbiote reçu et réduire les effets néfastes des antibiotiques.

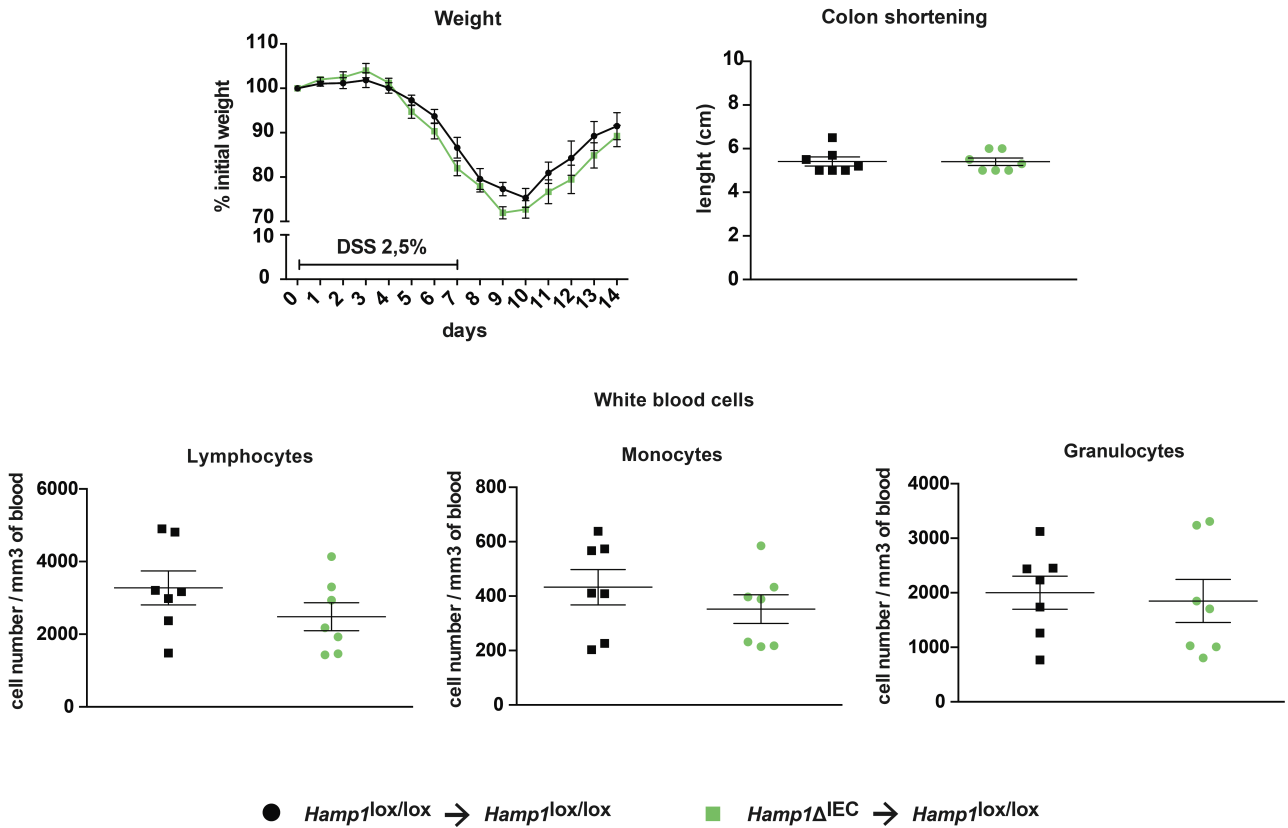


Figure 45. Le microbiote des animaux *Hamp1*^{ΔIEC} n'est pas suffisant pour induire une diminution de la régénération tissulaire post-DSS 2,5%. Transplantation fécale de la flore des animaux contrôles ou *Hamp1*^{ΔIEC} dans des animaux contrôles déplétés de leur flore par traitement aux antibiotiques. En haut à gauche, suivi du poids des animaux étudiés. En haut à droite, mesure de la taille du colon à J14. En bas, numération sanguine des animaux contrôles ou *Hamp1*^{ΔIEC} à J14. Contrôles N=7 ; *Hamp1*^{ΔIEC} N=7.

5. Conclusions

Il est urgent de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des MICIs. Nous apportons aujourd'hui de nouvelles informations sur le rôle local de l'hepcidine intestinale dans la relation hôte-pathogène, le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et la régénération tissulaire post-inflammation. Nous avons identifié plusieurs contributeurs à la production de l'hepcidine intestinale, notamment les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 et les cellules épithéliales de l'intestin. L'hepcidine des cellules dendritiques intestinales semble essentielle pour l'induction d'un message de séquestration du fer locale en réponse aux dommages post-DSS. En effet, cette séquestration du fer permet une régulation du microbiote intestinal bénéfique pour la régénération des tissus et la diminution de l'inflammation. L'hepcidine des cellules épithéliales semble, quant à elle, plutôt impliquée dans le maintien de la réponse aux agents infectieux, comme les EHEC et EPEC, fréquemment associées aux MICIs. Si l'hepcidine est bien connue pour son rôle sur l'homéostasie du fer systémique, nous identifions un nouveau rôle de régulateur du fer local et considérons à nouveau ce peptide tel qu'identifié à l'origine : un peptide antimicrobien. Si dans les conditions étudiées, ce peptide ainsi que ses formes plus courtes ne semble pas modifier la croissance du pathogène *Citrobacter rodentium*, il est possible qu'il puisse moduler l'environnement local de la flore intestinal et favoriser la colonisation de certaines souches, comme cela semble être le cas lorsque les animaux sont séparés. Ce peptide semble donc contribuer au contexte inflammatoire intestinal et pourrait de plus agir comme modulateur de l'immunité, comme récemment démontré par notre équipe dans un contexte d'infection cutanée aux Streptocoques de Groupe A (Malerba et al., 2020).

REFERENCES

- Abboud, S., Haile, D.J., 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 275, 19906–19912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000713200>
- Addo, L., Ikuta, K., Tanaka, H., Toki, Y., Hatayama, M., Yamamoto, M., Ito, S., Shindo, M., Sasaki, Y., Shimonaka, Y., Fujiya, M., Kohgo, Y., 2016. The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *Int. J. Hematol.* 103, 34–43. <https://doi.org/10.1007/s12185-015-1885-y>
- Aisen, P., Leibman, A., Zweier, J., 1978. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* 253, 1930–1937.
- Andriopoulos, 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. *Nat. Genet.* 41, 482–487. <https://doi.org/10.1038/ng.335>
- Arese, P., Turrini, F., Schwarzer, E., 2005. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 16, 133–146. <https://doi.org/10.1159/000089839>
- Arezes, J., Foy, N., Mchugh, K., Sawant, A., Quinkert, D., Terraube, V., Brinth, A., Tam, M., Lavallie, E.R., Taylor, S., Armitage, A.E., Pasricha, S.-R., Cunningham, O., Lambert, M., Draper, S.J., Jasuja, R., Drakesmith, H., 2018. Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood* 132, 1473–1477. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-857995>
- Aschemeyer, S., Qiao, B., Stefanova, D., Valore, E.V., Sek, A.C., Ruwe, T.A., Vieth, K.R., Jung, G., Casu, C., Rivella, S., Jormakka, M., Mackenzie, B., Ganz, T., Nemeth, E., 2018. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* 131, 899–910. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786590>
- Aziz, N., Munro, H.N., 1987. Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *PNAS* 84, 8478–8482. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8478>
- Bali, P.K., Zak, O., Aisen, P., 1991. A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry* 30, 324–328. <https://doi.org/10.1021/bi00216a003>
- Beaumont, C., Delaby, C., 2009. Recycling iron in normal and pathological states. *Semin. Hematol.* 46, 328–338. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2009.06.004>
- Beinert, H., Holm, R.H., Münck, E., 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653–659. <https://doi.org/10.1126/science.277.5326.653>
- Berner, R.A., Beerling, D.J., Dudley, R., Robinson, J.M., Wildman, R.A., 2003. Phanerozoic Atmospheric Oxygen. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 31, 105–134. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.31.100901.141329>
- Boas, F.E., Forman, L., Beutler, E., 1998. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3077–3081.
- Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Borregaard, N., Cowland, J.B., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503–3521.
- Boussetta, T., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Hayem, G., Ciappelloni, S., Raad, H., Arabi Derkawi, R., Bournier, O., Krowiarski, Y., Zhou, X.Z., Malter, J.S., Lu, P.K., Bartegi, A., Dang, P.M.-C., El-Benna, J., 2010. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 116, 5795–5802. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-273094>
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.P., Estaquier, J., Huart, J.J., Ameisen, J.C., Aminoff, D., Montreuil, J., 1998. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80, 173–195. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(98\)80024-2](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(98)80024-2)
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 577–582. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1710>
- Brock, J.H., 1989. Iron-binding Proteins. *Acta Paediatrica* 78, 31–43. <https://doi.org/10.1111/apa.1989.78.s361.31>

- Brown, G.E., Stewart, M.Q., Bissonnette, S.A., Elia, A.E.H., Wilker, E., Yaffe, M.B., 2004. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 279, 27059–27068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314258200>
- Burdon, P.C.E., Martin, C., Rankin, S.M., 2008a. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *British Journal of Haematology* 142, 100–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07018.x>
- Burdon, P.C.E., Martin, C., Rankin, S.M., 2008b. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *Br. J. Haematol.* 142, 100–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07018.x>
- Burger, D., Kwart, D.G., Montezano, A.C., Read, N.C., Kennedy, C.R.J., Thompson, C.S., Touyz, R.M., 2012. Microparticles Induce Cell Cycle Arrest Through Redox-Sensitive Processes in Endothelial Cells: Implications in Vascular Senescence. *J Am Heart Assoc* 1. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001842>
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., Gasparini, P., 2000. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet.* 25, 14–15. <https://doi.org/10.1038/75534>
- Campion, Y., Paclét, M.-H., Jesaitis, A.J., Marques, B., Grichine, A., Berthier, S., Lenormand, J.-L., Lardy, B., Stasia, M.-J., Morel, F., 2007. New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie* 89, 1145–1158. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.010>
- 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. *Am. J. Hematol.* 92, 1204–1213. <https://doi.org/10.1002/ajh.24888>
- Canfield, D.E., 2005. THE EARLY HISTORY OF ATMOSPHERIC OXYGEN: Homage to Robert M. Garrels. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 33, 1–36. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.33.092203.122711>
- Canonne-Hergaux, F., Donovan, A., Delaby, C., Wang, H., Gros, P., 2006. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G156-163. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00227.2005>
- Cantinieux, B., Hariga, C., Ferster, A., De Maertelaere, E., Toppet, M., Fondu, P., 1987. Neutrophil dysfunctions in thalassaemia major: the role of cell iron overload. *Eur. J. Haematol.* 39, 28–34. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1987.tb00159.x>
- Carpenter, C.E., Mahoney, A.W., 1992. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr* 31, 333–367. <https://doi.org/10.1080/10408399209527576>
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P.S., Castrillo, A., Hidalgo, A., 2013. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025–1035. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.040>
- Cascão, R., Rosário, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E., 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 9, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.013>
- Casu, C., Nemeth, E., Rivella, S., 2018. Heparin agonists as therapeutic tools. *Blood* 131, 1790–1794. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-737411>
- Chassaing, B., Van de Wiele, T., De Bodt, J., Marzorati, M., Gewirtz, A.T., 2017. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut* 66, 1414–1427. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313099>
- Cheng, H., Zheng, Z., Cheng, T., 2020. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* 11, 34–44. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0>
- Cianetti, L., Segnalini, P., Calzolari, A., Morsilli, O., Felicetti, F., Ramoni, C., Gabbianelli, M., Testa, U., Sposi, N.M., 2005. Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. *Haematologica* 90, 1595–1606.
- Cohen, A.R., Galanello, R., Piga, A., Dipalma, A., Vullo, C., Tricta, F., 2000. Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicentre study. *Br. J. Haematol.* 108, 305–312. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01866.x>
- Collins, J.W., Keeney, K.M., Crepin, V.F., Rathinam, V.A.K., Fitzgerald, K.A., Finlay, B.B., Frankel, G., 2014. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* 12, 612–623. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3315>
- Couffinhal, T., Duplâa, C., Moreau, C., Lamazière, J.M., Bonnet, J., 1994. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74, 225–234. <https://doi.org/10.1161/01.res.74.2.225>

- Crielaard, B.J., Lammers, T., Rivella, S., 2017. Targeting iron metabolism in drug discovery and delivery. *Nat Rev Drug Discov* 16, 400–423. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.248>
- Dang, P.M.-C., Cross, A.R., Quinn, M.T., Babior, B.M., 2002. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4262–4265. <https://doi.org/10.1073/pnas.072345299>
- Dang, P.M.-C., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O.N., Gougerot-Pocidallo, M.-A., El-Benna, J., 2006. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 116, 2033–2043. <https://doi.org/10.1172/JCI27544>
- Das, N.K., Schwartz, A.J., Barthel, G., Inohara, N., Liu, Q., Sankar, A., Hill, D.R., Ma, X., Lamberg, O., Schnizlein, M.K., Arqués, J.L., Spence, J.R., Nunez, G., Patterson, A.D., Sun, D., Young, V.B., Shah, Y.M., 2020. Microbial Metabolite Signaling Is Required for Systemic Iron Homeostasis. *Cell Metab.* 31, 115–130.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.005>
- De Domenico, I., Lo, E., Ward, D.M., Kaplan, J., 2009. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3800–3805. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900453106>
- De Domenico, I., Ward, D.M., di Patti, M.C.B., Jeong, S.Y., David, S., Musci, G., Kaplan, J., 2007. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* 26, 2823–2831. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601735>
- De La Luz Sierra, M., Gasperini, P., McCormick, P.J., Zhu, J., Tosato, G., 2007. Transcription factor Gfi-1 induced by G-CSF is a negative regulator of CXCR4 in myeloid cells. *Blood* 110, 2276–2285. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081448>
- Deaglio, S., Capobianco, A., Cali, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, A., Camaschella, C., Malavasi, F., 2002. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* 100, 3782–3789. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0076>
- Delaby, C., Pilard, N., Hetet, G., Driss, F., Grandchamp, B., Beaumont, C., Canonne-Hergaux, F., 2005. A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Experimental Cell Research* 310, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.002>
- Delaby, C., Rondeau, C., Pouzet, C., Willemetz, A., Pilard, N., Desjardins, M., Canonne-Hergaux, F., 2012. Subcellular Localization of Iron and Heme Metabolism Related Proteins at Early Stages of Erythrophagocytosis. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042199>
- DeLeo, F.R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J.P., Nauseef, W.M., 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 101, 455–463.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., Finlay, B.B., 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3597–3602. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400326101>
- Deshpande, C.N., Ruwe, T.A., Shawki, A., Xin, V., Vieth, K.R., Valore, E.V., Qiao, B., Ganz, T., Nemeth, E., Mackenzie, B., Jormakka, M., 2018. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat Commun* 9, 3075. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05446-4>
- Deugnier, Y., Morcet, J., Lainé, F., Hamdi-Roze, H., Bollard, A.-S., Guyader, D., Moirand, R., Bardou-Jacquet, E., 2019. Reduced phenotypic expression in genetic hemochromatosis with time: Role of exposure to non-genetic modifiers. *J. Hepatol.* 70, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.009>
- Dienz, O., Rud, J.G., Eaton, S.M., Lanthier, P.A., Burg, E., Drew, A., Bunn, J., Suratt, B.T., Haynes, L., Rincon, M., 2012. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol* 5, 258–266. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.2>
- 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, 776–781. <https://doi.org/10.1038/35001596>
- Drakesmith, H., Nemeth, E., Ganz, T., 2015. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 22, 777–787. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>
- Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., Link, D.C., 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* 120, 2423–2431. <https://doi.org/10.1172/JCI141649>

- Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W., Link, D.C., 2009. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 113, 4711–4719. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-177287>
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Dang, P.M.-C., 2016. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* 273, 180–193. <https://doi.org/10.1111/immr.12447>
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5, 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>
- 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., Meyer, N.C., Mintier, G.A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C.E., Quintana, L., Starnes, S.M., Schatzman, R.C., Brunke, K.J., Drayna, D.T., Risch, N.J., Bacon, B.R., Wolff, R.K., 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 13, 399–408. <https://doi.org/10.1038/ng0896-399>
- Fiedler, K., Brunner, C., 2012. Mechanisms Controlling Hematopoiesis. <https://doi.org/10.5772/33749>
- Fields, A.C., Grindon, A.J., 1999. Hemochromatosis, iron, and blood donation: a short review. *Immunohematology* 15, 108–112.
- Flament, J., Goldman, M., Waterlot, Y., Dupont, E., Wybran, J., Vanherweghem, J.L., 1986. Impairment of phagocyte oxidative metabolism in hemodialyzed patients with iron overload. *Clin. Nephrol.* 25, 227–230.
- Flanagan, D.J., Austin, C.R., Vincan, E., Pheesse, T.J., 2018. Wnt Signalling in Gastrointestinal Epithelial Stem Cells. *Genes (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/genes9040178>
- Fleit, H.B., Wright, S.D., Unkeless, J.C., 1982. Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3275–3279. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3275>
- Franco, R.S., 2012. Measurement of Red Cell Lifespan and Aging. *Transfus Med Hemother* 39, 302–307. <https://doi.org/10.1159/000342232>
- Franco, R.S., 2009. The measurement and importance of red cell survival. *Am. J. Hematol.* 84, 109–114. <https://doi.org/10.1002/ajh.21298>
- Frishman, D., Hentze, M.W., 1996. Conservation of Aconitase Residues Revealed by Multiple Sequence Analysis. *European Journal of Biochemistry* 239, 197–200. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0197u.x>
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Furze, R.C., Rankin, S.M., 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125, 281–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x>
- Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., Recalcati, S., 2014. Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics* 6, 1336–1345. <https://doi.org/10.1039/C4MT00104D>
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I., 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76, 1427–1435. <https://doi.org/10.1172/JC112120>
- Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A.-S., Enns, C.A., 2009. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.* 9, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.010>
- Gätjen, M., Brand, F., Grau, M., Gerlach, K., Kettritz, R., Westermann, J., Anagnostopoulos, I., Lenz, P., Lenz, G., Höpken, U.E., Rehm, A., 2016. Splenic Marginal Zone Granulocytes Acquire an Accentuated Neutrophil B-Cell Helper Phenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* 76, 5253–5265. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3486>
- Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., Pantopoulos, K., 2012. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.013>
- Gotfryd, K., Jurek, A., Kubit, P., Klein, A., Turyna, B., 2011. Iron Inhibits Respiratory Burst of Peritoneal Phagocytes In Vitro. *ISRN Urol* 2011. <https://doi.org/10.5402/2011/605436>
- Gottlieb, Y., Truman, M., Cohen, L.A., Leichtmann-Bardoogo, Y., Meyron-Holtz, E.G., 2012. Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica* 97, 1489–1493. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.063651>
- Graham, L.M., Gupta, V., Schafer, G., Reid, D.M., Kimberg, M., Dennehy, K.M., Hornsell, W.G., Guler, R., Campanero-Rhodes, M.A., Palma, A.S., Feizi, T., Kim, S.K., Sobieszczuk, P., Willment, J.A., Brown, G.D., 2012. The C-type lectin receptor CLECSF8 (CLEC4D) is expressed by myeloid cells and triggers cellular activation through Syk kinase. *J. Biol. Chem.* 287, 25964–25974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384164>

- Graham, R.M., Reutens, G.M., Herbison, C.E., Delima, R.D., Chua, A.C.G., Olynyk, J.K., Trinder, D., 2008. Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *J. Hepatol.* 48, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.10.009>
- Gräsbeck, R., Kouvonon, I., Lundberg, M., Tenhunen, R., 1979. An Intestinal Receptor for Heme. *Scandinavian Journal of Haematology* 23, 5–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1979.tb02845.x>
- Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S.J., Rittinger, K., 2003. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113, 343–355. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00314-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00314-3)
- Groom, A.C., Schmidt, E.E., MacDonald, I.C., 1991. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning Microsc.* 5, 159–173; discussion 173-174.
- Gulati, V., Harikrishnan, P., Palaniswamy, C., Aronow, W.S., Jain, D., Frishman, W.H., 2014. Cardiac involvement in hemochromatosis. *Cardiol Rev* 22, 56–68. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e3182a67805>
- Gulec, S., Anderson, G.J., Collins, J.F., 2014. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 307, G397–G409. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00348.2013>
- Gunshin, H., Starr, C.N., Drenzo, 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, 2879–2883. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0716>
- Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y., Leibold, E.A., 1995. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 270, 21645–21651. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21645>
- Gutzeit, C., Magri, G., Cerutti, A., 2014. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* 260, 76–85. <https://doi.org/10.1111/imr.12189>
- Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B., Kennedy, M.C., Blondin, G.A., Beinert, H., Klausner, R.D., 1992. Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *PNAS* 89, 11735–11739. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11735>
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007–3017.
- Harbeby, E., 2011. Impact de l’apport alimentaire en AGPI n-3 sur le métabolisme énergétique cérébral : approches in vivo chez le rat en situation de repos ou d’activation neuronale et in vitro sur un modèle d’astrocytes en culture primaire.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10812–10817.
- Hassan, T.H., Badr, M.A., Karam, N.A., Zkaria, M., El Saadany, H.F., Abdel Rahman, D.M., Shahbah, D.A., Al Morshedy, S.M., Fathy, M., Esh, A.M.H., Selim, A.M., 2016. Impact of iron deficiency anemia on the function of the immune system in children. *Medicine (Baltimore)* 95. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005395>
- Heath, K.M., Axton, J.H., McCullough, J.M., Harris, N., 2016. The evolutionary adaptation of the C282Y mutation to culture and climate during the European Neolithic. *Am. J. Phys. Anthropol.* 160, 86–101. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22937>
- Henderson, B.R., Menotti, E., Kühn, L.C., 1996. Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct sets of RNA target sequences. *J. Biol. Chem.* 271, 4900–4908. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.4900>
- Hentze, M.W., Caughman, S.W., Rouault, T.A., Barriocanal, J.G., Dancis, A., Harford, J.B., Klausner, R.D., 1987. Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science* 238, 1570–1573. <https://doi.org/10.1126/science.3685996>
- Hoepelman, I.M., Jaarsma, E.Y., Verhoef, J., Marx, J.J.M., 1988. Polynuclear iron complexes impair the function of polymorphonuclear granulocytes. *British Journal of Haematology* 68, 385–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1988.tb04219.x>
- Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E., Tenen, D.G., 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5830–5845. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.10.5830>
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411, 599–603. <https://doi.org/10.1038/35079107>
- Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Højrup, P., Møller, H.J., Moestrup, S.K., 2005. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* 106, 2572–2579. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1185>
- Igarashi, K., Sun, J., 2006. The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 107–118. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.107>

- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D.R., 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Iwai, K., Klausner, R.D., Rouault, T.A., 1995. Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *The EMBO Journal* 14, 5350–5357. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00219.x>
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jandl, J.H., Katz, J.H., 1963. THE PLASMA-TO-CELL CYCLE OF TRANSFERRIN*. *J Clin Invest* 42, 314–326.
- Jeong, S.Y., David, S., 2003. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ceruloplasmin Is Required for Iron Efflux from Cells in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* 278, 27144–27148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301988200>
- Johnsen, K.B., Burkhart, A., Thomsen, L.B., Andresen, T.L., Moos, T., 2019. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Prog. Neurobiol.* 181, 101665. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101665>
- Johnson, N.B., Deck, K.M., Nizzi, C.P., Eisenstein, R.S., 2017. A synergistic role of IRP1 and FBXL5 proteins in coordinating iron metabolism during cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 292, 15976–15989. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.785741>
- Kamp, V.M., Pillay, J., Lammers, J.-W.J., Pickkers, P., Ulfman, L.H., Koenderman, L., 2012. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1011–1020. <https://doi.org/10.1189/jlb.0612273>
- Kaplan, J., McVey Ward, D., Crisp, R.J., Philpott, C.C., 2006. Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Cell Biology of Metals* 1763, 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.03.008>
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, 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. *J. Biol. Chem.* 274, 20826–20832. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20826>
- Kay, M., 2005. Immunoregulation of cellular life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1057, 85–111. <https://doi.org/10.1196/annals.1356.005>
- Ke, Y., Wu, J., Leibold, E.A., Walden, W.E., Theil, E.C., 1998. Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. Fine-tuning of mRNA regulation? *J. Biol. Chem.* 273, 23637–23640. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23637>
- Kim, H.K., De La Luz Sierra, M., Williams, C.K., Gulino, A.V., Tosato, G., 2006. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 108, 812–820. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4162>
- Knutson, M., Wessling-Resnick, M., 2003. Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38, 61–88. <https://doi.org/10.1080/713609210>
- Knutson, M.D., Oukka, M., Koss, L.M., Aydemir, F., Wessling-Resnick, M., 2005. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1324–1328. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409409102>
- Kramer, F., Torzewski, J., Kamenz, J., Veit, K., Hombach, V., Dedio, J., Ivashchenko, Y., 2008. Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop. *Mol. Immunol.* 45, 2678–2689. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.12.017>
- 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 Lett.* 480, 147–150. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01920-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01920-7)
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., Moestrup, S.K., 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198–201. <https://doi.org/10.1038/35051594>
- Kühn, L.C., 2015. Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. *Metallomics* 7, 232–243. <https://doi.org/10.1039/C4MT00164H>
- Kurtoğlu, E., Ugur, A., Baltacı, A.K., Mogolkoc, R., Undar, L., 2003. Activity of neutrophil NADPH oxidase in iron-deficient anemia. *Biological Trace Element Research* 96, 109–115. <https://doi.org/10.1385/BTER:96:1-3:109>

- Lackraj, T., Johnson-Henry, K., Sherman, P.M., Goodman, S.D., Segall, A.M., Barnett Foster, D., 2016. Novel antimicrobial peptide prevents *C. rodentium* infection in C57BL/6 mice by enhancing acid-induced pathogen killing. *Microbiology (Reading, Engl.)* 162, 1641–1650. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000335>
- Lahoz-Beneytez, J., Elemans, M., Zhang, Y., Ahmed, R., Salam, A., Block, M., Niederaal, C., Asquith, B., Macallan, D., 2016. Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood* 127, 3431–3438. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-700336>
- Lakhal-Littleton, S., Wolna, M., Chung, Y.J., Christian, H.C., Heather, L.C., Brescia, M., Ball, V., Diaz, R., Santos, A., Biggs, D., Clarke, K., Davies, B., Robbins, P.A., n.d. An essential cell-autonomous role for hepcidin in cardiac iron homeostasis. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19804>
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., Brot, L., Taleb, S., Couturier-Maillard, A., Nion-Larmurier, I., Merabtene, F., Seksik, P., Bourrier, A., Cosnes, J., Ryffel, B., Beaugerie, L., Launay, J.-M., Langella, P., Xavier, R.J., Sokol, H., 2016. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* 22, 598–605. <https://doi.org/10.1038/nm.4102>
- Lamon, J.M., Marynick, S.P., Roseblatt, R., Donnelly, S., 1979. Idiopathic hemochromatosis in a young female. A case study and review of the syndrome in young people. *Gastroenterology* 76, 178–183.
- Lane, D.J.R., Bae, D.-H., Merlot, A.M., Sahni, S., Richardson, D.R., 2015. Duodenal Cytochrome b (DCYTB) in Iron Metabolism: An Update on Function and Regulation. *Nutrients* 7, 2274–2296. <https://doi.org/10.3390/nu7042274>
- Lang, K.S., Lang, P.A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S.M., Lang, F., 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.* 15, 195–202. <https://doi.org/10.1159/000086406>
- Lauble, H., Kennedy, M.C., Beinert, H., Stout, C.D., 1992. Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* 31, 2735–2748. <https://doi.org/10.1021/bi00125a014>
- Le Blanc, S., Garrick, M.D., Arredondo, M., 2012. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 302, C1780–1785. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00080.2012>
- Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., Wang, L., Beutler, E., 2005. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1906–1910. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409808102>
- Leliefeld, P.H.C., Pillay, J., Vrisekoop, N., Heeres, M., Tak, T., Kox, M., Rooijackers, S.H.M., Kuijpers, T.W., Pickkers, P., Leenen, L.P.H., Koenderman, L., 2018. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv* 2, 1344–1355. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017015578>
- Les fondamentaux de la pathologie digestive [WWW Document], n.d. . VG librairie. URL <https://www.vg-librairies.fr/ecn/2970-les-fondamentaux-de-la-pathologie-digestive.html> (accessed 1.21.20).
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., Dunn, A.R., 1994. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84, 1737–1746.
- Lim, J.E., Jin, O., Bennett, C., Morgan, K., Wang, F., Trenor, C.C., Fleming, M.D., Andrews, N.C., 2005. A mutation in Sec151 causes anemia in hemoglobin deficit (hbd) mice. *Nat. Genet.* 37, 1270–1273. <https://doi.org/10.1038/ng1659>
- Lin, W., Liu, S., Hu, L., Zhang, S., 2014. Characterization and bioactivity of hepcidin-2 in zebrafish: Dependence of antibacterial activity upon disulfide bridges. *Peptides* 57, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.04.014>
- Liu, S., Chirkov, Y.Y., Horowitz, J.D., 2018. Neutrophil-Initiated Myocardial Inflammation and Its Modulation by B-Type Natriuretic Peptide: A Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20010129>
- Lundberg, R., Toft, M.F., August, B., Hansen, A.K., Hansen, C.H.F., 2016. Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes* 7, 68–74. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127463>
- Lutz, H.U., 2004. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 50, 107–116.
- Lynch, S.R., Cook, J.D., 1980. Interaction of vitamin C and iron. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 355, 32–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb21325.x>
- Madison, B.B., Dunbar, L., Qiao, X.T., Braunstein, K., Braunstein, E., Gumucio, D.L., 2002. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J. Biol. Chem.* 277, 33275–33283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204935200>
- Makni-Maalej, K., Marzaioli, V., Boussetta, T., Belabri, S.A., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Hurtado-Nedelec, M., Dang, P.M.-C., El-Benna, J., 2015. TLR8, but not TLR7, induces the priming of the NADPH oxidase activation in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 97, 1081–1087. <https://doi.org/10.1189/jlb.2A1214-623R>

- Malerba, M., Louis, S., Cuvellier, S., Shambat, S.M., Hua, C., Gomart, C., Fouet, A., Ortonne, N., Decousser, J.-W., Zinkernagel, A.S., Mathieu, J.R.R., Peyssonnaud, C., 2020. Epidermal hepcidin is required for neutrophil response to bacterial infection. *J Clin Invest* 130, 329–334. <https://doi.org/10.1172/JCI126645>
- Manicassamy, S., Pulendran, B., 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol. Rev.* 241, 206–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x>
- Manwani, D., Frenette, P.S., 2013. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood* 122, 3892–3898. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-498311>
- Martin, C., Burdon, P.C.E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Williams, T.J., Rankin, S.M., 2003. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 19, 583–593. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00263-2)
- Matzner, Y., Goldfarb, A., Abrahamov, A., Drexler, R., Friedberg, A., Rachmilewitz, E.A., 1993. Impaired neutrophil chemotaxis in patients with thalassaemia major. *Br. J. Haematol.* 85, 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb08659.x>
- McKenzie, S.E., Schreiber, A.D., 1998. Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 5, 16–21. <https://doi.org/10.1097/00062752-199801000-00003>
- 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. *Mol. Cell* 5, 299–309. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80425-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80425-6)
- McLeish, K.R., Merchant, M.L., Creed, T.M., Tandon, S., Barati, M.T., Uriarte, S.M., Ward, R.A., 2017. Frontline Science: Tumor necrosis factor- α stimulation and priming of human neutrophil granule exocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 102, 19–29. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0716-293RR>
- Mechanisms of Epithelial Defense (Chemical Immunology) - PDF Free Download [WWW Document], n.d. . epdf.pub. URL <https://epdf.pub/mechanisms-of-epithelial-defense-chemical-immunology.html> (accessed 1.21.20).
- Médecine, T., n.d. Chapitre 5 : Renouvellement cellulaire des muqueuses digestives 6.
- 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. *Nat. Genet.* 41, 478–481. <https://doi.org/10.1038/ng.320>
- Miyoshi, H., Stappenbeck, T.S., 2013. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat Protoc* 8, 2471–2482. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.153>
- Mogensen, T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Morelli, A.E., Thomson, A.W., 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 610–621. <https://doi.org/10.1038/nri2132>
- Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K., Nakayama, K.I., 2011. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.* 14, 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.011>
- Moura, Verheul, Marx, 1998. A functional defect in hereditary haemochromatosis monocytes and monocyte-derived macrophages. *European Journal of Clinical Investigation* 28, 164–173. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1998.00263.x>
- Muchowska, K.B., Varma, S.J., Moran, J., 2019. Synthesis and breakdown of universal metabolic precursors promoted by iron. *Nature* 569, 104–107. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1151-1>
- Müller, S., Sindikubwabo, F., Cañeque, T., Lafon, A., Versini, A., Lombard, B., Loew, D., Durand, A., Vallot, C., Baulande, S., Servant, N., Rodriguez, R., 2019. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *bioRxiv* 693424. <https://doi.org/10.1101/693424>
- Mullineaux-Sanders, C., Collins, J.W., Ruano-Gallego, D., Levy, M., Pevsner-Fischer, M., Glegola-Madejska, I.T., Sångfors, A.M., Wong, J.L.C., Elinav, E., Crepin, V.F., Frankel, G., 2017. *Citrobacter rodentium* Relies on Commensals for Colonization of the Colonic Mucosa. *Cell Rep* 21, 3381–3389. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.086>
- Müllner, E.W., Kühn, L.C., 1988. A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53, 815–825. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90098-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90098-0)
- Nairz, M., Haschka, D., Demetz, E., Weiss, G., 2014. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol* 5, 152. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00152>
- Nakamura, K., Kawakami, T., Yamamoto, N., Tomizawa, M., Fujiwara, T., Ishii, T., Harigae, H., Ogasawara, K., 2016. Activation of the NLRP3 inflammasome by cellular labile iron. *Exp. Hematol.* 44, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.11.002>

- Nauseef, W.M., Borregaard, N., 2014. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15, 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Nauseef, W.M., McCormick, S., Goedken, M., 2000. Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Rep.* 5, 197–206. <https://doi.org/10.1179/135100000101535753>
- Nemeth, E., Preza, G.C., Jung, C.-L., Kaplan, J., Waring, A.J., Ganz, T., 2006. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 107, 328–333. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2049>
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T., 2004a. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113, 1271–1276. <https://doi.org/10.1172/JCI200420945>
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J., 2004b. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090–2093. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8780–8785. <https://doi.org/10.1073/pnas.151179498>
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Siritto, M., Sawadogo, M., Kahn, A., Vaulont, S., 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.072632499>
- Norris, S., White, M., Mankan, A.K., Lawless, M.W., 2010. Highly sensitivity adhesion molecules detection in hereditary haemochromatosis patients reveals altered expression. *Int. J. Immunogenet.* 37, 125–133. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00904.x>
- Núñez, M.T., Gaete, V., Watkins, J.A., Glass, J., 1990. Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J. Biol. Chem.* 265, 6688–6692.
- Nüsse, O., Serrander, L., Lew, D.P., Krause, K.H., 1998. Ca²⁺-induced exocytosis in individual human neutrophils: high- and low-affinity granule populations and submaximal responses. *EMBO J.* 17, 1279–1288. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1279>
- 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. *Nat. Genet.* 37, 1264–1269. <https://doi.org/10.1038/ng1658>
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., Fleming, M.D., 2006. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108, 1388–1394. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003681>
- Opie, E.L., 1899. A CASE OF HAEMOCHROMATOSIS.-THE RELATION OF HAEMOCHROMATOSIS TO BRONZED DIABETES. *J. Exp. Med.* 4, 279–306. <https://doi.org/10.1084/jem.4.3-4.279>
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276, 7806–7810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>
- Park, J.W., Benna, J.E., Scott, K.E., Christensen, B.L., Chanock, S.J., Babior, B.M., 1994. Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol. *Biochemistry* 33, 2907–2911. <https://doi.org/10.1021/bi00176a021>
- Paterson, S., Armstrong, N.J., Iacopetta, B.J., McArdle, H.J., Morgan, E.H., 1984. Intravesicular pH and iron uptake by immature erythroid cells. *Journal of Cellular Physiology* 120, 225–232. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041200217>
- Pati, H.P., Choudhry, V.P., 1999. Deferiprone (L1) associated neutropenia in beta thalassemia major: an Indian experience. *Eur. J. Haematol.* 63, 267–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1999.tb01888.x>
- Patruta, S.I., Edlinger, R., Sunder-Plassmann, G., Hörl, W.H., 1998. Neutrophil impairment associated with iron therapy in hemodialysis patients with functional iron deficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 655–663.
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Peyssonnaud, 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, 3727–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2259>
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., Kubes, P., 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* 203, 2569–2575. <https://doi.org/10.1084/jem.20060925>
- 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. *J. Biol. Chem.* 276, 7811–7819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008923200>

- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., Koenderman, L., 2010. In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
- Piomelli, S., Seaman, C., 1993. Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age. *Am. J. Hematol.* 42, 46–52. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830420110>
- Poli, M., Asperti, M., Ruzzenenti, P., Regoni, M., Arosio, P., 2014. Hepcidin antagonists for potential treatments of disorders with hepcidin excess. *Front. Pharmacol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00086>
- Ponka, P., Beaumont, C., Richardson, D.R., 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin. Hematol.* 35, 35–54.
- Pufahl, P.K., Hiatt, E.E., 2012a. Oxygenation of the Earth's atmosphere–ocean system: A review of physical and chemical sedimentologic responses. *Marine and Petroleum Geology* 32, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2011.12.002>
- Pufahl, P.K., Hiatt, E.E., 2012b. Oxygenation of the Earth's atmosphere–ocean system: A review of physical and chemical sedimentologic responses. *Marine and Petroleum Geology* 32, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2011.12.002>
- Qiao, B., Sugianto, P., Fung, E., del-Castillo-Rueda, A., Moran-Jimenez, M.-J., Ganz, T., Nemeth, E., 2012. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 15, 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.018>
- 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, 917–928. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.041>
- Quintela-Carvalho, G., Luz, N.F., Celes, F.S., Zanette, D.L., Andrade, D., Menezes, D., Tavares, N.M., Brodskyn, C.I., Prates, D.B., Gonçalves, M.S., de Oliveira, C.I., Almeida, R.P., Bozza, M.T., Andrade, B.B., Borges, V.M., 2017. Heme Drives Oxidative Stress-Associated Cell Death in Human Neutrophils Infected with *Leishmania infantum*. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01620>
- Raab, A., 2002. Edited by A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos and K. Wieghardt: Handbook of metalloproteins, vols 1 & 2. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001, 1st edn, xiv + 1472 pp; price £645. ISBN 0-471-62743-7. *Applied Organometallic Chemistry* 16, 397–397. <https://doi.org/10.1002/aoc.298>
- Radomska, H.S., Huettner, C.S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D.T., Tenen, D.G., 1998. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4301–4314. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.7.4301>
- Reichard, P., 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260, 1773–1777. <https://doi.org/10.1126/science.8511586>
- Reichard, P., 1993. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268, 8383–8386.
- Rishi, G., Wallace, D.F., Subramaniam, V.N., 2015. Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Bioscience Reports* 35, e00192. <https://doi.org/10.1042/BSR20150014>
- 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. *Nat. Genet.* 33, 21–22. <https://doi.org/10.1038/ng1053>
- Roetto, A., Totaro, A., Cazzola, M., Cicilano, M., Bosio, S., D'Ascola, G., Carella, M., Zelante, L., Kelly, A.L., Cox, T.M., Gasparini, P., Camaschella, C., 1999. Juvenile Hemochromatosis Locus Maps to Chromosome 1q. *The American Journal of Human Genetics* 64, 1388–1393. <https://doi.org/10.1086/302379>
- Rosales, C., 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Ross, S.L., Biswas, K., Rottman, J., Allen, J.R., Long, J., Miranda, L.P., Winters, A., Arvedson, T.L., 2017. Identification of Antibody and Small Molecule Antagonists of Ferroportin-Hepcidin Interaction. *Front Pharmacol* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00838>
- Rouault, T.A., Maio, N., 2017. Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* 292, 12744–12753. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.789537>
- Saha, P., Yeoh, B.S., Olvera, R.A., Xiao, X., Singh, V., Awasthi, D., Subramanian, B.C., Chen, Q., Dikshit, M., Wang, Y., Parent, C.A., Vijay-Kumar, M., 2017. Bacterial siderophores hijack neutrophil functions. *J. IMMUNOL.* 198, 4293–4303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700261>
- Sauce, D., Dong, Y., Campillo-Gimenez, L., Casulli, S., Bayard, C., Autran, B., Boddaert, J., Appay, V., Elbim, C., 2017. Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly Individuals Is Associated With Increased Levels of the CD16bright/CD62Ldim Immunosuppressive Subset. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 72, 163–172. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw062>

- Saverymuttu, S.H., Peters, A.M., Keshavarzian, A., Reavy, H.J., Lavender, J.P., 1985. The kinetics of ¹¹¹indium distribution following injection of ¹¹¹indium labelled autologous granulocytes in man. *Br. J. Haematol.* 61, 675–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1985.tb02882.x>
- Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., Link, D.C., 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17, 413–423. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00424-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00424-7)
- Shanmugam, N.K.N., Chen, K., Cherayil, B.J., 2015. Commensal Bacteria-induced Interleukin 1 β (IL-1 β) Secreted by Macrophages Up-regulates Hepcidin Expression in Hepatocytes by Activating the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 290, 30637–30647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689190>
- 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, 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.025>
- Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J.D., Banerjee, A., Silliman, C.C., 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1025–1042. <https://doi.org/10.1189/jlb.0804442>
- Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., Eitzen, G., 2014. Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. *Front Immunol* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00448>
- Shi, J., Gilbert, G.E., Kokubo, Y., Ohashi, T., 2001. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 98, 1226–1230. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.1226>
- Sibille, J.C., Kondo, H., Aisen, P., 1988. Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology* 8, 296–301. <https://doi.org/10.1002/hep.1840080218>
- 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., 2013a. IL-22 Regulates Iron Availability In Vivo through the Induction of Hepcidin. *The Journal of Immunology* 191, 1845–1855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202716>
- 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., 2013b. IL-22 regulates iron availability in vivo through the induction of hepcidin. *J. Immunol.* 191, 1845–1855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202716>
- Smith, L.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Dziennis, S.E., Tenen, D.G., 1996. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 88, 1234–1247.
- Söderlund, S., Granath, F., Broström, O., Karlén, P., Löfberg, R., Ekblom, A., Askling, J., 2010. Inflammatory bowel disease confers a lower risk of colorectal cancer to females than to males. *Gastroenterology* 138, 1697–1703. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.007>
- Steere, A.N., Byrne, S.L., Chasteen, N.D., Mason, A.B., 2012. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochim Biophys Acta* 1820, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.003>
- Stepankova, R., Powrie, F., Kofronova, O., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrcir, T., Uhlig, H., Read, S., Rehakova, Z., Benada, O., Heczko, P., Strus, M., Bland, P., Tlaskalova-Hogenova, H., 2007. Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1202–1211. <https://doi.org/10.1002/ibd.20221>
- Stubbe, J., Ge, J., Yee, C.S., 2001. The evolution of ribonucleotide reduction revisited. *Trends Biochem. Sci.* 26, 93–99. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01764-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01764-3)
- Suzuki, T., Yanai, M., Kubo, H., Kanda, A., Sasaki, H., Butler, J.P., 2006. Interaction of non-adherent suspended neutrophils to complement opsonized pathogens: a new assay using optical traps. *Cell Res.* 16, 887–894. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310103>
- Szczepura, K.R., Ruparelia, P., Solanki, C.K., Balan, K., Newbold, P., Summers, C., Chilvers, E.R., Peters, A.M., 2011. Measuring whole-body neutrophil redistribution using a dedicated whole-body counter and ultra-low doses of ¹¹¹Indium. *Eur. J. Clin. Invest.* 41, 77–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02382.x>
- Taketani, S., 2005. Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J. Exp. Med.* 205, 297–318. <https://doi.org/10.1620/tjem.205.297>
- Tapper, H., Furuya, W., Grinstein, S., 2002. Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J. Immunol.* 168, 5287–5296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5287>
- Theil, E.C., Chen, H., Miranda, C., Janser, H., Elsenhans, B., Núñez, M.T., Pizarro, F., Schumann, K., 2012. Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments. *J. Nutr.* 142, 478–483. <https://doi.org/10.3945/jn.111.145854>
- Theret, M., Mounier, R., Rossi, F., 2019. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. *Development* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.156000>

- Tortosa, V., Bonaccorsi, di P.M.C., Brandi, V., Musci, G., Polticelli, F., 2017. An improved structural model of the human iron exporter ferroportin. Insight into the role of pathogenic mutations in hereditary hemochromatosis type 4. *Bio-Algorithms and Med-Systems* 13, 215–222. <https://doi.org/10.1515/bams-2017-0029>
- Valore, E.V., Ganz, T., 2008. POSTTRANSLATIONAL PROCESSING OF HEPCIDIN IN HUMAN HEPATOCYTES IS MEDIATED BY THE PROHORMONE CONVERTASE FURIN. *Blood Cells Mol Dis* 40, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.07.009>
- van Asbeck, B.S., Marx, J.J.M., Struyvenberg, A., Verhoef, J., 1984. Functional defects in phagocytic cells from patients with iron overload. *Journal of Infection* 8, 232–240. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(84\)93955-0](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(84)93955-0)
- van Harten, R.M., van Woudenberg, E., van Dijk, A., Haagsman, H.P., 2018. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines (Basel)* 6. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030063>
- Vogt, T.M., Blackwell, A.D., Giannetti, A.M., Bjorkman, P.J., Enns, C.A., 2003. Heterotypic interactions between transferrin receptor and transferrin receptor 2. *Blood* 101, 2008–2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2742>
- Vols, S., Sionov, R.V., Granot, Z., 2017. Always Look On the Bright Side: Anti-Tumor Functions of Neutrophils. *Curr. Pharm. Des.* 23, 4862–4892. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170704125420>
- Wallace, D.F., Subramaniam, V.N., 2015. Analysis of IL-22 contribution to hepcidin induction and hypoferrremia during the response to LPS in vivo. *Int. Immunol.* 27, 281–287. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu144>
- Walmsley, S.R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R.S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A.M., Cowburn, A.S., Johnson, N., Chilvers, E.R., 2005. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF-kappaB activity. *J. Exp. Med.* 201, 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20040624>
- Walter, T., Arredondo, S., Arévalo, M., Stekel, A., 1986. Effect of iron therapy on phagocytosis and bactericidal activity in neutrophils of iron-deficient infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 877–882. <https://doi.org/10.1093/ajcn/44.6.877>
- 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 Metab.* 2, 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.10.010>
- Wang, W., Wang, X., Ward, A.C., Touw, I.P., Friedman, A.D., 2001. C/EBP α and G-CSF receptor signals cooperate to induce the myeloperoxidase and neutrophil elastase genes. *Leukemia* 15, 779–786. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402094>
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., Allis, C.D., Coonrod, S.A., 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>
- Waterlot, Y., Cantinieaux, B., Hariga-Muller, C., De Maertelaere-Laurent, E., Vanherweghem, J.L., Fondu, P., 1985. Impaired phagocytic activity of neutrophils in patients receiving haemodialysis: the critical role of iron overload. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291, 501–504. <https://doi.org/10.1136/bmj.291.6494.501>
- White, C., Yuan, X., Schmidt, P.J., Bresciani, E., Samuel, T.K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M.L., Lapiere, A., Ward, D.M., Liu, P., Fleming, M.D., Hamza, I., 2013. HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab.* 17, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.005>
- White, M.F., Dillingham, M.S., 2012. Iron–sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Current Opinion in Structural Biology, Folding and binding/Protein-nucleic acid interactions* 22, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.11.004>
- Wiles, S., Clare, S., Harker, J., Huett, A., Young, D., Dougan, G., Frankel, G., 2004. Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cellular Microbiology* 6, 963–972. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00414.x>
- Willis, G., Wimperis, J.Z., Lonsdale, R., Jennings, B.A., 1997. Haemochromatosis gene mutation in hepatocellular cancer. *Lancet* 350, 565–566. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)63143-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63143-1)
- Wipke, B.T., Allen, P.M., 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 167, 1601–1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1601>
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80, 617–653. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>
- Wong, A.R.C., Pearson, J.S., Bright, M.D., Munera, D., Robinson, K.S., Lee, S.F., Frankel, G., Hartland, E.L., 2011. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology* 80, 1420–1438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>
- Wrighting, D.M., Andrews, N.C., 2006. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108, 3204–3209. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027631>

- Yamashiro, D.J., Fluss, S.R., Maxfield, F.R., 1983. Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump. *J Cell Biol* 97, 929–934. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.3.929>
- Yanatori, I., Tabuchi, M., Kawai, Y., Yasui, Y., Akagi, R., Kishi, F., 2010. Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol.* 11, 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-39>
- Yanatori, I., Yasui, Y., Tabuchi, M., Kishi, F., 2014. Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochem. J.* 462, 25–37. <https://doi.org/10.1042/BJ20140225>
- Ye, H., Rouault, T.A., 2010. Human Iron–Sulfur Cluster Assembly, Cellular Iron Homeostasis, and Disease. *Biochemistry* 49, 4945–4956. <https://doi.org/10.1021/bi1004798>
- Yoshida, T., Sato, M., 1989. Posttranslational and direct integration of heme oxygenase into microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1086–1092. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)92332-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92332-2)
- Young, S.P., Bomford, A., Williams, R., 1984. The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem J* 219, 505–510.
- Zeng, Z., Mukherjee, A., Zhang, H., 2019. From Genetics to Epigenetics, Roles of Epigenetics in Inflammatory Bowel Disease. *Front Genet* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01017>
- 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 Metab.* 9, 461–473. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.03.006>
- Zhu, J., Emerson, S.G., 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295–3313. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205318>
- Zhu, L., Castranova, V., He, P., 2005. fMLP-stimulated neutrophils increase endothelial [Ca²⁺]_i and microvessel permeability in the absence of adhesion: role of reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1331-1338. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00802.2004>
- Zumerle, S., Mathieu, J.R.R., Delga, S., Heinis, M., Viatte, L., Vaulont, S., Peyssonnaud, C., 2014. Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype. *Blood* 123, 3646–3650. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-550467>

Annexe 1 - Matériel et méthodes - Projet Secondaire : résultats complémentaires

Colite induite au Dextran Sodium Sulfate

Des animaux femelles de même portée âgés de 8 semaines ont été mis sous DSS (Sigma) à 2,5% dans l'eau de boisson pendant 7 jours. Les biberons ont été changés tous les 2 jours puis le DSS a été remplacé par l'eau de boisson classique le 7^e jour pour permettre la réépithélisation intestinale pendant 5 jours. Le sang de chaque animal a été récupéré de façon rétro-orbital et la numération effectuée grâce à un lecteur Melet Schloesing MS9-5. Le bilan martial a été réalisé de façon colorimétrique grâce à la plateforme du Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI) de Nicolas Sorhaindo à l'hôpital Bichat. Les organes ont été récupérés pour évaluation histologique par inclusions en bloc paraffine et les échantillons récupérés pour l'ARN ont été congelés immédiatement dans l'azote liquide.

*Infection au *Citrobacter rodentium**

Les souris mâles de 12 semaines séparées en cage WT et cage KO ont été infectées avec 10^{11} CFU de *Citrobacter rodentium* souche DBS100, résistantes à la Kanamycine, en phase exponentielle de croissance par gavage oral unique avec 200 μ l de PBS. Les animaux ont préalablement été mis à jeûn pour 24h. Le poids a été mesuré quotidiennement pendant les phases cruciales de l'infection et les fèces ont été récupérés avec un cône stérile puis placés sur glace jusqu'à leur broyage dans du PBS stérile et froid. Des dilutions sérielles ont ensuite été réalisées puis une goutte de chaque dilution a été étalés sur gélose LB+kanamycine et mis à pousser toute la nuit à 37°C dans un incubateur à bactéries. Le jour du sacrifice, le sang a été prélevé de façon rétro-orbital puis passé à la numération (Melet Schloesing MS9-5), aliquoté pour l'évaluation du bilan martial. Une partie du sang a été dilués de façon sérielle et étalés sur gélose LB+Kanamycine pour comptage des bactéries le lendemain. Le reste du sang a été utilisé pour récupérer le plasma en vue d'une évaluation des cytokines circulantes. Pour les segments intestinaux, le caecum a été ouvert longitudinalement et la même section a été récupéré chez chaque animal pour la même utilisation (voir cette publication pour la dissection des segments intestinaux : The Mouse Model of Infection with *Citrobacter rodentium* Nicolas Bouladoux,^{1,2} Oliver J. Harrison,¹ and Yasmine Belkaid). Le contenu de chaque segment intestinal a été dilué de façon sérielle et étalé sur gélose comme précédemment. Les tissus récupérés ont été pesés, broyés et dilués de la même façon en parallèle et en série pour enfin étaler chaque dilution afin de compter les bactéries formant une colonie le lendemain matin.

Transplantation fécale

Des souris femelles donneuses ont été séparées au sevrage. 5 semaines plus tard ces animaux ont été utilisés 1 jour sur 2 pour donner leur microbiote. Les animaux ont été placés dans une nouvelle cage stérile sans litière pendant 30 minutes et 2 excréments par animal ont été récupérés à l'aide d'un cône stérile et placés dans une tube pour cytomètre de 5ml dans un environnement oxygéné. Les fèces ont

ensuite été broyées à l'aide d'un piston stérile, filtrés et suspendus dans du PBS stérile pour gavage oral des animaux receveurs pendant 3 semaines à raison d'un gavage semi quotidien. Les animaux receveurs sont des femelles séparées au sevrage et mises sous un cocktail d'antibiotiques dans l'eau de boisson pendant 9 jours (4g d'Ampicilline, 2g de Vancomycine, 4g de Metronidazole, 2g de Néomycine pour 1L d'eau de boisson). Les biberons ont été changés tous les 3 jours pour éviter une perte d'efficacité des antibiotiques. Les souris ont ensuite été gavées oralement avec le microbiote des souris donneuses comme précédemment mentionné. Après trois semaines de transplantation, les souris receveuses ont été soumises à l'induction de la colite par ajout de DSS dans l'eau de boisson comme précédemment.

RT-qPCR

Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide de TriReagent (Sigma) en suivant le protocole de la compagnie et retranscrits en ADNc en utilisant le kit de Reverse Transcriptase High-Capacity (Life technologies). La PCR semi-quantitative a été réalisée avec du SYBR green supermix (Roche) dans un système de détection LightCycler480 par Roche. Toutes les valeurs ont été normalisées avec la cyclophiline A ($\Delta CT = CT [HAMP] - CT [Cyclo]$). Les résultats d'expression sont représentés en fold change selon la formule $2^{-\Delta\Delta CT}$, avec $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (échantillon test) – ΔCT (contrôle). Les primers suivants ont été utilisés :

Nom du gène	Séquence sens	Séquence Antisens
Cyclo A	5' GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT 3'	5' CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT 3'
B-Def 1	5' AGG TGT TGG CAT TCT CAC AAG 3'	5' GCT TATCTGGTTTACAGGTTCCC 3'
Occludin	5' ATG TCC GGC CGA TGC TCT C 3'	5' TTT GGC TGC TCT TGG GTC TGT AT 3'
TGF β	5' GAG AGC CCT GGA TAC CAA CTA TT 3'	5' CCA GGT CCT TCC TAA AGT CAA TG 3'
TfR1	5' GCT GCA TAT CCT TTC CTT GC 3'	5' ACC ATT TGG TTG AGC TGA GG 3'
ZO-1	5' GTA CTT CAC TCC TTA GTT TGT CCT G 3'	5' CAC GTG CAA TAC ACA AAG TAA CTG 3'
RegIII B	5' CTA ATG CGT GCG GAG GGT ATA TTC 3'	5' ATG CTG CTC TCC TGC CTG ATG 3'
Granzyme B	5' GCT GCT CAC TGT GAA GGA AGT 3'	5' TGG GGA ATG CAT TTT ACC AT 3'
IL-10	5' CCA GAG CCA CAT GCT CCT AGA 3'	5' AGC TGG TCC TTT GTT TGA AAG AA 3'
S100A8	5' AAA TCA CCA TGC CCT CTA CAA	5' CCC ACT TTT ATC ACC ATC

	G 3'	GCA A 3'
S100A9	5' GCA CAG TTG GCA ACC TTT ATG 3'	5' TGA TTG TCC TGG TTT GTG TCC 3'
TNF α	5' AAT GGC CTC CCT CTC ATC AGT T 3'	5' CGA ATT TTG AGA AGA TGA TCT GAG TGT 3'
IL-22	5' CAT GCA GGA GGT GGT GCC TT 3'	5' CAG ACG CAA GCA TTT CTC AG 3'
Hamp1 mouse	5' CCT ATC TCC ATC AAC AGA T 3'	5' TGC AAC AGA TAC CAC ACT G 3'
Hamp human	5' CTC TGT TTT CCC ACA ACA GAC G 3'	5' CGT CTT GCA GCA CAT CCC ACA C 3'

Isolement des cryptes intestinales et culture des organoïdes

Des mâles de 6 mois ont été sacrifiés, leur petit intestin a été prélevé sous PSM. Le contenu intestinal a été éliminé mécaniquement. L'intestin a ensuite été coupé en trois sections et lavé dans une solution de lavage (PBS 10% SVF 1% Penicilline/Streptomycine 1% Gentamycine 1% fungizone). Il a ensuite été coupé longitudinalement et le tissu adipeux retiré mécaniquement à l'aide d'une lamelle en verre stérile. L'intestin a ensuite été coupé en petits morceaux de 5mm et à nouveau lavé par aller-retours avec une pipette dans 10ml de solution de lavage. Le surnageant a été éliminé et du PBS-EDTA 8mM a été ajouté puis placé sous agitation douce à 4°C pendant 15 minutes. Le PBS-EDTA a ensuite été éliminé et les morceaux d'intestin lavés dans 10 ml de solution de lavage puis passer sur tamis cellulaire de 70 μ m. Les morceaux d'intestins ont à nouveau été mis dans du PBS-EDTA et placés sous agitation douce pendant 30 minutes à 4°C. Le PBS-EDTA a ensuite été éliminé et remplacé par 10 ml de solution de lavage. La suspension est ensuite passée sur tamis de 70 μ m et c'est la solution filtrée qui a été utilisé pour récupérer les cryptes intestinales. Nous avons ensuite compté les cryptes dans cette fraction au microscope. L'échantillon a été centrifugé 5min à 1500 rpm et resuspendu dans du milieu de culture L-WRN 50% (Miyoshi and Stappenbeck, 2013) à 2500 cryptes par ml, homogénéisé avec 50% de Matrigel (Sigma) sur glace. Une goutte de 50 μ l de mélange Matrigel/suspension cellulaire a été déposée par puits dans une plaque 24 puits préalablement chauffée à 37°C. La suspension a ensuite été mise à solidifier pendant 10 minutes puis 500 μ l/puits de milieu a été ajouté. Le milieu est changé tous les 2 jours et les organoïdes ont été lysés pour extraire l'ARN le 4e jour à l'aide de TriReagent (Sigma)

Erythroid system and its diseases

KEY POINTS

- The hepcidin/FPN axis regulates intestinal HIF-2 to modulate iron absorption.
- Direct titration of the bone morphogenetic proteins participates to ERFE-mediated hepcidin suppression.
- Recent implications of erythrophagocytosis in tumor microenvironment highlight a macrophage phenotype switch in hemolytic tumor area.
- The use of HIF-2 antagonists is a promising therapeutic approach in iron overload diseases.

The iron contained in RBCs is recycled by macrophages at a rate of 25–30 mg/day. There is no active excretory mechanism for the metal; however, small iron quantities (1–2 mg/day) are lost by desquamation or bleeding, and are replaced by dietary iron absorption, in the duodenum, the proximal part of the small intestine. Over the last two decades, major advances have been made in the iron homeostasis research topic. Hepcidin was identified as the key regulator of systemic iron homeostasis in 2001 [4]. This 25 amino acid peptide, highly conserved between species, has been shown to be mainly secreted by the liver in response to iron overload or inflammation [5,6]. It circulates in the blood flow and decreases plasma iron levels by blocking iron absorption in the duodenum and iron release from macrophages, thus targeting the two entrance gates for iron in the circulation. Molecularly, it binds the only known iron exporter ferroportin (FPN) inducing its internalization and consecutive degradation by the proteasome thanks to specific sites of ubiquitinylation [7,8].

Hepcidin deficiency is associated with hereditary hemochromatosis, a highly prevalent human genetic disease characterized by excessive iron accumulation. Iron accumulation in the organs leads to liver cirrhosis, diabetes, heart failure and increase risks of hepatocellular carcinoma. There are multiple origins for this abnormally low hepcidin level, from highly frequent mutations in the *Hfe* gene [9], to very rare cases of mutations in the hepcidin gene itself [10].

Although hepcidin is mainly produced by the liver, an increasing number of studies showed that hepcidin is also expressed by other tissues [11–14]. The generation of a liver-specific hepcidin knockout mouse model recapitulated the iron phenotype of the total hepcidin knockout mice, demonstrating that hepatic hepcidin is sufficient to ensure systemic iron homeostasis in physiological conditions [15] and suggesting that production of hepcidin by extrahepatic tissues may have local roles. Indeed,

an essential role of heart hepcidin in cardiac iron homeostasis has recently been highlighted [16].

HIF-2: A KEY REGULATOR OF IRON HOMEOSTASIS IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

The richly perfused gastrointestinal mucosa is juxtaposed with the anaerobic lumen of the gut. As a consequence, intestinal epithelial cells experience a uniquely steep oxygen gradient. Adaptive transcriptional responses to oxygen deprivation are mediated by the hypoxia inducible factors (HIFs). HIFs are alpha/beta heterodimeric transcription factors playing key roles in adaptation to hypoxia. The beta monomer (HIF-1 β , also known as ARNT) is constitutively expressed and the alpha monomers (HIF-1 α , HIF-2 α or HIF-3 α) are regulated at the posttranslational level. Under normoxia, the prolyl-hydroxylase domain enzymes (PHDs) hydroxylate the α -subunit on two prolines. The proline-hydroxylated residues favor the interaction with the tumor suppressor protein von Hippel-Lindau (vHL) resulting in the degradation of the HIF- α subunit via the proteasome pathway. Conversely, under hypoxia or iron depletion, hydroxylation is inhibited increasing the stabilization of the alpha subunit and the heterodimerization with the beta subunit. The functional heterodimer translocates into the nucleus to regulate the transcription of HIF target genes by binding on specific sequences called hypoxia-responsive elements (HREs).

HIF-1 has been the most extensively subunit studied so far. An essential involvement of HIF-1 has been demonstrated in angiogenesis, glycolytic metabolism, apoptosis, cellular stress among other major biological processes [1]. HIF-1 has also been shown to regulate transferrin receptor 1 (TfR1) and heme oxygenase 1 (HO-1) expression [17,18], but is not essential for splenic macrophages erythrophagocytosis [19].

HIF-2 has a key role in adult erythropoiesis, by regulating the erythropoietin hormone (EPO) [20,21] but also by increasing iron mobilization via two essential mechanisms: in the enterocyte, HIF-2 regulates iron absorption via direct transcriptional activation of the divalent metal transporter 1 (DMT1), the ferric reductase DcytB and the iron exporter FPN [20,21]. In the liver, specific HIF-2 activation represses hepcidin production through an EPO-mediated stimulation of erythropoiesis [21,22].

HIF-2 is not only crucial to maintain normal absorption rates at basal level but also in different pathological settings. HIF-2 is essential to upregulate iron absorption genes in conditions of iron deficiency [23] or increased erythropoiesis [24] but

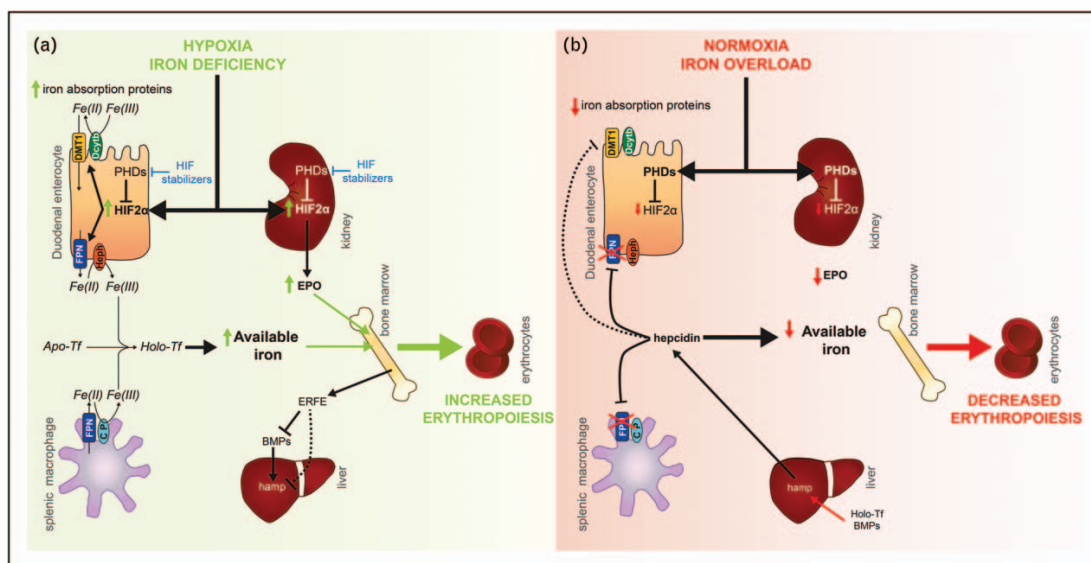


FIGURE 1. The links between hypoxia and iron metabolism. (a) Systemic regulation of iron metabolism under normoxia and/or iron deficiency. (b) Systemic regulation of iron metabolism under hypoxia and/or iron overload. Apo-Tf, Apo-transferrin; BMPs, bone morphogenetic proteins; CP, ceruloplasmin; EPO, erythropoietin; ERFE, erythroferrone; FPN, ferroportin; Heph, hephaestin; HIF, hypoxia inducible factor; Holo-Tf, Holo-transferrin; Ocytb, duodenal cytochrome b; OMT1, divalent metal transporter 1; PHOs, prolyl hydroxylase domain enzymes.

also contributes to iron overload in hemochromatosis [25] and sickle cell disease mouse models [24].

Schwartz *et al.* recently elucidated more precisely the mechanisms by which HIF-2 mediates regulation of iron absorption, thanks to inducible mouse models. They investigated the importance of the well described hepcidin/FPN axis to stabilize HIF-2 specifically in the intestine. In a context of an inducible knockout mouse model for hepcidin in the liver, duodenal FPN was stabilized and serum iron increased (leading to iron overload in case of sustained hepcidin deficiency mimicking the hereditary hemochromatosis [4]). FPN stabilization leads to a decrease in intracellular iron in the duodenal enterocytes. Under low cellular iron concentrations, the HIF-2 α subunit is no longer hydroxylated by the PHDs, and is therefore stabilized, inducing the consecutive transcription of the iron absorption genes (DMT1, DcytB, FPN) (Fig. 1). Both iron overload and anemia models support the key role of the hepcidin/FPN axis in intestinal HIF-2 regulation [26]. Using inducible intestine-specific FPN and DMT1 knockout model, Schwartz *et al.* confirmed that enterocyte iron flux was the major mechanism by which the hepcidin/FPN axis regulates HIF-2 α and demonstrated *in vitro* that the FPN-mediated efflux of iron triggers the stabilization of HIF-2 α in a cell-autonomous manner. Interestingly, the use of a HIF-2 antagonist, recently developed [27] decreases systemic

iron accumulation in hepcidin-deficient mice, confirming previous studies using mice lacking HIF-2 in the intestinal epithelium [25]. Noteworthy, in addition to the PHD-mediated posttranslational regulation, HIF-2 α is also subjected to IRP-mediated translational regulation due to the presence of an IRE in its 5'UTR [28]. It provides a means by which HIF-2 α activity can be attenuated and may limit the level of activation. Recently, an inhibitor of HIF-2 translation has been shown to reduce erythrocytosis/polycythemia in a mouse model of Chuvash polycythemia (*Vhl*^{R200W}) [29]. Altogether, these recent studies confirm that HIF-2 α is a potential pharmacological target downstream of the hepcidin/FPN axis in patients with iron overload

MAINTENANCE OF THE IRON BALANCE TO SUPPORT FUNCTIONAL ERYTHROPOIESIS

As mentioned previously, iron is mainly used to produce functional hemoglobin during erythropoiesis. The major actor for erythropoiesis activation is EPO, produced by the liver, during the embryonic stage and by the renal interstitial tissue after birth. Anemia results from insufficient functional red blood cells (low levels of hemoglobin or inefficient hemoglobin) in the blood flow causing a decrease in oxygen levels in tissues.

Erythroid system and its diseases

Hypoxia is a major inducer of EPO synthesis in the kidney, resulting in the synthesis of erythropoietin (ERFE) by the erythroblasts. ERFE mediates liver hepcidin suppression to mobilize iron to support erythropoiesis [30]. It also contributes to iron overload in a mouse model of β -thalassemia by decreasing liver hepcidin [31]. The mechanism involved in ERFE mediated hepcidin-suppression is still unknown. However, a recent work suggested a direct interaction of ERFE with BMP5, BMP6 and BMP7 that could participate to hepcidin suppression by inhibiting the hepatic BMP/SMAD signaling, critical for hepcidin control [32^{*}]. Interestingly, EPO has also been suggested to act directly on enterocytes through its receptor EPO-R to increase iron absorption [33].

In the case of chronic kidney disease (CKD) patients, the lack of EPO production by the renal interstitial tissue results in insufficient erythropoiesis, and subsequent anemia and hyperferremia. Anemia is a frequent complication contributing to increased morbidity and mortality in these patients. In physiologic state, response to anemia and renal hypoxia induces HIF-2 stabilization in the renal EPO-producing cells, resulting in increased EPO production. After submitting mice to an iron-rich diet or Iron-Dextran injections, HIF-2 stabilization is reduced and EPO induction lost [34], suggesting a vicious circle with an increased iron deposition in patients with EPO deficiency decreasing consecutively the EPO production.

IRON MODULATES MACROPHAGE POLARIZATION IN TUMOR

Macrophages play a critical role in the recycling of iron from RBCs. The consequences of macrophage exposure to hemolytic RBCs are usually studied in the context of hemolytic diseases, such as sickle cell disease, where pro-inflammatory 'M1 macrophages' reprogrammed by heme and iron aggravates tissue damage [35]. In a recent publication, Muckenthaler *et al.* investigated the impact of hemolysis in the tumor microenvironment on the reprogramming of tumor-associated macrophages. During the tumorigenesis process, bleedings appear in some area of the tumor microenvironment, with an increase in hemolytic RBCs number. The authors describe that the hemolytic area is associated with a subpopulation of macrophages expressing M1-like markers and heme scavenger genes to take heme iron from hemolytic RBCs. The presence of these iron-loaded pro-inflammatory tumor-associated macrophages (named iTAMs) correlates with reduced tumor size in patients with nonsmall cell lung cancer. Thanks to in-vitro experiments, they showed that aged/

hemolytic RBCs switch M2-like macrophages into pro-inflammatory M1-like macrophages, able to kill Lewis lung carcinoma cells, thanks to increased ROS production. To test the therapeutic relevance of their findings, the authors used iron oxide nanoparticles inducing an iron increase exclusively in phagocytic cells. Co-injection of these nanoparticles with Lewis lung carcinoma cells in mice reduced tumor growth. These results demonstrate a new important role of iron and senescent/aged RBCs in tumorigenesis, and suggest implication of iron in antitumor response, at least for macrophages in this cancer [36^{*}].

THERAPEUTIC APPROACHES TO MODULATE HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR

The increase in CKD cases underlines the current necessity of novel therapeutic approaches to treat anemia. Since the discovery of HIF, the concept of stabilizing HIF to support EPO production in CKD anemia has been suggested for many years. It is now conceivable thanks to a new class of drugs, the PHD inhibitors or HIF stabilizers, which prevents the HIF-alpha subunit from proteasome-mediated degradation. These small molecules are currently in phase III clinical trials. These drugs by stabilizing not only HIF-1 but also HIF-2 would coordinate erythropoiesis with iron metabolism. It could ameliorate the quality life of CKD patients, by avoiding multiple transfusions, iron supplementation and by reducing the doses of erythropoiesis stimulating agents administered [37]. However, there are several concerns related to putative side effects of HIF activation as HIF-1 and HIF-2 regulate a broad spectrum of cellular functions. Recent findings highlighted an increase of fibroblast growth factor 23 (FGF23) after HIF stabilizers treatment [38]. High levels of circulating FGF23 are associated with cardiac dysfunction and bone demineralization among others [39,40]. Further investigations will be needed to assess the benefit-risk of both treatments.

Recent works from the last 5 years converge to the critical role for HIF-2 α in iron hyperabsorption in primary and secondary hemochromatosis [24,25,29^{*}]. A selective inhibitor of HIF-2 α , PT2385, has recently been developed [27] and has been validated for the treatment of patients with clear-cell renal cell carcinoma [41^{*}]. Of note, by targeting HIF-2, PT2385 has also recently been shown to prevent obesity, type 2 diabetes and hepatic steatosis [42^{**}]. Therefore, the use of HIF-2 antagonists, such as PT2385, will be a promising therapeutic approach in the treatment of iron overload diseases characterized by dysfunction of the hepcidin/FPN axis.

CONCLUSION

Defects in oxygen supply are present in lots of pathologies indicating a need to better understand the mechanisms increasing iron import to support optimal erythropoiesis to maintain tissue normoxia. Since the discovery of liver hepcidin as the key iron regulator, new interest has emerged to identify other hepcidin producing tissues and understand their role. Recent publications investigated the crucial role of the hepcidin/FPN axis to regulate iron absorption in the intestine thanks to HIF-2. As this factor tightly regulates EPO production by the kidney, new therapeutic stabilizing HIF emerged to restore both iron import and sufficient erythropoiesis in anemia-associated diseases. Further investigations are needed to evaluate the side effects of HIF stabilizers and to assess the benefit-risk in comparison to current erythropoiesis stimulating agent treatments. As HIF factors are involved in many key biological processes, the next step will be to identify specific stabilizers for each HIF isoform. At the other spectrum of iron-related diseases, the use of specific HIF-2 antagonists will be a novel and promising therapeutic approach in the treatment of iron overload diseases.

Acknowledgements

We thank all contributors to this research topic and apologize to authors whose work could not be cited due to space limitations.

Financial support and sponsorship

The laboratory is supported by a funding from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2011-2015 Grant agreement no 261296), the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (DEQ20160334903), the Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051, funded by the program 'Investissements d'avenir' of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148:399–408.
2. Beaumont C, Delaby C. Recycling iron in normal and pathological states. *Semin Hematol* 2009; 46:328–338.
3. Nairz M, Schroll A, Demetz E, et al. 'Ride on the ferrous wheel' – the cycle of iron in macrophages in health and disease. *Immunobiology* 2015; 220:280–294.
4. 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 Sci U S A* 2001; 98:8780–8785.
5. Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, et al. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood* 2011; 118:4129–4139.
6. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113:1271–1276.
7. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306:2090–2093.
8. Qiao B, Sugianto P, Fung E, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 2012; 15:918–924.
9. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13:399–408.
10. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003; 33:21–22.
11. Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006; 131:788–796.
12. Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 2005; 184:361–370.
13. Merle U, Fein E, Gehrke SG, et al. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 2007; 148:2663–2668.
14. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, et al. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood* 2006; 107:3727–3732.
15. Zumerle S, Mathieu JR, Delga S, et al. Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype. *Blood* 2014; 123:3646–3650.
16. Lakhali-Littleton S, Wolna M, Carr CA, et al. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:3164–3169.
17. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272:5375–5381.
18. Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific posttranscriptional regulation. *J Biol Chem* 1999; 274:24142–24146.
19. Mathieu JR, Heinis M, Zumerle S, et al. Investigating the real role of HIF-1 and HIF-2 in iron recycling by macrophages. *Haematologica* 2014; 99:e112–e114.
20. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, et al. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:2301–2306.
21. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007; 117:1068–1077.
22. Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JR, et al. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* 2012; 97:827–834.
23. Shah YM, Matsubara T, Ito S, et al. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab* 2009; 9:152–164.
24. Das N, Xie L, Ramakrishnan SK, et al. Intestine-specific disruption of hypoxia-inducible factor (HIF)-2alpha improves anemia in sickle cell disease. *J Biol Chem* 2015; 290:23523–23527.
25. Mastrogiannaki M, Matak P, Delga S, et al. Deletion of HIF-2alpha in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood* 2012; 119:587–590.
26. Schwartz AJ, Das NK, Ramakrishnan SK, et al. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2alpha axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *J Clin Invest* 2018.
27. Wallace EM, Rizzi JP, Han G, et al. A Small-molecule antagonist of HIF2alpha is efficacious in preclinical models of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2016; 76:5491–5500.
28. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:420–426.
29. Ghosh MC, Zhang DL, Olivier H, et al. Translational repression of HIF2alpha expression in mice with Chuvash polycythemia reverses polycythemia. *J Clin Invest* 2018; 128:1317–1325.
- Repression of Hif2alpha expression by Tempol-mediated increases in the IRE-binding activity of Irf1 decreased erythropoietin production, corrected splenomegaly, normalized hematocrit levels, and increased the lifespans of Chuvash polycythemia mice.
30. Kautz L, Jung G, Valore EV, et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014; 46:678–684.
31. Kautz L, Jung G, Du X, et al. Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood* 2015; 126:2031–2037.

Erythroid system and its diseases

32. Arezes J, Foy N, McHugh K, *et al.* Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood* 2018; 132:1473–1477.
This study demonstrates that ERFE contributes to liver hepcidin-suppression by the titration of BMP5,6,7.
33. Srai SK, Chung B, Marks J, *et al.* Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure. *Kidney Int* 2010; 78:660–667.
34. Suzuki N, Matsuo-Tezuka Y, Sasaki Y, *et al.* Iron attenuates erythropoietin production by decreasing hypoxia-inducible transcription factor 2alpha concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 2018; 94:900–911.
Iron suppresses EPO production by reducing HIF2alpha concentration in renal interstitial fibroblasts.
35. Vinchi F, Costa da Silva M, Ingoglia G, *et al.* Hemopexin therapy reverts heme-induced proinflammatory phenotypic switching of macrophages in a mouse model of sickle cell disease. *Blood* 2016; 127:473–486.
36. Costa da Silva M, Breckwoldt MO, Vinchi F, *et al.* Iron induces antitumor activity in tumor-associated macrophages. *Front Immunol* 2017; 8:1479.
Delivery of iron exert direct antitumor effector functions by a macrophage phenotype switch.
37. Del Vecchio L, Locatelli F. Investigational hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors (HIF-PHI) for the treatment of anemia associated with chronic kidney disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2018; 27:613–621.
38. Flamme I, Ellinghaus P, Urrego D, Kruger T. FGF23 expression in rodents is directly induced via erythropoietin after inhibition of hypoxia inducible factor proline hydroxylase. *PLoS One* 2017; 12:e0186979.
39. Hanudel MR, Eisenga MF, Rappaport M, *et al.* Effects of erythropoietin on fibroblast growth factor 23 in mice and humans. *Nephrol Dial Transplant* 2018; Epub ahead of print.
40. Kanbay M, Vervloet M, Cozzolino M, *et al.* Novel faces of fibroblast growth factor 23 (FGF23): iron deficiency, inflammation, insulin resistance, left ventricular hypertrophy, proteinuria and acute kidney injury. *Calcif Tissue Int* 2017; 100:217–228.
41. Courtney KD, Infante JR, Lam ET, *et al.* Phase I dose-escalation trial of PT2385, a first-in-class hypoxia-inducible factor-2alpha antagonist in patients with previously treated advanced clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2018; 36:867–874.
This study validates direct HIF-2alpha antagonism, by the use of PT2385 for the treatment of patients with ccRCC.
42. Xie C, Yagai T, Luo Y, *et al.* Activation of intestinal hypoxia-inducible factor 2alpha during obesity contributes to hepatic steatosis. *Nat Med* 2017; 23:1298–1308.
This study shows that intestinal HIF-2alpha could be a viable target for hepatic steatosis therapy.

