

Université de Montréal

**Rôle des récepteurs Toll-like et de la protéine adaptatrice MyD88
dans la régulation de l'hepcidine et le développement des
hyposidérémies associées à l'inflammation**

Par

Antonio Layoun

Programme de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Microbiologie et Immunologie

Mars 2014

© Antonio Layoun, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôle des récepteurs Toll-like et de la protéine adaptatrice MyD88 dans la régulation de l'hepcidine et le développement des hyposidérémies associées à l'inflammation

Présentée par :
Antonio Layoun

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marika Sarfati, présidente-rapporteur
Dr Manuela Santos, directeur de recherche
Dr Isabel Fernandez, membre du jury
Dr Kostas Pantopoulos, examinateur externe
Dr Ali Ahmad, représentant du doyen de la Faculté de Médecine

Liste des abréviations

ACD: Anémie des maladies inflammatoires chroniques
ADN: Acide désoxyribonucléique
Apo-Tf: Apotransferrine
AP1: Activator protein 1
ARN: Acide ribonucléique
Atoh8: Atonal homolog 8
ATPase: Adénosine triphosphatase
BDH-2/3: Beta-défensine humaine 2/3
BMPs: Bone Morphogenetic Proteins
BMP-RE: BMP-responsive elements
BMPRs: Bone morphogenetic protein receptors
BSA: Bovine serum albumin
CAT: Catalase
CCPA: Conseil canadien de protection des animaux
CD: Cellules dendritiques
CD163: Cluster of differentiation 163
CIPA: Comité institutionnel de protection des animaux
CMH1: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
CO: monoxyde de carbone
CP: Céruloplasmine
CPA: Cellules présentatrices d'antigène
CpG: Cytosine-guanine
CTFF: Capacité totale de fixation du fer
CYBRD1: Cytochrome b réductase 1
Db: Doubles brins
Dcytb1: Cytochrome b réductase 1
DD: Death domain
DMT1: Divalent metal transporter 1
DTT: Dithiotreitol

DFO: Desferrioxamine
DMEM: Dubelcco's modified eagle medium
ECP: Eosinophil cationic protein
EPO: Erythropoïétine
FAC: Ferric Ammonium Citrate
FACS: Cytométrie en flux
FBS: Fetal bovine serum
Fe-S: Clusters fer-soufre
FIH: Facteurs inductibles par l'hypoxie
FPN: Ferroportine
FS: Fer sérique
FTH: Ferritin heavy chain
FNR: Fumarate and Nitrate reductase Regulatory
GADD45: Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45 Gene
GATA 6 : GATA binding protein 6
GDF15: Growth differentiation factor 15
GPI: Glycosylphosphatidylinositol
GPL: Lipophosphoglycanes
GPx: Gluthatione peroxydase
HA : Anémie hémolytique
HCP1: Heme Carrier Protein 1
HFE: Human hemochromatosis protein
HH : Hémochromatose héréditaires
Hp: Haptoglobine
H₂S: Hydrogène sulfuré
HEPH: Hephaestine
HAMP: Hecpidin Antimicrobial Peptide
Hb: Hémoglobine
HCP1: Hème Carrier Protein 1
HH: Hémochromatose héréditaire

HIF-2 α : Hypoxia-inducible factor-2
HJV: Hémojuvéline
HJVm: Hémojuvéline membranaire
HJVs: Hémojuvéline soluble
HO-1: Hème oxygénase 1
Hp: Haptoglobine
HSV: Herpès simplex virus
Id1: Inhibitor of DNA binding 1
i.p.: Intrapéritonéale
IFNs: Interférons
IL1 β : Interleukine 1 beta
IL-6: Interleukine 6
IMP: Integrin-Mobilferrin Pathway
IRAK: IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRE: Iron responsive elements
IRF3: Interféron regulatory factor 3
IRP1: Iron regulatory proteins 1
IRP2: Iron regulatory proteins 2
LF: Lactoferrine
LAM: Lipoarabinomannanes
LB: Lymphocytes B
LCN2: Lipocaline 2
Lcn2R: Récepteur au lipocaline 2
LIP: Labile iron pool
Lipocaline 2: LCN2
LOXs: Lipoxygénases
LPS: Lipopolysaccharide
LRR: Leucine rich repeats
LT: Leucotriènes
LT: Lymphocytes T
MAP: Mitogen-activated protein

MCMV: Cytomégalo­virus murin
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
MCPIP1: Monocyte chemotactic protein-induced protein 1
MFI: Mean fluorescence intensity
MMTV: Tumeur mammaire murines
MPMs: Macrophages péritonéaux murins
MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88
NaN₃: Sodium Azide
NF-κB: Nuclear factor κB
NO: Oxyde nitrique
NK: Natural killer
NRAMP: Natural resistance-associated macrophage protein
NTBI: Non transferrin bound iron
O₂ : Oxygène
O₂^{•-}: Superoxyde
p53: Tumor protein 53
PAMPs: Pathogen associated molecular patterns
PBS: Phosphate-buffered saline
PCFT: Proton-Coupled Folate Transporter
H₂O₂: Peroxyde
Poly(I:C): Polyionosine-polycytidylic acid
PRRs: Pattern-recognition receptors
PS: Peniciline et Streptomycine
RE: Réticulum endoplasmique
RNRs: Ribonucléotides réductases
RO[•]: Alcoxy radical
ROI: Reactive oxygen intermediates
ROO[•]: Alkyl oxyradical
ROOH: Hydroxy peroxydes des lipides
RT: Reverse transcription

Scara5: Scavenger receptor class A
SDS: Sodium dodecyl sulfate
Sb: Simples brins
Smad : Mothers against decapentaplegic, Drosophila, homolog
SOD: Superoxide dismutase
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
Steap3: Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3
ST%: Saturation de la transferrine
sTfR1: Récepteur de la transferrine 1 soluble
Tf: Transferrine
TfR1: Récepteur de la transferrine 1
TfR2: Récepteur de la transferrine 2
TGF- β : Transforming growth factor β
TH: LT Helper
TIM-2: T cell immunoglobulin mucin
TIR: Toll/IL-1 receptor
TIRAP : TIR domain containing adaptor protein
TLR: Récepteur Toll-like
TMPRSS6: Transmembrane protease serine 6
TNF- α : Facteur nécrose tumorale α
TRAM : Toll-receptor-associated molecule.
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TWSG1: Twisted gastrulation protein homolog
UNC93B1: Unc-93 Homolog B1
USF2: Upstream transcription factor 2
UTR: Untranslated regions
VRS: Virus respiratoire syncytial

Résumé

Le fer est un oligo-élément nécessaire pour le fonctionnement normal de toutes les cellules de l'organisme et joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques. Cependant, le niveau de fer dans le corps doit être bien réglé, sinon la carence en fer entraîne des divers états pathologiques tels que l'anémie et la diminution de l'immunité. D'autre part, une surcharge en fer potentialise la multiplication des germes, aggrave l'infection et la formation de radicaux libres ayant des effets toxiques sur les cellules et leurs composants, ce qui favorise les maladies cardio-vasculaires, l'inflammation et le cancer. L'hepcidine (HAMP), un régulateur négatif de l'absorption du fer, induit la dégradation de la ferroportine (FPN), le seul exportateur connu de fer ce qui réduit sa libération par les macrophages et inhibe son absorption gastro-intestinale.

HAMP est synthétisé principalement par les hépatocytes, mais aussi par les macrophages. Cependant, il y a très peu de données sur la façon dont HAMP est régulé au niveau des macrophages. Plus récemment, nous avons constaté que l'induction de l'hepcidin dans le foie par le polysaccharide (LPS) est dépendante de la voie de signalisation médiée par « Toll-like receptor 4 » (TLR4). Grâce au TLR4, le LPS induit l'activation des macrophages qui sécrètent de nombreuses différentes cytokines inflammatoires, y compris Interleukine 6 (IL-6), responsable de l'expression de HAMP hépatique. Dans le premier chapitre de la présente étude, nous avons étudié la régulation de HAMP dans la lignée cellulaire macrophagique RAW264.7 et dans les macrophages péritonéaux murins stimulés par différents ligands des TLRs. Nous avons constaté que TLR2 et TLR4 par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice « myeloid differentiation primary response gene 88 » (MyD88) activent l'expression de HAMP dans les cellules RAW264.7 et les macrophages péritonéaux sauvages murins, tandis que cette expression a été supprimée dans les macrophages isolés des souris TLR2^{-/-}, TLR4-déficiente ou MyD88^{-/-}. En outre, nous avons constaté que la production d'IL-6 par les cellules RAW264.7 stimulées avec du LPS a été renforcée par l'ajout des quantités élevées de fer dans le milieu de culture.

Au cours de l'inflammation, le niveau de HAMP est fortement augmenté. Ainsi, lorsque l'inflammation persiste, l'expression de HAMP continue à être activée par des cytokines pro-inflammatoires conduisant à une hyposidérémie. Malgré que cette dernière soit considérée comme une défense de l'hôte pour priver les micro-organismes de fer, celle-ci cause un développement d'anémies nommées anémies des maladies chroniques.

Ainsi, dans le deuxième chapitre de la présente étude, nous avons étudié l'implication des TLRs et leurs protéines adaptatrices MyD88 et TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) dans le développement des hyposidérémies. En utilisant des souris déficientes en MyD88 et TRIF, nous avons montré que les voies de signalisations MyD88 et TRIF sont essentielles pour l'induction de HAMP par le LPS. Malgré l'absence de HAMP, les souris déficientes ont été capables de développer une hyposidérémie, mais la réponse des souris déficientes en MyD88 a été très légère, ce qui indique l'exigence de cette protéine pour assurer une réponse maximale au LPS. En outre, nous avons constaté que la signalisation MyD88 est nécessaire pour le stockage du fer au niveau de la rate, ainsi que l'induction de lipocaline 2 (LCN2), qui est une protéine impliquée dans la fixation du fer pour limiter la croissance bactérienne. Indépendamment de MyD88 ou TRIF, l'activation de TLR4 et TLR3 a conduit, au niveau de la rate, à une diminution rapide de l'expression de FPN et du « Human hemochromatosis protein » (HFE) qui est une protéine qui limite la séquestration du fer cellulaire à partir de la circulation. Cependant, malgré cette baisse d'expression, le manque de la signalisation MyD88 a altéré de manière significative la réponse hyposidérémique.

En établissant le rôle des TLRs et de la protéine adaptatrice MyD88 dans la diminution du taux du fer sérique au cours de la réponse inflammatoire, nous avons remarqué qu'en réponse au surcharge en fer les souris déficientes en MyD88 accumulent de manière significative plus de fer hépatique par rapport aux souris sauvages, et cela indépendamment des TLRs.

Ainsi, dans le troisième chapitre de la présente étude, nous avons étudié le phénotype observé chez les souris déficientes en MyD88. Nous avons trouvé que l'expression de HAMP chez ces souris a été plus faible que celle des souris de type sauvage. Pour cela, nous avons exploré la signalisation à travers la voie du « Bone Morphogenetic Proteins 6 » (BMP6) qui est considérée comme étant la voie fondamentale de la régulation de HAMP en réponse aux concentrations du fer intracellulaires et extracellulaires et nous avons trouvé que l'expression protéique de Smad4, un régulateur positif de l'expression de HAMP, est significativement plus faible chez les souris MyD88^{-/-} par rapport aux souris sauvages. En outre, on a montré que MyD88 interagit avec « mothers against decapentaplegic, Drosophila, homolog 4 » (Smad4) et que cette interaction est essentielle pour l'induction de HAMP à travers la voie BMP6.

En conclusion, notre étude montre que l'expression de HAMP dans les macrophages est régulée principalement par TLR2 et TLR4 à travers la voie MyD88 et que l'accumulation du fer dans les macrophages peut affecter les niveaux des cytokines pro-inflammatoires. En outre, nos analyses démontrent que le développement d'hyposidérémie en réponse au LPS se produit par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant de MyD88 qui est dissociée de la production de cytokines et de HAMP. En plus, nos recherches montrent que MyD88 est nécessaire pour l'expression de Smad4 et cela pour garantir une réponse optimale à travers la signalisation BMP6, conduisant ainsi à une expression adéquate de HAMP.

Enfin, la protéine MyD88 joue un rôle crucial dans, la régulation de HAMP au niveau des macrophages, la diminution du taux du fer sérique en réponse au LPS et le maintien de l'homéostasie du fer.

Mots-Clés

Inflammation

Fer

Hepcidine

TLRs

MyD88

TRIF

PAMPs

Macrophage

Hyposidérémie

BMP6

SMAD4

Abstract

Iron is an oligoelement necessary for normal functioning of all body cells and plays an essential role in many biological functions. However, the level of iron in the body must be well regulated, otherwise iron deficiency results in various pathological conditions such as anemia and decreased immunity. On the other hand, iron overload potentiates the multiplication of germs and infection worsens, and the formation of free radicals with toxic effects on cells and their components, thus promoting cardiovascular diseases, inflammation and cancer. Hepcidin (HAMP), a negative regulator of iron absorption, induces the degradation of the only known iron exporter ferroportin (FPN) resulting in the reduction of iron release by macrophages and in the inhibition of its gastrointestinal uptake.

HAMP is synthesized mainly by hepatocytes but also by macrophages. However, there are very little data about how HAMP is regulated in macrophages. More recently, we found that HAMP induction in the liver by polysaccharide (LPS) is dependent on the signaling pathway mediated by Toll-like receptor 4 (TLR4). Through TLR4, LPS induces the activation of macrophages which will secrete many different inflammatory cytokines, including Interleukine 6 (IL-6), responsible of hepatic HAMP expression. In the first chapter of the present study, we investigated HAMP regulation in the RAW264.7 macrophage cell line and in murine peritoneal macrophages stimulated with different TLR ligands. We found that TLR2 and TLR4 signaling through the myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) adaptor protein activate hepcidin expression in RAW264.7 cells and in wild-type murine peritoneal macrophages, while this expression was abolished in TLR2^{-/-}, TLR4-deficient or MyD88^{-/-} isolated macrophages. Moreover, we found that IL-6 production by RAW264.7 cells stimulated with LPS was enhanced by high amounts of iron present in the culture medium.

During inflammation, the level of HAMP is greatly increased. Thus, when inflammation persists, HAMP expression continues to be activated by proinflammatory cytokines leading to hypoferremia. Despite that the latter is considered as host defence to deprive microorganisms of iron, this will cause the development of anemia of chronic disease. Thus, in the second chapter of the present study, we investigated the involvement of TLRs signaling through their adaptor proteins MyD88 and TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) in the development of hypoferremia.

Using MyD88-deficient and TRIF-deficient mice, we show that MyD88 and TRIF signaling pathways are critical for HAMP up-regulation by LPS. Despite the lack of HAMP, both deficient mice were able to develop hypoferremia; however the response in MyD88 deficient mice was very mild, indicating the requirement of MyD88 adaptor protein for the acute hypoferremic response to LPS. Furthermore, we found that MyD88 signaling is required for iron sequestration in the spleen and the induction of lipocalin 2 (LCN2) which is a protein involved in iron sequestration that in turn limits bacterial growth. Independently of MyD88 or TRIF, the activation of TLR4 and TLR3 signaling resulted in rapid down-regulation of splenic FPN and the Human hemochromatosis protein (HFE) which is a protein that limit cellular iron uptake from the circulation. However, despite the latter down-regulation, the lack of MyD88 signaling significantly impaired the hypoferremic response.

While establishing the role of TLRs signaling through MyD88 adaptor protein in the acute phase of hypoferremia, we noticed that MyD88-deficient mice accumulate significantly more iron in their livers than wild-type mice in response to iron loading, and this independently of TLRs. Thus, in this third chapter of the present study, we studied the phenotype observed in MyD88-deficient mice. We found that HAMP expression in MyD88-deficient mice was lower than wild-type mice.

Regarding this result, we explored the Bone Morphogenetic Proteins 6 (BMP6) signaling which is considered to be the fundamental pathway regulating HAMP levels in response to intracellular and extracellular iron concentrations and we found by western blot that Smad4 expression is significantly lower in MyD88^{-/-} mice when compared to wild-type mice.

We further show that MyD88 interacts with the mothers against decapentaplegic, *Drosophila*, homolog 4 (Smad4), a positive regulator of HAMP expression, and that this interaction is critical for HAMP induction through the Smad4 iron-sensing pathway.

In conclusion, our study shows that HAMP expression in macrophages is regulated mainly through TLR2 and TLR4 receptors via the MyD88-dependent signaling pathway and that autocrine regulation of iron accumulation in macrophages by HAMP may affect the levels of proinflammatory cytokine production. Furthermore, our analysis shows that the development of hypoferremia during LPS response occur via a MyD88-dependent mechanism that is dissociated from peripheral cytokine production and hepatic HAMP induction.

This work shows that MyD88 is required for Smad4 expression to guarantee an optimum response to BMP6 signaling, leading to adequate HAMP expression. Finally, the MyD88 adpater protein plays a crucial role in the regulation of HAMP expression by macrophages, the development of the hypoferremic response by LPS and the maintenance of iron homeostasis.

Keywords

Inflammation

Iron

Hepcidin

TLRs

MyD88

TRIF

PAMPs

Macrophage

Hypoferremia

BMP6

SMAD4

Table des matières

Pages liminaires

Liste des abréviations.....	i
Résumé.....	vi
Mots-Clés	ix
Abstract	x
Keywords	xiii
Table des matières	xiv
Liste des tableaux	xvii
Liste des figures.....	xvii
Section 1. INTRODUCTION.....	1
1. Propriétés chimiques et fonctions biologiques du fer.....	2
1.1 Les hémoprotéines.....	3
1.2 Les protéines fer-soufre.....	5
1.3 Autres protéines contenant du fer	7
1.4 Protéines liant le fer	10
2. Toxicité du fer	14
3. Homéostasie cellulaire du fer.....	17
3.1 Captation du fer	17
3.2 Captation cellulaire du fer par des mécanismes dépendants de la transferrine .	17
3.2.1 Récepteur de la transferrine 1	17
3.2.2 Récepteur de la transferrine 2	19
3.2.3 Cycle de la transferrine	20
3.4 Devenir du fer cellulaire.....	23
3.5 Exportation du fer par la ferroportine	26
3.6 Régulation de l'homéostasie cellulaire du fer par le système IRE/IRP	27

4. Homéostasie systémique du fer.....	29
4.1 Distribution corporelle du fer	29
4.2 Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique par les macrophages	32
4.2.1 Mécanismes de l'érythrophagocytose et du recyclage du fer	32
4.3 Absorption intestinale du fer	35
4.3.1 Absorption du fer non héminique.....	36
4.4 Régulation systémique du fer	39
5. Hepcidine.....	41
5.1 Découverte de l'hepcidine	41
5.2 Rôle antimicrobien de l'hepcidine	42
5.3 Structure de l'hepcidine	43
5.4 Sites d'expression de l'hepcidine	44
5.5 Rôle de l'hepcidine dans la régulation de l'homéostasie du fer	46
5.6 Mécanisme d'action de l'hepcidine	47
5.6.1 Axe fonctionnel hepcidine-ferroportine.....	47
5.6.2 Interaction moléculaire entre l'hepcidine et la ferroportine.....	49
5.7 Régulation de l'expression hépatique de l'hepcidine	50
5.7.1 Régulation de HAMP par le signal des réserves en fer	50
5.7.2 Régulation de l'hepcidine par l'érythropoïèse et l'hypoxie	52
5.7.3 Régulation de l'hepcidine par le signal inflammatoire.....	54
5.8.1 Hémochromatose héréditaire	57
5.8.2 Anémie des maladies inflammatoires chroniques (ACD)	58
6. Les récepteurs Toll-like	61
6.1 Structure, localisation et ligands des TLRs	61
6.1.1 Structure des TLRs	61
6.1.2 Localisation des TLRs	62
6.1.3 Ligands des TLRs.....	63

6.2 Modulation de la réponse immunitaire par le TLRs	66
6.3 Voies de signalisation des TLRs.....	69
7. Objectifs du projet de doctorat	72
Section 2. MANUSCRIT 1	75
Abstract	76
Introduction	77
Materials and methods	79
Results	82
Discussion	84
Figures.....	86
Section 3. MANUSCRIT 2	76
Abstract.....	92
Introduction	93
Materials and Methods.....	96
Results	100
Discussion	105
Figures.....	110
Section 4. MANUSCRIT 3	118
Abstract	119
Introduction	120
Materials and Methods.....	122
Results	125
Discussion	130
Figures.....	136
Section 5. DISCUSSION	141
Section 6. CONCLUSIONS	152
BIBLIOGRAPHIE.....	153

Liste des tableaux

Table 1......98

Liste des figures

Section 1. INTRODUCTION

Figure 1. Structure des clusters fer soufre.....	6
Figure 2. Détoxification de l'oxygène et réaction de Fenton et de Haber-Weiss.....	16
Figure 3. Distribution corporelle du fer chez l'adulte.....	31
Figure 4. Erythrophagocytose et de recyclage du fer héminique.....	34
Figure 5. Absorption intestinale du fer alimentaire par les entérocytes.....	38
Figure 6. Séquences de l'hepcidine chez les mammifères et les poissons.....	45
Figure 7. Structure de l'hepcidine humain.....	45
Figure 8. Régulation de l'expression hépatique de l'hepcidine.....	56
Figure 9. Physiopathologie de l'hémochromatose.....	59
Figure 10. Physiopathologie de l'anémie des maladies chroniques.....	60
Figure 11. Les récepteurs Toll-like et leurs ligands.....	65
Figure 12. Modulation de la réponse immunitaire par les récepteurs Toll-Like.....	68
Figure 13. Voies de signalisation des TLRs.....	71

Section 2. Manuscript 1

Figure 1m1. TLR2 and TLR4 ligands induce hepcidin expression in RAW 264.7 and in murine peritoneal macrophages.....	86
Figure 2m1. TLR2 is required for hepcidin stimulation by Pam3CSK4 and FSL1 in murine peritoneal macrophages.....	87
Figure 3m1. TLR4 is required for hepcidin stimulation by LPS in murine peritoneal macrophages.....	88
Figure 4m1. MyD88 signaling is essential for hepcidin stimulation by TLR2 and TLR4 ligands in murine peritoneal macrophages.....	89
Figure 5m1. IL-6 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages varies with iron levels.....	90

Section 3. Manuscript 2

Figure 1m2. Distinct TLR ligands trigger acute hypoferremia in mice.....	111
Figure 2m2. MyD88-deficient mice are unable to sustain the acute hypoferremic response induced by LPS	111
Figure 3m2. TLR3 activation induces acute hypoferremia in wild-type and MyD88-/- mice without hepcidin induction:	112
Figure 4 m2. MyD88-/- and TrifLps2/Lps2 mice fail to produce IL-6 following LPS treatment but retain the ability to respond to IL-6 stimulation.....	113
Figure 5m2. MyD88 and TRIF signaling are not required for ferroportin downregulation, but MyD88 is critical for iron storage in the spleen.	115
Figure 6m2. The role of HFE in the hypoferremic response	116
Figure 7m2. The role of Lcn2 in the hypoferremic response.....	117

Section 4. Manuscript 3

Figure 1m3. Enhanced iron accumulation in the liver and inability to appropriately up-regulate hepcidin in response to dietary iron challenge in MyD88-deficient mice.....	137
Figure 2m3. Defective signaling through the Bmp6/Smad pathway in response to dietary iron loading in MyD88-/- mice involves diminished Smad4 levels in the liver	138
Figure 3m3. MyD88 enhances hepcidin expression and directly interacts with SMAD4	139
Supplementary Figure 1m3	140

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice Manuela Santos qui a accepté de diriger ce travail. L'obtention d'une thèse est un long processus et j'ai apprécié ses conseils tout au long de mon doctorat. Je suis particulièrement reconnaissant pour la manière dont elle a été toujours disponible pour fournir des informations détaillées et des orientations sur les points faibles à améliorer. Je remercie de même et vivement l'équipe de laboratoire Alexandre Reuben, Annie Calvé, Edward Bagu, Gabriela Fragoso et Hua Huang.

Je tiens également à remercier la direction de l'institut de cancer de Montréal pour les diverses bourses distribuées au cours de l'année et je remercie surtout la directrice générale Maral Tersakian, la coordonnatrice Julie Desgagnés et l'adjointe administrative Nathalie Tapp, pour leur incroyable capacité de gérer les dossiers des étudiants et de trouver des solutions à toutes sortes de questions.

Essentiellement toutes les recherches contenues dans cette thèse ont été réalisées au centre de recherche du CHUM. Il a été un plaisir de travailler avec un tel groupe de personnes au cours des ces sept dernières années. En particulier, je voudrais remercier l'agente de gestion financière Lise Allaire, l'agente Agente administrative Linda Côté et la technicienne de commandes d'équipements de laboratoires Chantal Corriveau. Je remercie le service d'animalerie, ainsi que Christian Demers et Geneviève Lauzon membres du comité institutionnel de protection des animaux.

Le même sentiment de reconnaissance est aussi exprimé à l'endroit de tout le corps enseignant et administratif de l'université de Montréal, pour la qualité des enseignements et la circulation de l'information

Je remercie également les membres du jury, ainsi que le représentant du doyen de la faculté de médecine. Mes remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Un énorme merci à mes parents et mes sœurs, de m'avoir toujours encouragé à faire ce que j'aime dans la vie, et surtout pour avoir cru en moi et en mes capacités. Merci tout simplement d'avoir été là et de me donner jour après jour autant d'amour.

Section 1. INTRODUCTION

Chez l'Homme, bien qu'il soit présent en très faible quantité, le fer joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques. Ce métal est un oligoélément nécessaire pour le fonctionnement normal de toutes les cellules de l'organisme. C'est un composant essentiel des protéines et des enzymes impliquées dans des processus métaboliques, tels que la production d'énergie, le transport de l'oxygène, et la synthèse de l'ADN. Le fer est également essentiel pour la régulation de la croissance et la différenciation cellulaires. Cependant, le taux du fer dans l'organisme doit être bien régulé sinon la surcharge en fer potentialise la disposition des microbes et aggrave les infections. En plus, un taux élevé en fer induit la formation des radicaux libres ayant des effets toxiques sur les cellules et leurs composants favorisant ainsi des pathologies cardiovasculaires, inflammatoires et cancéreuses. D'autre part, la carence en fer entraîne divers états pathologiques, comme l'anémie et la diminution de l'immunité.

1. Propriétés chimiques et fonctions biologiques du fer

Le fer est l'élément le plus abondant en masse sur Terre. Ce métal s'oxyde rapidement en composés insolubles d'où sa faible biodisponibilité. Dans des conditions d'aérobie, le fer ferreux (Fe^{2+}) est rapidement oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}) qui est pratiquement insoluble au pH physiologique. Dans ce contexte, les organismes biologiques ont évolué pour conserver ce métal [1, 2].

Au cours de l'évolution, les organismes ont choisi le fer pour différentes raisons : Le fer est le métal le plus répandu sur la croûte terrestre après l'aluminium. En plus, le fer peut exister dans plusieurs états d'oxydation, ce qui est essentiel pour le transfert d'électrons et pour sa liaison à divers ligands biologiques [3, 4, 5].

Étant un métal de transition ayant la capacité de pouvoir passer d'un état ferreux à un état ferrique et réciproquement, cela permet au fer de jouer un rôle essentiel dans plusieurs fonctions biologiques notamment dans le métabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que dans divers processus vitaux tels que la réponse immunitaire et le transport de l'oxygène [1, 6], [7].

En revanche, le fer joue un rôle de cofacteur dans un grand nombre de réactions enzymatiques impliquées dans la production d'énergie et dans le métabolisme des protides, glucides et lipides, ainsi que dans la synthèse de l'ADN [8, 9, 10].

En général, chez tous les organismes, trois types de réactions sont relatifs pour la plupart des fonctions biologiques du fer: l'oxydoréduction, l'hydrolyse et la formation de complexes polynucléaires [1].

Chez les organismes vivants, le caractère indispensable du fer est illustré par le fait qu'il agit comme un cofacteur pour plusieurs métalloprotéines y compris de nombreuses enzymes qui peuvent être classées en 4 catégories: **les hémoprotéines, les protéines fer-soufre, les protéines contenant du fer et les protéines liant le fer.**

1.1 Les hémoprotéines

Les hémoprotéines sont des métalloprotéines contenant un groupement prosthétique fonctionnel nommé hème [11]. Ce dernier est un composé organique conjugué à un groupe porphyrine lié à un atome de fer qui permet à une protéine d'effectuer une fonction que la protéine toute seule est incapable d'achever [12].

L'hème est synthétisé par toutes les cellules des mammifères et permet à des concentrations physiologiques un large éventail de fonctions biologiques essentielles, y compris la respiration mitochondriale, la biosynthèse des stéroïdes, le métabolisme des médicaments, les défenses cellulaires antioxydantes, les processus de transduction du signal, le contrôle de l'horloge circadienne, ainsi que le stockage du fer [4, 13]. En outre, l'hème est connu pour participer à la régulation des gènes en agissant comme ligand pour plusieurs facteurs de transcription chez les procaryotes, ainsi que chez les eucaryotes supérieurs. Toutefois, dans sa forme libre, l'hème induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), causant ainsi des dommages cellulaires oxydatifs et des lésions tissulaires sévères [14].

L'atome de fer incorporé au niveau de l'hème permet aux hémoprotéines la fixation des molécules qui peuvent lier ce métal divalent. Enfin, cette stratégie assure aux hémoprotéines diverses fonctions physiologiques cruciales [13].

En revanche, en présence des molécules diatomiques gazeuses comme l'oxygène (O_2), l'oxyde nitrique (NO), le monoxyde de carbone (CO) et l'hydrogène sulfuré (H_2S), l'hème agit comme protéine de sensation qui ensuite va jouer un rôle important dans la régulation transcriptionnelle.

Par conséquent, lorsque ces molécules gazeuses sont produites dans des systèmes biologiques, elles sont appelées des gazo-transmetteurs [15].

Parmi les hémoprotéines, on distingue :

a) L'hémoglobine et la myoglobine : L'hémoglobine est une protéine présente au niveau des globules rouges, alors que la myoglobine est une protéine présente au niveau des cellules musculaires des mammifères. L'hémoglobine et la myoglobine ont une fonction similaire et sont collectivement connues comme les hémoprotéines respiratoires dont le rôle est de fournir de l'oxygène pour les tissus de l'organisme [1, 16].

b) Les cytochromes : Les cytochromes sont des hémoprotéines membranaires. On distingue trois types de cytochrome : a, b et c. Ces enzymes sont impliquées dans la génération d'ATP à travers le transfert des électrons et le métabolisme mitochondrial énergétique. D'autres cytochromes, comme ceux du réticulum endoplasmique, sont impliqués notamment dans le métabolisme des acides gras [17].

c) Les oxydases, catalases et peroxydases : Ces enzymes sont surtout impliquées dans la catalyse et le processus de détoxification des ROS [18].

1.2 Les protéines fer-soufre

Les protéines fer-soufre sont extrêmement répandues dans la nature et sont capables d'effectuer une variété de fonctions. Leur capacité à subir des réactions de transfert d'électrons réversibles est essentielle pour leur rôle dans les chaînes de transport d'électrons et dans la détection de l'environnement oxydatif de la cellule [19].

Dans les protéines fer-soufre, les atomes du fer sont assemblés avec les atomes du soufre dans différents états d'oxydation, tels que (2Fe-2S), (3Fe-4S) ou (4Fe-4S), et cela pour former une structure appelée cluster [20]. Ces clusters fer-soufre (Fe-S) sont présents dans plus de 200 différents types d'enzymes ou de protéines, par exemple la rubrédoxine et la ferrédoxine qui interviennent dans la catalyse et le transfert des électrons dans une gamme de réactions métaboliques [21]. De plus, ces clusters sont présents dans toutes les cellules vivantes où ils participent à divers processus physiologiques, y compris la respiration, la photosynthèse, la réparation d'ADN, le métabolisme et la réglementation de l'expression génique [22].

D'autre part, la stabilité du cluster tend à diminuer avec l'augmentation globale de niveau d'oxydation ou bien en présence de ROS, ce qui conduit souvent à la conversion ou même une perte complète de cluster. En revanche, il existe des facteurs de transcription contenant des cofacteurs (Fe-S) qui agissent comme des capteurs d'oxygène ou de ROS, qui vont permettre aux organismes d'exploiter les bienfaits de l'oxygène atmosphérique, tout en limitant sa toxicité. Ce mécanisme de détection est toujours centré sur le cluster et implique d'importants réarrangements structuraux conduisant à des changements de conformation des protéines, ce qui va promouvoir ou abolir la liaison du facteur de transcription avec l'acide nucléique [23].

Par exemple, FNR (Fumarate and Nitrate reductase Regulatory) est un facteur de transcription sensible à l'oxygène, qui régule la transcription d'un large éventail de gènes en réponse à des changements dans les niveaux d'oxygène [24, 25]. Dans des conditions anaérobiques, FNR se lie à l'ADN sous forme de dimère. Toutefois, le dimère FNR ne peut se former qu'avec un monomère FNR ayant le cluster (4Fe-4S)²⁺.

Dans le cas où le niveau d'oxygène augmente $(4\text{Fe-4S})^{2+}$ est oxydé et ensuite transformé en $(2\text{Fe-2S})^{2+}$ inactif (Figure 1). Ainsi, le dimère FNR ne peut pas se former, ce qui va inhiber sa liaison à l'ADN et la transcription [26].

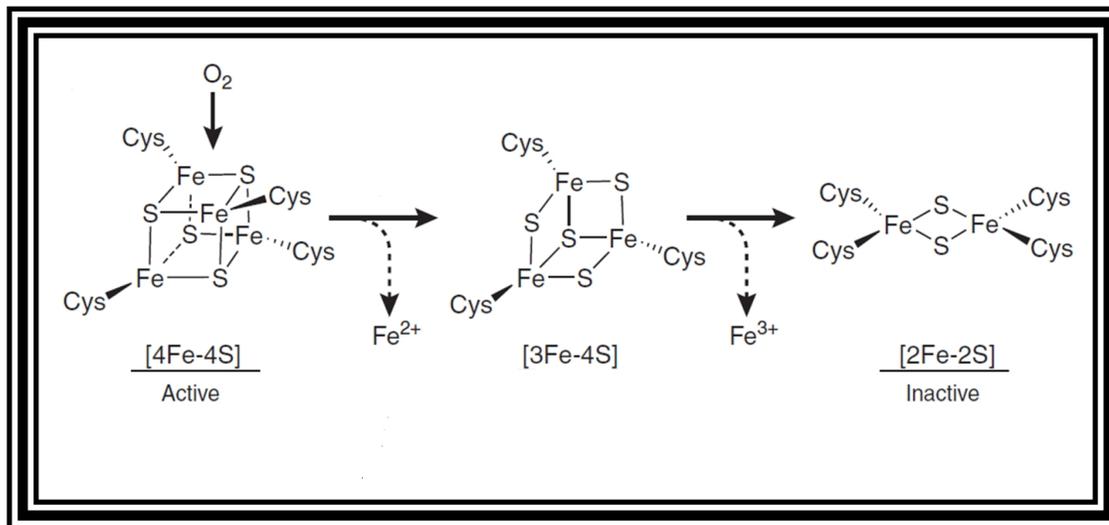


Figure 1. Structure des clusters fer soufre.

Légende: Les atomes du fer sont assemblés avec les atomes du soufre dans différents états d'oxydation, tels que 4Fe-4S ; 3Fe-4S et 2Fe-2S , formant une structure appelée cluster. Dans le cas d'oxydation, $(4\text{Fe-4S})^{2+}$ active est ensuite transformée en $(2\text{Fe-2S})^{2+}$ inactive. Importée de [26].

1.3 Autres protéines contenant du fer

Ce sont des protéines contenant l'atome du fer qui s'avère utile et nécessaire à leur fonctionnement, telles que les lipoxygénases, la lactoferrine et les ribonucléotides réductases :

a) Les lipoxygénases : À l'origine connues sous le nom de lipoxidases, les lipoxygénases (LOXs) appartiennent à la famille du fer non hémique contenant des dioxygénases [27]. On distingue plusieurs formes de ces enzymes, nommées : 5-, 8-, 12-, 15- et 12/15-LOX. Ces LOXs catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique et l'acide linoléique et les transforment en métabolites biologiquement actifs, tels que les leucotriènes (LT), impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire [28].

L'expression des LOXs et leurs métabolites sont limités spécifiquement à certains types de cellules et tissus, tels que les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales, les monocytes et les leucocytes. L'activation des LOXs est généralement rapide et transitoire, une propriété censée être bien adaptée à leur rôle dans les infections et la cicatrisation des plaies, qui ont besoin d'une expression urgente et limitée dans le temps de molécules pro-inflammatoires [29].

Bien que les LOXs ont été intensément étudiées pour leurs implications dans l'immunité et l'inflammation, elles sont aussi impliquées dans la pathogenèse de plusieurs maladies, dont l'athérosclérose et le cancer [29, 30, 31, 32]. En plus, l'activité des LOXs influence le taux de prolifération cellulaire, ainsi que leurs apoptoses et leurs sénescences [33, 34]. À noter que jusqu'à présent, rien n'est connu sur la fonction biologique de ces enzymes chez les procaryotes.

b) La lactoferrine : La lactoferrine (Lf) est la seconde protéine la plus abondante dans le lait humain. C'est une glycoprotéine rencontrée chez les mammifères qui appartient à la famille des transferrines (Tf) [35]. La Lf est une composante essentielle de la réponse immunitaire innée: elle induit la production des cytokines de type Th1 au niveau de la rate et les cellules ganglionnaires, elle augmente l'activité phagocytaire des macrophages et des cellules NK (Natural Killer) et elle favorise la maturation des cellules dendritiques [36].

La Lf est produite par divers types de cellules comme les cellules épithéliales des voies respiratoires et mammaires. Elle est exprimée au niveau des sécrétions qui couvrent les surfaces des muqueuses, comme celles des voies respiratoires, intestinales et génito-urinaire qui sont généralement exposées à des agents pathogènes. Aussi, la Lf se trouve dans les sécrétions produites par les glandes exocrines dans la salive et les larmes, et elle est particulièrement abondante dans le colostrum et le lait des mammifères. La lactoferrine est également produite par les granules secondaires des neutrophiles et donc libérée dans le sang par la dégranulation et cela dans le cadre de la réponse inflammatoire [37].

La Lf est connue pour être une protéine multifonctionnelle ou multitâche. Elle présente des activités antitumorales, immunorégulatrices et antimicrobiennes [38, 39]. En fait, en séquestrant le fer qui est crucial pour la croissance bactérienne, la Lf présente une activité antibactérienne indirecte [40]. Par contre, la capacité de séquestration du fer n'est pas le moyen principal par lequel la Lf élimine les bactéries, mais il semble que la Lf ait un effet antibactérien direct, et cela en interagissant avec les composants structurels inhérents à la surface bactérienne. En effet, le principal rôle antibactérien de Lf et de ses dérivés sur les bactéries à Gram négatif dépend de sa liaison et de sa capacité à déplacer le lipopolysaccharide (LPS), ce qui va entraîner une désorganisation et une déstabilisation de la paroi bactérienne [40, 41]. En regard à ces diverses fonctions, cette molécule et ses dérivés sont considérés comme des outils importants pour la santé.

c) Les ribonucléotides réductases : Dans l'organisme, la propagation du matériel génétique d'une génération à l'autre nécessite une réplication de l'ADN. La précision de la copie génétique et la réparation des erreurs rencontrées durant la réplication dépendent des niveaux équilibrés des ribonucléotides et des désoxyribonucléotides [42].

Les ribonucléotides réductases (RNR) également connues sous le nom de ribonucléosides diphosphates réductases, sont les seules enzymes responsables de la conversion des nucléotides en déoxynucléotides dans toutes les cellules en division, et cela pour la synthèse de l'ADN [43]. La réaction catalysée par la RNR repose sur le remplacement du groupement C2-hydroxyle par un atome d'hydrogène et cela au niveau du ribose du ribonucléotide. Après phosphorylation, les molécules qui en résultent sont les précurseurs nécessaires à la synthèse et à la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [44].

Les RNRs sont réparties en trois classes et cela en fonction de leurs cofacteurs métalliques : la classe I, caractéristique des eucaryotes fréquente chez les bactéries, utilise le fer et l'oxygène. La classe II, caractéristique d'archées et des bactéries, utilise la cobalamine. La classe III, caractéristique d'archées et des bactéries, utilise les clusters fer-soufre couplés à l'adénosylméthionine [45].

Le ciblage de la réaction catalysée par RNR est important pour déclencher l'apoptose et cela en inhibant la réparation et la réplication de l'ADN, ce qui va entraver la prolifération cellulaire. En fait, l'inhibition de l'activité de la RNR et les événements qui en résultent ont été principalement une cible d'intervention thérapeutique anti-tumorale, anti-virale et anti-bactérienne, et cela pour un certain nombre de maladies humaines dans lesquelles la prolifération cellulaire anormale est responsable de maladies pathologiques [44].

1.4 Protéines liant le fer

a) Transferrine : Synthétisée au niveau du foie, la Tf ou sidérophiline est une globuline monomérique constituée d'une seule chaîne polypeptidique porteuse de 2 sites de captation du fer, à raison de 2 atomes du fer par molécule de Tf [46]

En liant, séquestrant et transportant les ions Fe^{3+} ferriques, la Tf joue un rôle fondamental dans le contrôle des niveaux du fer dans l'organisme, ce qui contribuera à maintenir la biodisponibilité du fer en empêchant en même temps le dépôt d'agrégats insolubles d'hydroxyde ferrique [46].

Dans des conditions physiologiques normales, la capacité de Tf à lier le fer inorganique est très forte et sa saturation est environ de 35%, ce qui suggère qu'il existe une capacité suffisante pour empêcher la libération du fer toxique dans la circulation qui endommage les cellules en catalysant la formation de radicaux libres [47]. Aussi, la Tf est susceptible d'être impliquée dans le transport d'un large éventail d'ions de métaux autres que le fer.

D'autre part, la Tf a une activité antimicrobienne qui repose apparemment sur le contact réel avec les bactéries plutôt que la privation du fer. Cependant, par translocation du fer aux sites tumoraux, la Tf peut amorcer la prolifération rapide des cellules tumorales [46].

b) Ferritine : La ferritine, ou hémosidérine, est une protéine impliquée dans le stockage et la régulation de la disponibilité du fer à l'état soluble et non-toxique. Ainsi, la ferritine peut libérer une grande quantité du fer quand le corps est en carence. La ferritine est présente dans le foie, le cœur, la rate et la moelle osseuse, et une quantité infime se trouve dans le sang sous forme de ferritine sérique [47].

Chaque molécule de ferritine comprend 24 sous-unités hétérodimériques de chaînes légères (L-ferritin) et lourdes (H-ferritin) pouvant stocker jusqu'à 4500 ions Fe^{3+} [48]. On distingue différentes combinaisons de sous-unités H et L, d'où la présence de divers isoformes qui diffèrent dans leurs propriétés métaboliques.

La sous-unité L prédomine dans les types de cellules qui jouent un rôle principal dans le stockage du fer, comme les hépatocytes [49]. Alors que la sous-unité H accumule et libère plus rapidement le fer, ce qui va limiter les dommages cellulaires en cas d'une surcharge en fer ou bien en cas de besoin, elle permettra une circulation intracellulaire dynamique cruciale de ce métal [48, 50].

La ferritine est induite suite au stress oxydatif et par les cytokines produites durant les processus infectieux et inflammatoires. La fonction principale de la ferritine dans ces conditions est de réduire la biodisponibilité du fer pour limiter la prolifération cellulaire incontrôlée et la production excessive des ROS [51].

D'autre part, le niveau de la ferritine intracellulaire est déterminé par l'équilibre entre la synthèse et la dégradation. La dégradation de la ferritine dans le cytosol provoque la libération du fer, tandis que la dégradation de la ferritine dans les lysosomes induit la formation d'hémosidérine, ce qui présente une protection contre la toxicité de fer [52]. La majorité de la ferritine se trouve dans le cytosol et peut être également trouvée dans des organites tels que les noyaux et les mitochondries. Enfin, en plus de la régulation de la biodisponibilité du fer, la ferritine peut aussi contribuer à la myélopoïèse et aux réponses immunologiques [48].

c) LCN 2: C'est un petit peptide antimicrobien de 25 kDa, connu aussi sous le nom de lipocaline associée au gélatinase de neutrophile. LCN2 a été d'abord identifié au niveau du complexe de la matrice métalloprotéinase-9 dans les neutrophiles humains [53, 54]. La liaison de LCN2 au métalloprotéinase-9 a pour but de protéger l'enzyme de la dégradation, préservant ainsi son activité [55].

Les fonctions biologiques de LCN2 reposent sur sa capacité de lier le fer associé aux sidérophores, privant ainsi les bactéries pathogènes de ce métal, ce qui va limiter leur prolifération [56, 57]. Ainsi, les souris déficientes en LCN2 ont montré une sensibilité accrue aux infections bactériennes [56]. Chez l'Homme, des niveaux élevés de LCN2 se trouvent dans les tissus qui sont sujets aux infections par des micro-organismes, tels que la trachée artère, les poumons et l'estomac [58].

Malgré sa capacité de lier le fer libre dans la circulation, une étude faite dans notre laboratoire a montré que LCN2 n'est pas essentiel dans le transport du fer dans le foie durant l'hémochromatose, « an iron overloading disease » [59]. D'autre part, il a été également montré que LCN2 induit la différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses en tubules épithéliaux au cours du développement des reins, et cela grâce à la livraison du fer à l'intérieur de ces cellules [60]. LCN2 exerce aussi des effets sur les cellules de mammifères exprimant le récepteur au lipocaline 2 (Lcn2R ou bien 24p3R). Par un mécanisme dépendant de la déplétion intracellulaire en fer, la liaison de LCN2 à son propre récepteur, induit le déclenchement de l'apoptose cellulaire [61].

d) Protéines de liaison Poly (rC) 1 et 2 : Les cellules de mammifères expriment une centaine de métalloprotéines. La plupart contiennent des métaux abondants comme le fer et le zinc, tandis que d'autres contiennent des traces de métaux différents tels que le cuivre, le manganèse, le molybdène et le cobalt. Ces métaux sont des nutriments essentiels parce que les cofacteurs métalliques activent divers enzymes et protéines qui remplissent des fonctions critiques dans presque tous les processus. Au niveau des cellules, les métallochaperones cytosoliques qui transportent le cuivre et le nickel ont été bien définis, tandis que celles liant le fer ne sont pas encore bien étudiées [62].

La capacité de stockage du fer dans la ferritine est essentielle pour la vie chez les mammifères, mais le mécanisme par lequel le fer cytosolique est livré à la ferritine était mal connu. Récemment, il a été montré que les protéines de liaison Poly (rC) 1 et 2 (PCBP1 et PCBP2) agissent comme des protéines chaperones qui lient le fer et le présentent à la ferritine pour assurer son stockage.

Les cellules de mammifères n'exprimant pas PCBP1 présentent un défaut dans l'incorporation du fer au niveau de la ferritine, ainsi qu'une augmentation du fer cytosolique [63].

D'autre part, PCBP1 et PCBP2 se lient aux ARNs cytosoliques viraux, affectant ainsi leur stabilisation et leur traduction. Les PCBPs jouent également un rôle dans la régulation transcriptionnelle et participent à plusieurs interactions protéine-protéine [64].

2. Toxicité du fer

Étant un élément bioactif, l'excès de fer libre devient toxique pour l'organisme. Une surcharge en fer provoquera des dommages aux organes comme le foie, le cœur, le pancréas, la thyroïde et le système nerveux central. Le corps ne possède aucun moyen physiologique pour excréter le fer. Ainsi, le niveau de fer dans l'organisme est régulé principalement au niveau de son absorption [47]. L'apport alimentaire quotidien du fer est de 15-20 mg dont 10% sont absorbés par le corps. Chez les sujets sains, l'absorption quotidienne de fer est de 1 à 2 mg. Cette quantité de fer absorbée sera équilibrée par 1 à 2 mg de perte au niveau de la peau, pendant la menstruation et la grossesse. D'autre part, le taux d'absorption du fer est augmenté dans des conditions telles que l'anémie, l'hypoxie et aussi par la présence des maladies héréditaires ou bien acquises telles que l'hémochromatose et la thalassémie [65].

Dans des conditions physiologiques normales, le fer extracellulaire est exclusivement lié à la Tf qui maintient le fer soluble et non toxique, incapable de s'engager dans des réactions chimiques dangereuses par rapport à l'organisme. Une fois que la capacité de liaison de la Tf est complètement saturée, le fer libre restant dans le plasma devient détectable et sera nommé fer labile ou bien « Non-transferrin bound iron » (NTBI). Ce dernier sera ensuite déposé dans divers tissus et organes [66].

Le fer déposé dans les tissus peut donner lieu à des radicaux libres qui finissent par endommager les cellules et interfèrent avec la fonction des organes. Les manifestations cliniques qui en résultent dépendent de l'organe affecté et peuvent inclure l'insuffisance cardiaque, la cardiomyopathie, la cirrhose, le cancer du foie, le diabète et l'arthrite [65].

Lorsque l'un des sites de liaison de l'atome de fer est libre, ce métal exerce une réaction d'échange d'électrons dont le potentiel induit la formation des radicaux libres [67]. Normalement, une petite portion de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est réduite pour former des superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) qui seront convertis en eau (H_2O) par la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx) (Figure 2).

Par contre, dans un environnement intracellulaire réducteur et en présence de l'oxygène, le fer libre va s'engager dans la réaction de Fenton et va réagir avec la peroxyde (H_2O_2) pour produire des radicaux hydroxyles (OH) [68]. D'autre part, les superoxydes peuvent également réagir avec le fer ferrique par la réaction de Haber-Weiss pour produire du fer ferreux qui à son tour va affecter le cycle redox [69]. Enfin, ces deux réactions vont induire un stress oxydatif qui sera responsable de l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides membranaires, la modification des acides nucléiques, la dysfonction mitochondriale, et enfin le dysfonctionnement et la mort cellulaire [68, 70].

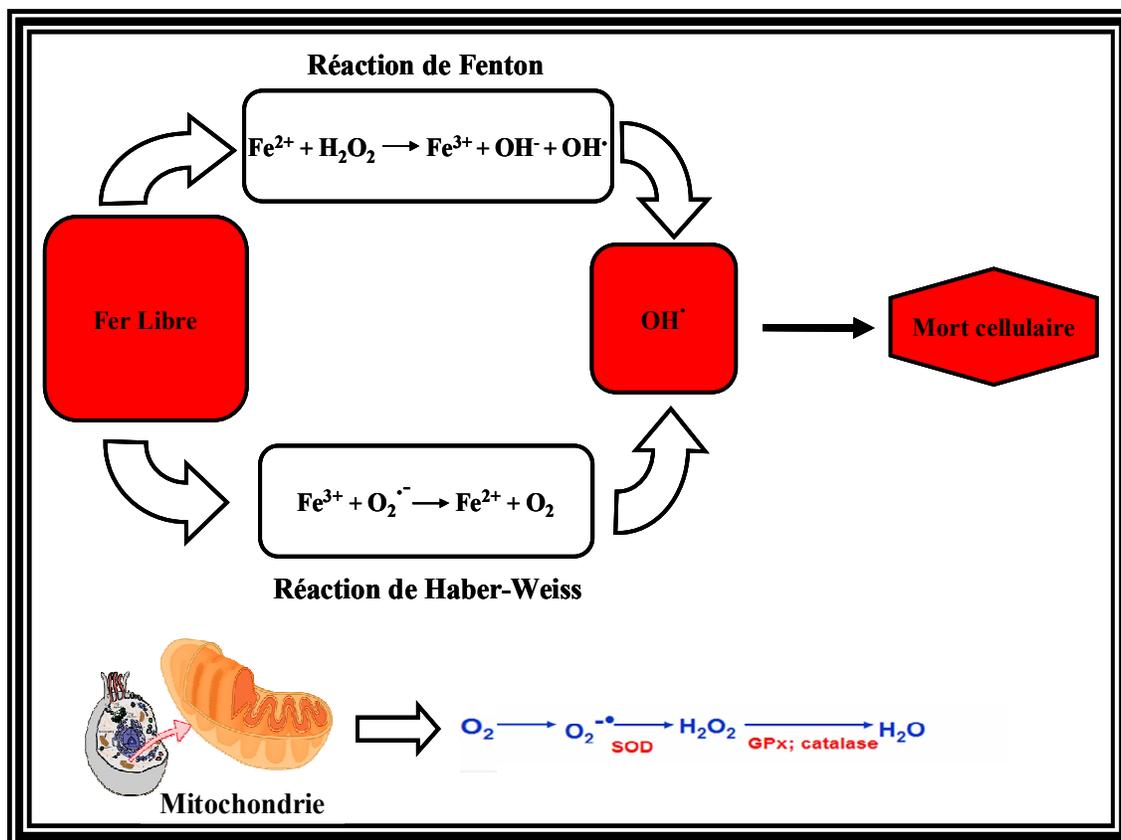


Figure 2. Détoxification de l'oxygène et réaction de Fenton et de Haber-Weiss.

Légende : L'oxygène utilisé par la mitochondrie est réduit pour former des superoxydes qui seront convertis en eau (H_2O) par la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx). Dans des conditions physiologiques normales, le fer est lié à la transferrine qui maintient le fer soluble et non toxique incapable de s'engager dans des réactions de réactions toxiques à l'organisme, tandis que dans le cas d'un excès en fer, ce dernier va s'engager dans les réactions de Fenton et de Haber-Weiss et entraîner la libération des radicaux hydroxyles toxiques.

3. Homéostasie cellulaire du fer

En raison de son activité redox intrinsèque, le fer libre est une molécule potentiellement toxique en biochimie cellulaire. Ainsi, l'homéostasie du fer doit être assurée à la fois au niveau cellulaire et par l'organisme dans son ensemble. Au niveau cellulaire, l'homéostasie du fer est maintenue au niveau de la **captation**, du **stockage** et de l'**exportation** du fer.

3.1 Captation du fer

Comme le fer joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire et les processus biologiques, sa captation par divers types de cellules est nécessaire. Parmi les mécanismes de séquestrations du fer par les cellules, on distingue :

- Des mécanismes dépendants de la Tf, utilisés par la plupart des cellules.
- Des mécanismes spécifiques observés dans les macrophages et les entérocytes.
- Des mécanismes indépendants de la Tf.

3.2 Captation cellulaire du fer par des mécanismes dépendants de la transferrine

3.2.1 Récepteur de la transferrine 1

Le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) est la cible principale de la Tf dans le système de transport du fer. Ce récepteur joue un rôle majeur dans l'absorption du fer cellulaire en se liant et internalisant par endocytose le fer lié à la Tf.

Le TfR1 appartient au groupe des récepteurs présentant un cycle endocytose-recyclage qui s'active par la fixation du ligand. C'est un homodimère exprimé sur la surface de pratiquement tous les types de cellules.

L'expression la plus large de ce récepteur a lieu au niveau des cellules nécessitant un apport important et continu en fer, comme les précurseurs médullaires de la lignée érythrocytaire. Il est connu que l'expression du récepteur augmente au cours de la maturation cellulaire, ainsi que dans le foie et les cellules en division rapide normales et malignes [71].

Chez l'Homme, le gène de TfR1 est situé sur le chromosome 3q29. Au niveau du promoteur, l'expression de TfR1 est stimulée par l'hypoxie et l'anémie, tandis qu'elle est réprimée dans le cas de surcharge en fer [72].

La forme protéique de TfR1 est une glycoprotéine dimérique faite de deux chaînes identiques. Ces deux chaînes, ayant une masse moléculaire de 84,91 kDa, sont parallèles et solidarisées par deux ponts disulfures établis entre les deux résidus 89 et 98. Chacune des deux chaînes comporte 760 résidus d'acides aminés répartis en trois domaines fonctionnels [73, 74, 75]:

- Extracellulaire carboxyterminal : Composé de 671 acides aminés, ce domaine fixe la Tf avec une grande affinité lorsque celle-ci est chargée de deux atomes du fer [76].

- Transmembranaire : Composé de 28 acides aminés, ce domaine assure l'ancrage du récepteur au niveau de la membrane plasmique [77].

- Cytosolique aminoterminal : Composé de 61 acides aminés, ce domaine est impliqué dans l'internalisation du récepteur chargé de son ligand [78].

Des orthologues de TfR1 ont été trouvés chez certains vertébrés. Chez l'Homme TfR1 semble être spécifique et ne se lie pas à la TF des bovins [79].

3.2.2 Récepteur de la transferrine 2

Ayant une masse moléculaire de 105 kDa, TfR2 est une protéine transmembranaire de type II connue comme étant un paralogue de TfR1. Le gène humain codant TfR2 est situé sur le chromosome 7q22 et la partie extracellulaire de la protéine présente 66% d'identité avec celle de TfR1 [80]. Contrairement au TfR1, l'expression cellulaire de TfR2 est limitée principalement au niveau des hépatocytes en différenciation et beaucoup moins sur les érythroblastes et le duodénum [71].

Contrairement au TfR1, TfR2 humain peut se lier aux deux Tf bovines et humaines, ce qui suggère une interaction moins spécifique que celle observée avec TfR1 [79]. Bien que TFR2 puisse se lier à la Tf, son affinité est 25 fois plus faible que celle de TFR1, suggérant que la capture du fer n'est pas la principale fonction de ce récepteur [71]. D'autre part, TfR2 n'était pas en mesure de compenser la fonction du TfR1 dans les souris $Tfr1^{-/-}$ qui meurent dans l'utérus. Ainsi des mutations au niveau du gène de ce récepteur ont été identifiées chez des patients italiens qui ont développé une surcharge en fer hépatique, indiquant qu'en plus de sa capacité de transporter le fer dans les cellules, TfR2 est également important dans le maintien de l'homéostasie du fer [81].

TfR2 est aussi associé au récepteur de l'érythropoïétine et permet le transport de ce dernier à la surface cellulaire [82]. Enfin, les orthologues de TfR2 ne se trouvent que chez les vertébrés, et à ce jour, aucun n'a été identifié chez les oiseaux ou les reptiles [83].

3.2.3 Cycle de la transferrine

Dans les conditions physiologiques normales, le fer est principalement transféré vers le compartiment médullaire où il est nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine au niveau des cellules progénitrices érythroïdes. La fraction du fer non orientée vers ce compartiment est partagée entre les divers autres sites d'utilisation comme les types de cellules qui se divisent rapidement et les sites de stockage représentés surtout par les hépatocytes, particulièrement sensibles aux surcharges en fer [8].

Le fer est principalement transporté dans le plasma sous forme de Fe^{3+} lié à la Tf, nommé holotransferrine. TfR1 peut lier une molécule de Tf à chacune de ses deux sous-unités. La charge en fer de la Tf influence son affinité pour le TfR1, ainsi la Tf diferrique a respectivement une plus grande affinité pour TfR1 par rapport à la Tf monoferrique et l'apotransferrine (Tf sans fer) [84].

L'interaction entre la holotransferrine et le TfR1, va entraîner ensuite l'endocytose et le recyclage de ce complexe. Ce système d'internalisation porte le nom de « transferrin-to-cell cycle » [75, 84].

Au niveau de la surface cellulaire, l'interaction entre la holotransferrine et TfR1 se fait par une interaction physico-chimique, ne nécessitant ni température physiologique ni énergie métabolique [85]. Le complexe holotransferrine-TfR1 est internalisé par endocytose clathrine-dépendante [86].

Ensuite, l'endosome formé subit une acidification progressive ou bien une protonation qui est ATPase-dépendante, ce qui entraîne la libération du Fe^{3+} de la Tf, et cela dans un pH acide d'environ 5,5 [87]. Ceci est facilité par le fait que Tf reste lié à TfR1 car un pH légèrement acide n'est pas suffisant pour éliminer efficacement le fer à partir de ces deux sites de liaisons à la Tf [88].

En revanche, des études ont montré que le TfR1 joue un rôle non seulement par sa liaison à la Tf ferrique, mais aussi dans l'accélération de la dissociation du Fe^{3+} de la Tf dans l'endosome [88, 89]. D'autre part, bien que le pH minimum dans les endosomes ne soit pas suffisant pour libérer le fer de ces deux sites de liaison dans la Tf, les cellules sont capables de le faire avec une capacité remarquable. Ultérieurement, Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} par la ferriréductase Steap3 « six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3 » et est transporté par le « divalent metal transporter 1 » (DMT1) à travers la membrane endosomale dans le cytosole [90, 91].

Au pH acide de l'endosome, l'apotransferrine a une forte affinité pour le récepteur. Pour cela, elle demeure liée au TfR1 et le complexe est recyclé vers la surface cellulaire par un processus impliquant la protéine Sec1511 « secretion protein 15-like 1 » [92]. À la surface cellulaire et dans un pH physiologique, l'affinité de l'apotransferrine pour le récepteur diminue, ce qui entraîne sa séparation de TfR1 qui sera alors libre de lier d'autre Tf diferrique [93]. La demi-vie de Tf chez l'Homme est d'environ 8 jours, alors que le cycle Tf/TfR1 peut se compléter en 5 à 20 minutes et cela selon le type cellulaire. En d'autres termes, chaque molécule de Tf peut accomplir des centaines de cycles de liaison du fer au cours de sa durée de vie [94]. Enfin, si le TfR1 n'est pas lié à la Tf diferrique, il n'est pas endocyté et passe dans la circulation sous forme de TfR1 soluble (sTfR1) et cela grâce à des protéases membranaires [95].

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

Dans les conditions physiologiques normales, la Tf est connue comme étant la principale source de fer utilisée par les tissus de l'organisme [96]. Préalablement, on croyait que la Tf était le seul moyen pour délivrer le fer aux cellules. Alors que chez les humains ayant une maladie congénitale touchant la Tf, comme l'hypotransferrinémie (déficit en Tf) ou l'atransferrinémie (absence de la Tf), le fer est rapidement délivré aux tissus, et cela est associé par des états de surcharge en fer [97, 98]. Ces observations ont été aussi validées chez des souris Tf^{-/-}. En revanche, cela indique la

présence des mécanismes indépendants de la Tf impliqués dans la captation du fer cellulaire

Plusieurs types cellulaires spécifiques peuvent assimiler le fer par des voies alternatives qui sont indépendantes de la Tf. Par exemple, les macrophages peuvent acquérir de grandes quantités de fer à travers la phagocytose des érythrocytes sénescents. Suivant l'hémolyse, l'hémoglobine ou l'hème seront libérés dans le plasma. En revanche, l'haptoglobine (Hp), une protéine dérivée du foie, va se lier à l'hémoglobine libre, et le complexe va être endocyté par les macrophages à travers le récepteur CD163 [99, 100]. D'autre part, l'hème libre va être couplé à l'hémopexine, une glycoprotéine sérique synthétisée par le foie durant l'inflammation, et le complexe va être endocyté via le récepteur CD91 présent à la surface des macrophages, des hépatocytes et d'autres types de cellules [100, 101].

D'autres cellules spécialisées, comme les cellules intestinales, ont aussi la capacité d'acquérir le fer hémique et cela par le transport direct de l'hème à travers leur membrane plasmique [102, 103, 104].

Dans les conditions normales, la Tf a une affinité élevée pour le fer, ainsi la quantité de NTBI dans la circulation est extrêmement faible. Dans divers états pathologiques de surcharge en fer, comme la thalassémie et l'hémochromatose, la quantité de fer dans la circulation dépasse la capacité de liaison à la Tf, induisant l'apparition de NTBI qui est principalement présent sous la forme de Fe^{3+} [105, 106]. Ce dernier s'accumule dans la circulation pour être ensuite transporté vers les cellules des tissus parenchymateux par des mécanismes indépendants de la Tf [107].

Initialement, DMT1 avait été proposé comme transporteur majeur de NTBI au niveau du foie. Cependant, les souris n'exprimant pas DMT1 au niveau du foie ne sont pas protégées contre l'accumulation hépatique en fer [108]. Jusqu'à présent, il reste à clarifier comment NTBI fait son chemin à travers la membrane plasmique des cellules ; pourtant plusieurs candidats ont été suggérés :

a) Ferritine : Dans les états pathologiques, les lésions tissulaires induisent la libération de la ferritine intracellulaire dans le plasma. Son endocytose est médiée par TIM-2 (T cell immunoglobulin mucin) et le récepteur de la Tf Scara5 (scavenger receptor class A) [109]. Tandis que ferritine H peut être également internalisée lors de la liaison spécifique au TfR1 [110]. En plus de la voie Tf-TfR, les cellules précurseurs érythroïdes et les hépatocytes peuvent également capturer le fer à travers la ferritine [111]. Si d'autres voies d'absorption de ferritine existent, cela reste à déterminer.

b) Stimulateur de transport du Fe, SFT: Cette protéine a été isolée des cellules érythroïdes, des leucémies en tant que transporteur du fer. Elle semble jouer un rôle dans les mécanismes d'absorptions dépendantes et indépendantes de la Tf, mais son rôle reste mal caractérisé [112, 113].

c) Zip14: Le transporteur de Zinc Zip14, également connu comme SLC39A14, présente une capacité d'absorption de NTBI dans des cellules en culture, tandis que le rôle de cette protéine dans la surcharge en fer hépatique reste à établir. En dehors de cette activité, Zip14 semble également faciliter l'assimilation cellulaire du fer lié à la Tf, ainsi que l'absorption de NTBI dans les hépatocytes [114].

d) L-Type Ca²⁺ : Les canaux Ca²⁺ de type L sont des voies importantes, car elles permettent aux cardiomyocytes de prendre une quantité considérable de NTBI. Ainsi, dans des conditions de surcharge en fer, cette entrée mène à une accumulation du fer au niveau de cet organe et engendre éventuellement une cardiomyopathie [115].

En effet, le traitement des souris présentant une surcharge en fer par des inhibiteurs calciques a conduit à une atténuation du stress oxydatif et à l'accumulation de fer au niveau du myocarde [115]. Enfin, les canaux Ca²⁺ de type L semblent jouer un rôle dans la prestation de fer aux cellules neuronales [116].

e) Lipocaline 2 : Décrit antérieurement.

3.4 Devenir du fer cellulaire

Les organismes vivants essayent d'éviter un excès du fer libre par une régulation bien contrôlée de l'homéostasie du fer. Dans la plupart des cellules, l'homéostasie du

fer est contrôlée au niveau de l'absorption, l'utilisation et le stockage. Au niveau cellulaire, le fer est réparti entre trois pools différents : Le **pool de transit**, le **pool fonctionnel** et le **pool de stockage** [117].

a) Le pool de transit : Appelé pool du fer de bas poids moléculaire ou bien pool du fer labile (LIP), il s'agit du fer présent dans le cytosol lié à des espèces chimiques de bas poids moléculaire [118]. LIP passe rapidement à travers la cellule et constitue un carrefour de voies métaboliques des composés contenant du fer. Le terme « pool de fer labile » a été proposé en 1946 par Greenberg et Wintrobe, et réintroduit par Jacobs comme le pool transitoire de fer [119, 120]. Plus récemment, le terme « fer chélatable » a été introduit parce que sa détection est basée sur l'utilisation de chélateurs de métaux [121].

Probablement, LIP se compose de deux formes de fer ionique associées à une variété de ligands ayant une faible affinité pour les ions de fer. LIP ne représente que 3 à 5% du fer cellulaire total. LIP est complexé par divers chélateurs de bas poids moléculaire, comme du citrate, du phosphate, des glucides, des polypeptides, des phospholipides, des nucléotides et des nucléosides [121, 122]. Les niveaux de LIP reflètent le statut cellulaire, et ainsi des augmentations ou des baisses dans le LIP et ils activent des réponses liées à une déficience ou à une surcharge en fer [18].

La demande continue de fer pour la synthèse des protéines requiert un flux permanent en fer à partir du milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Par conséquent, l'absorption du fer est l'une des principales sources de LIP. En théorie, l'apport alimentaire en fer (1-2 mg) devrait passer au stade LIP avant qu'il ne soit séquestré par les protéines cibles. À partir de ce dernier, le fer est adressé soit vers le pool fonctionnel, soit vers le pool de stockage [123].

b) Le pool fonctionnel : Constitué par la quantité du fer nécessaire, le pool fonctionnel est suffisant pour assurer les communications intercellulaires, les fonctions respiratoires et la survie des cellules. Il s'agit du fer incorporé dans les protéines héminiques comme les cytochromes et l'hémoglobine, et aussi du fer cofacteur de multiples protéines contrôlant le cycle cellulaire, comme : GADD45 « Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45 Gene », p53 « Tumor protein 53 » et WAF1/p21 « cyclin-dependent kinase inhibitor » [124].

c) Le pool de stockage : Dans sa grande majorité, le pool de stockage est représenté par le fer lié à la ferritine. En fonction des besoins, ce métal peut être libéré pour gagner les sites d'utilisation.

3.5 Exportation du fer par la ferroportine

La ferroportine (FPN) est un transporteur critique en termes d'acquisition et de transfert de fer entre différents types de cellules. Cette protéine se trouve dans tous les tissus impliqués dans le métabolisme du fer tels que les macrophages, les hépatocytes et les entérocytes duodénaux. Elle est indispensable pour la distribution du fer entre les tissus, ainsi que pour son absorption par l'organisme. À ce jour, la FPN est connue comme étant la première et la seule exportatrice de fer identifiée chez les mammifères [125, 126].

Le fer élémentaire, non lié aux protéines, est repris comme Fe^{2+} par DMT1 (divalent metal transporter 1) présente à la surface luminale de l'entérocyte [127]. DMT1 n'est pas spécifique pour le fer et transporte différents métaux de transition.

L'importance de DMT1 dans l'acquisition du fer est indiquée par le défaut grave dans l'absorption intestinale du fer et cela chez des souris présentant des mutations au niveau de DMT1 [128]. Une fois que le fer est absorbé par DMT1 il passe dans le cytosol des entérocytes. Pour entrer dans la circulation et avoir accès à l'ensemble des tissus de l'organisme, le fer doit traverser la membrane basolatérale de l'entérocyte. Le transport à travers la membrane basolatérale est médié par la FPN. L'entérocyte a une courte durée de vie, environ 2 jours, ensuite le fer accumulé dans l'entérocyte sera perdu lorsque les cellules sont desquamées. Ainsi, l'absorption du fer dépend de transfert à travers les deux surfaces apicales et basales de l'entérocyte. Le transport du fer par Fpn est bien régulé, et ce règlement prévoit la coordination entre l'acquisition, l'utilisation et le stockage du fer.

Des études chez des souris « knock-out » ont montré qu'au stade embryonnaire, la perte totale de l'expression du FPN est létale. Cela est dû à l'incapacité de transférer le fer de la mère à l'embryon [129]. En effet, chez des souris $\text{FPN}^{-/-}$, où l'expression de la FPN est préservée durant l'interface materno-fœtale, les nouveau-nés présentaient une carence sévère en fer, causée par une déficience dans l'absorption intestinale du fer alimentaire, une diminution de la libération du fer hépatique, ainsi qu'une réduction de la libération du fer par les macrophages [129].

Ces études suggèrent que chez les mammifères, la FPN est la seule exportatrice du fer dans les tissus impliqués dans l'absorption, le recyclage et le stockage du fer [129].

Parmi les nombreux mécanismes qui concourent au maintien de l'homéostasie cellulaire du fer, un mécanisme post-transcriptionnel des gènes liés au métabolisme du fer semble particulièrement important : le système IRE/IRP.

3.6 Régulation de l'homéostasie cellulaire du fer par le système IRE/IRP

Le contrôle du fer cellulaire nécessite des mécanismes précis pour réguler son absorption, son stockage et son exportation. Chez les vertébrés, les protéines régulatrices du fer (IRP1 et IRP2) « iron regulatory proteins 1 and 2 » sont les principaux régulateurs de l'homéostasie du fer cellulaire.

La régulation systémique et cellulaire de l'absorption du fer est possible grâce à des mécanismes à la fois transcriptionnels et post-transcriptionnels. IRP1 et IRP2 sont des composantes importantes de la régulation post-transcriptionnelle. Ces protéines régulatrices se lient à des motifs structuraux appelés éléments de réponse au fer (IREs) « iron responsive elements » présents dans les régions 5' ou 3' non traduites (UTR) « untranslated regions » de l'ARNm codant pour des protéines essentielles du métabolisme de fer.

Les IREs sont des séquences nucléotidiques particulières avec des structures secondaires en épingle à cheveux [130]. Les ARNm de la ferritine possèdent une séquence IRE dans leur région 5'UTR, tandis que les ARNm codant le TfR1 possèdent cinq séquences IRE dans leur région 3'UTR [131, 132]. L'incidence de la liaison IRP-IRE est différente selon que la séquence IRE est localisée en 5' ou bien en 3' UTR. En effet, la liaison de l'IRP à l'IRE en région 5'UTR bloque la traduction de l'ARNm, alors que sa liaison à l'IRE en région 3'UTR empêche la dégradation de l'ARNm et permet donc sa traduction [133].

Lorsque les niveaux de fer intracellulaire sont faibles, IRP1 devient actif, sinon il va agir comme un cluster [4Fe-4S] contenant l'aconitase cytosolique, ce qui l'empêche de se lier aux IREs [134]. D'autre part, IRP2 sera dégradé par le protéasome [134]. Par exemple, dans des conditions de privation de fer, IRP1 et IRP2 se lient aux IREs en région 3' UTR des ARNm de DMT1 et TfR1 [135] et aux IREs en région 5' UTR des ARNm de Ferritine et Fpn1 [136]. Par conséquent, il y aura une expression accrue de DMT1 et TfR1, permettant aux cellules une plus grande capacité d'absorption du fer [135, 136]. En outre, la réduction de Fpn1 et de ferritine en raison de l'inhibition de la traduction permet de réduire l'exportation et le stockage de fer afin d'optimiser sa disponibilité intracellulaire [136].

Une réponse inverse se produit lors de surcharge en fer, ce qui conduit au contrôle homéostatique du fer intracellulaire. D'autre part, les IRPs peuvent répondre à la fois au niveau du fer intracellulaire et également aux signaux secondaires associés aux espèces redox actives tels que l'oxyde nitrique (NO) [137, 138].

La régulation coordonnée de l'absorption du fer, le stockage et l'exportation par les IRPs, veillent à ce que les cellules acquièrent suffisamment de fer pour leurs besoins sans atteindre des niveaux toxiques.

Bien qu'IRP1 et IRP2 présentent environ 64% d'identité, ils diffèrent à plusieurs égards. Contrairement à IRP1, IRP2 ne possède pas de cluster [4Fe-4S] et elle est principalement régulée par le fer qui entraîne sa dégradation. Par contre, IRP1 répond à des signaux qui dépendent ou non du fer et contrôlent sa fonction par différents mécanismes afin de maintenir une activité de liaison aux IREs qui permet le maintien optimal de l'homéostasie du fer cellulaire [10].

Également, les IRPs régulent d'autres ARNm contenant des IREs dans leurs régions 5' ou 3'. Par exemple, le facteur de transcription facteur 2α induit par l'hypoxie (HIF- 2α) et la protéine kinase α CDC42 [139, 140]. La présence des IREs dans une variété d'ARNm indique que la réglementation par ces derniers s'étend à d'autres processus que l'homéostasie du fer.

4. Homéostasie systémique du fer

Le fer est un véritable paradoxe étant d'une part indispensable à notre organisme, et pouvant d'autre part lui être nocif. Normalement, le corps perd le fer par la desquamation des cellules épithéliales de la peau, de la muqueuse gastro-intestinale et des voies biliaires et urinaires, ainsi que par les sécrétions gastro-intestinales, les larmes, la sueur et la perte de sang menstruel chez les femmes.

Par contre, les mammifères ne possèdent pas de mécanismes réglementés pour l'excrétion du fer. Pour cela, l'homéostasie systémique du fer est maintenue par la régulation de son absorption au niveau intestinal d'une façon à prohiber un trop peu qu'un trop du fer.

4.1 Distribution corporelle du fer

Au total, la teneur en fer d'un corps humain est d'environ 3 à 5 g [141]. Sur une base quotidienne et dans des conditions normales, seulement 1 à 2 mg du fer sont absorbés via les entérocytes des villosités du duodénum et de la partie proximale du jéjunum. Ce métal alimentaire absorbé est ensuite libéré dans la circulation où il va se lier à la Tf sérique.

Le fer est livré aux érythroblastes et à la plupart des tissus par l'intermédiaire de la Tf qui porte environ 3 mg de ce métal à l'état stationnaire. En fait, la majorité du fer est utilisée par la moelle osseuse à un rythme approximatif de 22 mg par jour pour assurer l'érythropoïèse [142].

Dans le corps humain, la plupart du fer est présent dans l'hème de l'hémoglobine des cellules érythroïdes (> 2 g) et dans la myoglobine des muscles (~ 300 mg) [4].

En fin de vie, les globules rouges sénescents sont éliminés de la circulation par les macrophages de système réticulo-endothélial, et le fer contenu dans l'hème sera recyclé. Le fer plasmatique est obtenu principalement par les macrophages du système réticulo-endothélial et dans une moindre mesure par l'absorption alimentaire à travers

les entérocytes duodénaux. Presque 22 mg de fer par jour sont recyclés par les macrophages, remplaçant ainsi le montant repris par la moelle osseuse.

Au niveau de la rate, du foie et de la moelle osseuse, les macrophages maintiennent une fraction transitoire de fer (~ 600 mg), tandis que l'excès de fer est stocké dans la ferritine à l'intérieur du parenchyme hépatique. En outre, des quantités absolument infimes de fer (~ 8 mg) sont utilisées pour la synthèse de différentes protéines intracellulaires contenant du fer, telles les cytochromes et les clusters fer-soufre [102].

L'excès de fer dans l'organisme est principalement stocké dans le foie. Chez un homme adulte, les réserves hépatiques peuvent aller de 0,5 à 1 g de fer. Par contre, chez les enfants et chez les femmes menstruées les réserves hépatiques sont plus faibles à cause des besoins et des pertes accrues. En cas de grossesse, une fraction significative de fer corporel est déviée vers le développement du fœtus.

Bien que le foie soit l'organe majeur du stockage du fer, dans le cas d'une surcharge, d'autres types cellulaires, comme les myocytes cardiaques et les cellules acineuses du pancréas, seront aussi chargés de ce métal, où son potentiel toxique peut causer une importante destruction tissulaire. Enfin, le transfert du fer entre divers tissus doit être bien orchestré pour maintenir son homéostasie (Figure 3).

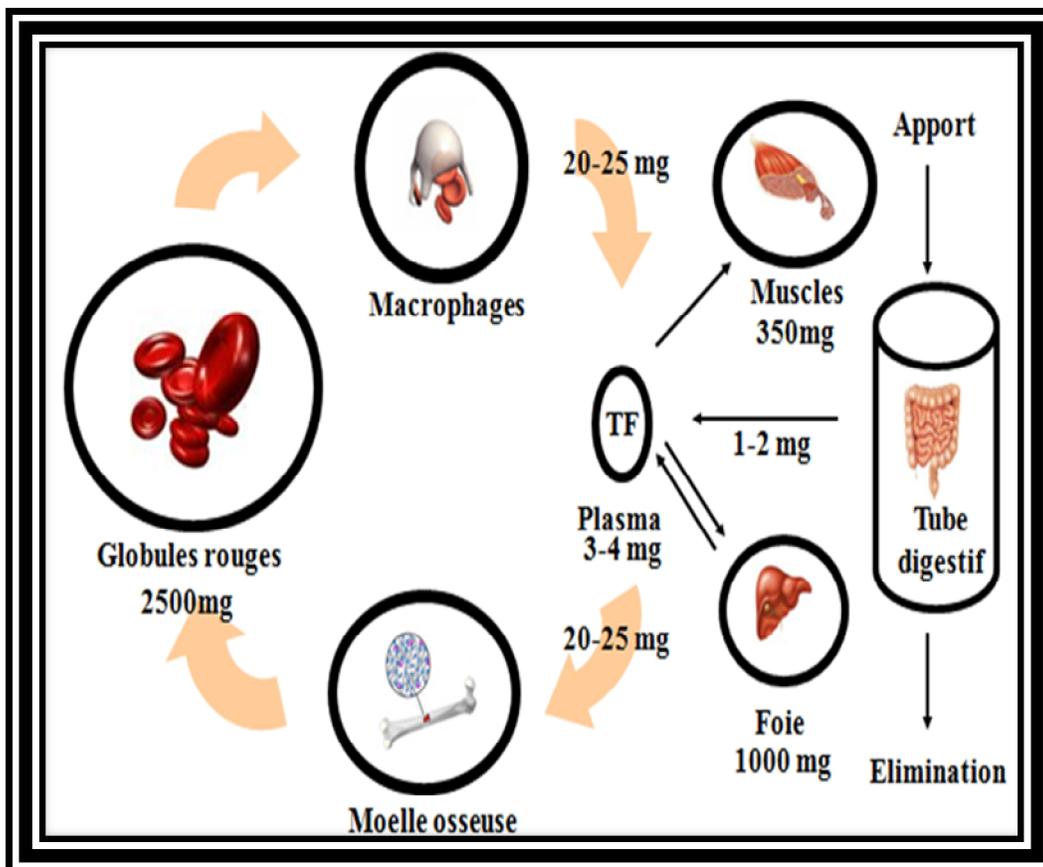


Figure 3. Distribution corporelle du fer chez l'adulte.

Légende : Le fer absorbé au niveau de l'intestin se lie à la transferrine (Tf) pour être distribué vers son plus grand consommateur : la moelle osseuse et les globules rouges circulantes. D'autre part, les macrophages tissulaires phagocytent les érythrocytes sénescents et recyclent le fer contenu dans l'hème. Enfin, le fer est stocké surtout dans les hépatocytes et retourne vers la circulation en cas de besoin.

4.2 Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique par les macrophages

Le système réticulo-endothélial est composé de cellules phagocytaires situées dans divers tissus et organes, tels que la moelle osseuse, le sang, le foie et la rate. Les macrophages sont impliqués dans la reconnaissance et la destruction des pathogènes et sont également responsables de l'élimination des cellules endommagées. À cet égard, les macrophages éliminent continuellement les globules rouges sénescents de la circulation périphérique [143].

Les macrophages du système réticulo-endothélial sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie du fer. Près de 80% du fer sont présents dans l'hémoglobine des érythrocytes sénescents [144]. Chaque jour, ces macrophages recyclent 25 mg du fer contenu dans les érythrocytes et assurent son exportation vers le plasma. Par la suite, le fer se lie à la Tf pour être réutilisé dans l'érythropoïèse. Toute perturbation de ce processus peut conduire à l'anémie, la surcharge en fer ou d'autres pathologies. En plus de leurs fonctions dans le remodelage des tissus et de l'immunité innée, cela met les macrophages au centre de recyclage systémique du fer.

4.2.1 Mécanismes de l'érythrophagocytose et du recyclage du fer

Chez l'Homme, la durée de vie des hématies est de 120 jours, tandis que chez la souris, cette durée de vie est de 45 jours [145]. La suppression des globules rouges sénescents de la circulation se fait par l'érythrophagocytose qui, principalement, a lieu dans les macrophages de la rate, mais aussi dans le foie et la moelle osseuse [146]. Les hématies sénescents ne représentent que 1% du total des globules rouges chez l'Homme et 2% chez les souris. Les macrophages reconnaissent les globules rouges par l'intermédiaire d'une série de marqueurs de sénescence.

Le vieillissement des globules rouges comprend une variation de diverses propriétés, comme la diminution de l'activité métabolique, les modulations quantitatives et qualitatives de la surface, les changements morphologiques [147]. La diminution de l'activité métabolique est illustrée par la perte de l'activité d'aspartate amino-transférase et celle de l'estérase.

Les modulations de surface comprennent l'exposition externe de la membrane, la diminution de la fluidité membranaire, la diminution des niveaux d'acide sialique et du marqueur CD47 [148]. En outre, les globules rouges sont naturellement endommagés par l'oxydation au cours du vieillissement et par le stress oxydatif [149].

Après la reconnaissance spécifique des globules rouges sénescents, ces derniers seront internalisés dans les macrophages par phagocytose. Ensuite, le phagosome continue sa maturation par une série d'événements de fusion membranaire avec différents compartiments vésiculaires, tels que les endosomes précoces et tardifs, ainsi que les lysosomes, pour former un phagolysosome. Dans ce dernier, l'hème est dégradé par l'hème oxygénase 1 (HO-1) [147]. Chez les souris déficientes en HO-1, l'hème semble pouvoir être dégradé, mais le fer n'est pas recyclé et s'accumule dans les macrophages [150]. Le fer libéré sort ensuite de l'endosome par DMT1 qui est un membre de la famille des protéines associées à la résistance naturelle du macrophage (NRAMP) « natural resistance-associated macrophage protein » [151].

Une fois libéré dans le cytosol, le fer hémique sera soit capté par la ferritine pour former le pool de réserve, soit recyclé vers le plasma à travers la FPN1 qui exporte le fer vers l'espace extracellulaire. Ensuite, Fe^{2+} sera oxydé en Fe^{3+} par la céruloplasmine (CP) et se fixera sur la Tf plasmatique pour être distribué aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse ou aux autres cellules pour leurs besoins métaboliques (Figure 4).

Enfin, les macrophages sont aussi capables de capter le fer à travers un mécanisme dépendant du complexe Tf- Fe^{3+} -TfR1.

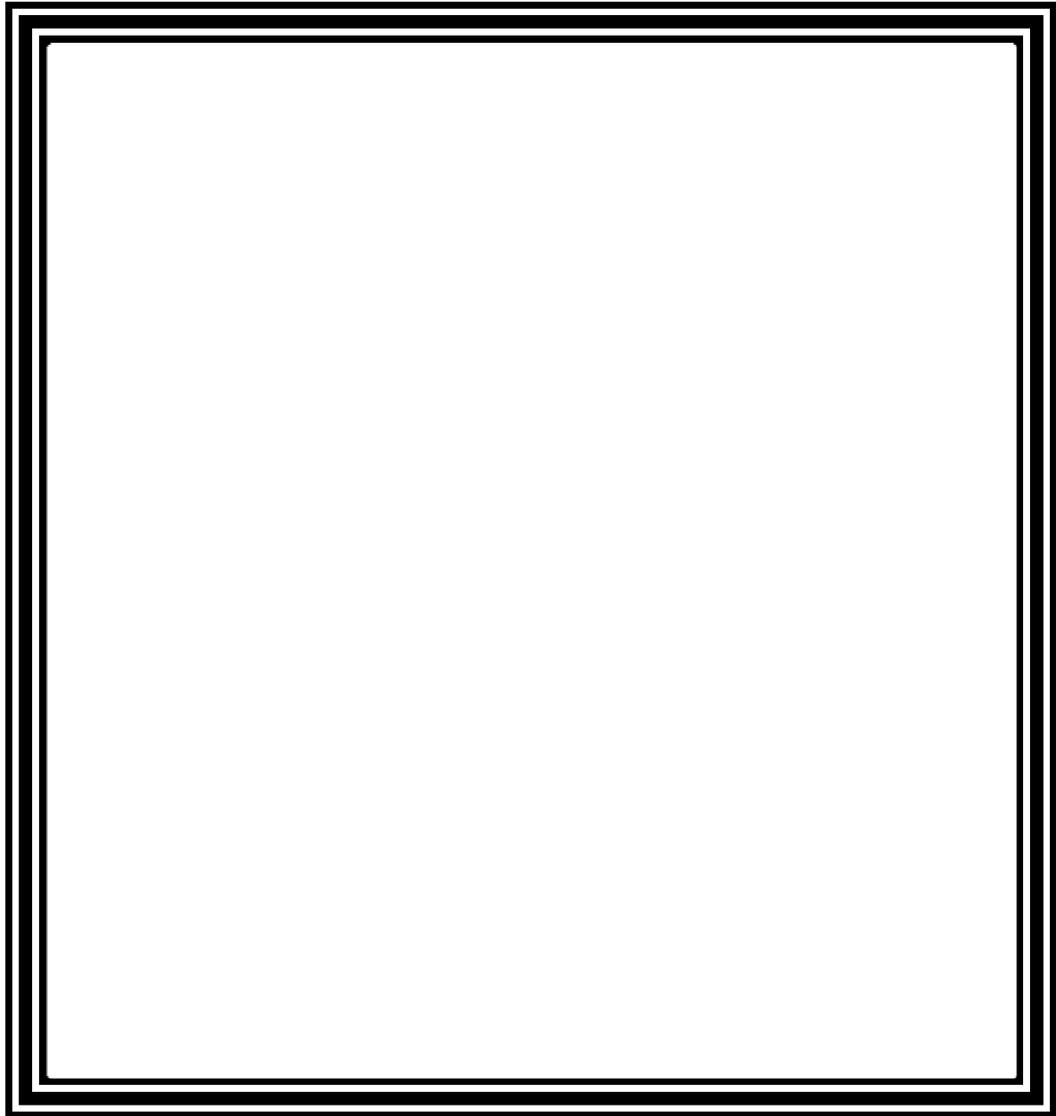


Figure 4. Erythrophagocytose et de recyclage du fer hémique.

Légende : Les macrophages sont capables de recycler et de stocker le fer contenu dans l'hème des globules rouges sénescents. L'hème est dégradée par l'hème oxygénase 1 (HO-1), ainsi le Fe^{2+} est libéré et sort de l'endosome par DMT1. Dans le cytosol, le fer sera soit capté par la ferritine pour former le pool de réserve, soit recyclé vers le plasma à travers la ferroportine1 (FPN1). Par la suite, le Fe^{2+} sera oxydé en Fe^{3+} par la céruloplasmine (CP) et se fixera sur la transferrine plasmatique pour être distribué aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse.

4.3 Absorption intestinale du fer

L'absorption du fer alimentaire se déroule au niveau de la partie proximale du jéjunum et des entérocytes des villosités du duodénum. Ces derniers sont issus de la maturation des cellules souches des cryptes. Les cellules souches des cryptes expriment à leur surface le TfR et sont donc capables de capturer le fer par un mécanisme dépendant de la Tf [152, 153].

Le fer provenant de la diète se trouve sous deux formes, le fer hémunique contenu dans la viande et le fer non-hémunique présent dans les végétaux et les produits laitiers.

Au niveau des entérocytes matures, le passage du fer hémunique ou nonhémunique de la lumière intestinale au plasma comporte trois étapes (Figure 5):

- 1) Le franchissement de la membrane apicale, de la lumière digestive vers l'entérocyte.
- 2) Le transport à l'intérieur de l'entérocytes, de la membrane apicale vers la membrane basolatérale.
- 3) Le passage de la membrane basolatérale de l'entérocyte vers le plasma.

4.3.1 Absorption du fer non héminique

Dans la lumière intestinale, le fer se trouve sous les deux formes Fe^{2+} et Fe^{3+} . Pour assurer l'absorption, le fer ferrique contenu dans l'alimentation sera réduit en fer ferreux par l'action d'une ferriréductase membranaire, le cytochrome b réductase 1 (Dcytb1) qui est présent d'une façon abondante au niveau de la membrane apicale des entérocytes [154].

Par la suite, Fe^{2+} est transporté vers le cytoplasme par l'intermédiaire de DMT1 qui est présent à des taux élevés dans les entérocytes de la bordure en brosse duodénale [155].

Ainsi, Fe^{2+} rejoint le pool du transit à partir duquel il sera soit stocké dans la ferritine, soit exporté au pôle basolatéral de l'entérocyte pour rejoindre la circulation sanguine par l'action coordonnée de FPN1 et l'héphaestine (HEPH), un homologue de la céruloplasmine [125]. Conformément à cette fonction, les souris déficientes en HEPH présentent une anémie ferriprive avec une rétention de fer dans la muqueuse intestinale.

4.3.2 Absorption du fer héminique

Le fer héminique est absorbé d'une façon presque similaire à celle du fer nonhéminique. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour cette absorption apicale. Le fer héminique est transporté vers le cytoplasme soit par endocytose [156], par diffusion passive [157] ou bien par transport actif par l'intermédiaire d'un transporteur [158]. Pour ce dernier, HCP1 (Heme Carrier Protein 1) a été identifiée comme un candidat pour ce rôle, et a été initialement décrit comme un transporteur à faible affinité pour l'hème présent dans le duodénum de la souris [159]. Maintenant il est établi que cette protéine est le PCFT/SLC46A1 (Proton-Coupled Folate Transporter) ou SLC46A1 [160]. Une étude récente n'exclut pas une double fonctionnalité de PCFT pour le folate et l'hème étant donné que l'ARNm de ce transporteur est élevé dans la carence en fer [161]. En outre, il a été suggéré que chez l'Homme, HCP1 participe dans le métabolisme de l'hémoglobine par la captation de l'hème au niveau macrophages [162]. Après être rentré dans le cytoplasme, l'hème est dégradé par HO-1

et ainsi Fe^{2+} est libéré et peut rejoindre le pool du fer non-héminique internalisé par DMT1 (Figure 5).

4.3.3 Absorption du fer par la voie du complexe intégrine–mobilferrine

La voie du complexe intégrine–mobilferrine « integrin-mobilferrin pathway » (IMP) permet également l'absorption du fer non-héminique [163]. Au niveau de la surface cellulaire des entérocytes, l'intégrine et la mobilferrine se lient uniquement au Fe^{3+} et le transportent vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le complexe protéique intégrine-mobilferrine se combine à la flavine monooxygénase et à la β -microglobuline pour former la paraferritine. Cette dernière est un complexe ayant une masse moléculaire de 520 kDa possédant une activité ferriréductase permettant la conversion du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cependant, ce modèle d'absorption est seulement observé dans les entérocytes et son mécanisme exact n'est pas encore complètement élucidé [164].

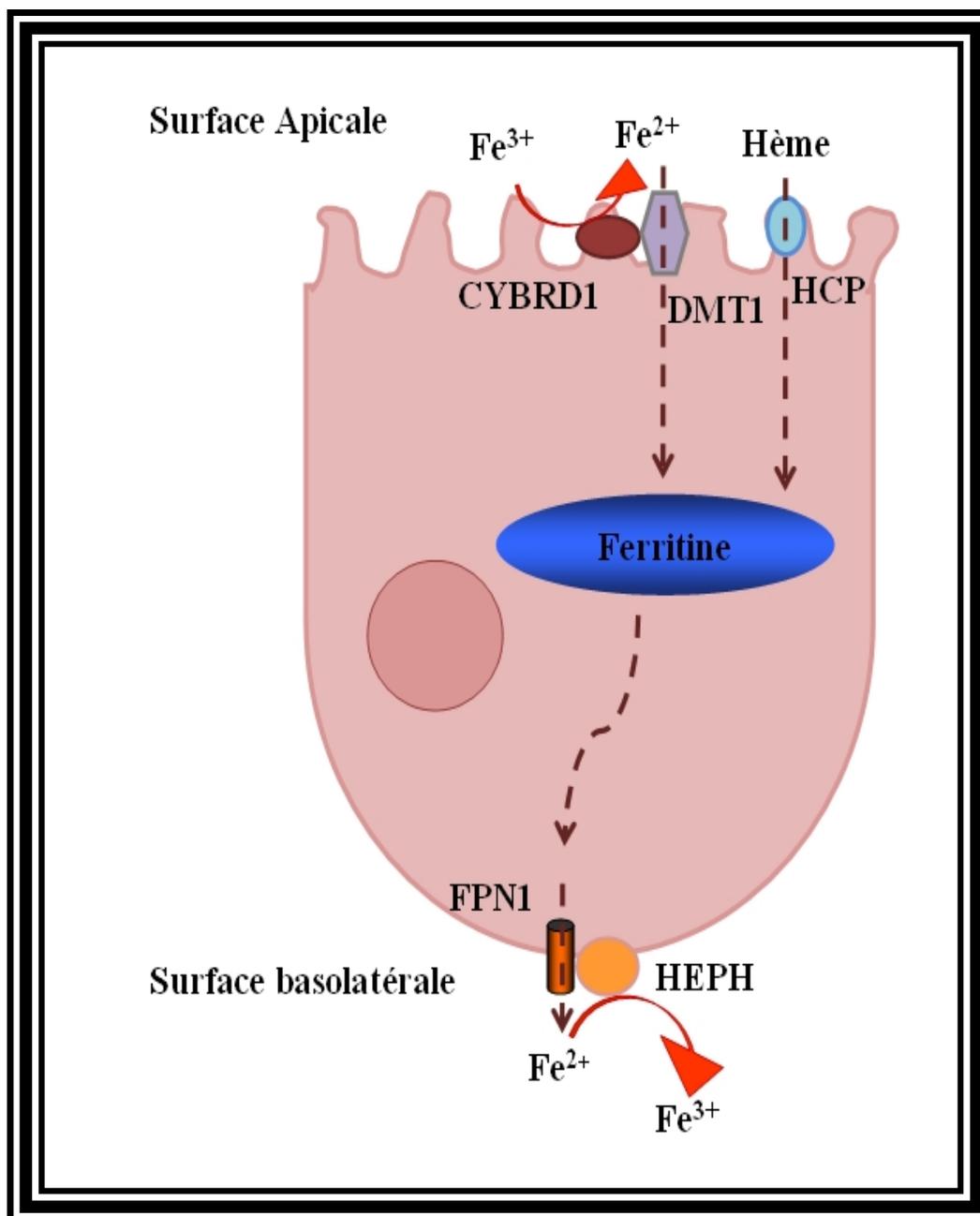


Figure 5. Absorption intestinale du fer alimentaire par les entérocytes.

Légende : Le fer hémique sera réduit en Fe^{2+} par le cytochrome b réductase 1 (CYBRD1), ensuite le Fe^{2+} est transporté vers le cytoplasme par DMT1, tandis que le fer hémique est transporté vers le cytoplasme par le transporteur apical HCP1 (Hème Carrier Protein 1), pour rejoindre ensuite le pool du fer nonhémique. Ainsi, le Fe^{2+} rejoint le pool du transit à partir duquel il sera soit stocké dans la ferritine, soit exporté au pôle basolatérale de l'entérocyte pour rejoindre la circulation sanguine par l'action coordonnée de ferroportine (FPN1) et héphaestine (HEPH).

4.4 Régulation systémique du fer

L'Homme ne possède pas une régulation physiologique efficace capable de contrôler et réguler le métabolisme du fer. Par conséquent, l'homéostasie du fer dans l'organisme est régulée au niveau de son absorption. C'est pour cela que la régulation inadaptée de l'absorption du fer conduit à une carence ou bien à une surcharge en cet ion métallique. En fait, plusieurs facteurs contribuent au maintien de l'homéostasie du fer, notamment la diète alimentaire, le contenu total en fer de l'organisme, l'activité érythropoïétique, l'hypoxie et les infections.

a) La diète alimentaire : L'absorption intestinale du fer est influencée par la quantité du fer récemment apportée par l'alimentation. Ainsi, une quantité excessive du fer dans l'alimentation pendant plusieurs jours peut induire une moindre absorption du fer par les entérocytes. Ce phénomène est aussi connu sous le nom de « bloc muqueux » [165].

b) Le contenu en fer de l'organisme : L'absorption intestinale du fer varie d'une façon inversement proportionnelle au stock du fer dans l'organisme. Il est bien établi que dans des conditions déficientes en fer, l'absorption est significativement stimulée, tandis que lorsque les réserves en fer sont reconstituées, l'absorption revient au niveau de base [166]. Ce type de régulation semble intervenir dans la programmation des cellules souches des cryptes qui agissent comme senseur du niveau de saturation de la Tf sérique. En fait, la quantité du fer absorbée à partir de l'alimentation est déterminée par les concentrations de DMT1 et de FPN1 au niveau des entérocytes matures et ces concentrations sont probablement programmées par l'action du système IRE/IRP en fonction de la quantité du fer au niveau des cellules cryptiques [93].

c) L'activité érythropoïétique : La majorité du fer de l'organisme est utilisée par la moelle osseuse pour la synthèse de l'hémoglobine des globules rouges durant l'érythropoïèse. Pour cela, l'activité érythropoïétique a une fonction dominante dans le contrôle de l'homéostasie du fer. En d'autres termes, ce signal a une plus grande capacité d'augmenter l'absorption du fer par rapport au contenu total en fer de

l'organisme [8, 167]. En outre, dans les troubles touchant l'érythropoïèse tels que la thalassémie, l'anémie sidérolastique et l'atransferrinémie, ce signal augmente l'absorption du fer indépendamment des réserves corporelles, ce qui entraîne une accumulation pathologique du fer [1].

d) L'hypoxie : L'hypoxie aiguë entraîne une augmentation de l'absorption du fer, ainsi que la production de l'érythropoïétine (EPO) qui est une hormone qui stimule l'érythropoïèse [168]. Cela va produire un effet semblable au signal de l'activité érythropoïétique. Cependant, il est incertain si cette voie de régulation est vraiment distincte de celle induite par les régulateurs de l'activité érythropoïétique [117].

e) Les infections : Les infections sont des régulateurs puissants du métabolisme du fer. Durant les infections, l'organisme stimulera la séquestration du fer pour empêcher le développement des bactéries pathogènes. Pour cela, la libération du fer par le foie et les macrophages ainsi que l'absorption intestinale sont diminuées [169]. Les régulateurs inflammatoires sont dominants par rapport aux régulateurs érythropoïétiques. Par exemple, dans l'anémie des maladies des infections chroniques, les cytokines inflammatoires réduisent l'érythropoïèse due à la séquestration du fer [170]. Par contre, cela activera le régulateur érythropoïétique qui va stimuler l'absorption du fer. Dans cette situation contradictoire, le régulateur présentant la signalisation la plus puissante va dominer [171].

Enfin, la présence des différents régulateurs de l'homéostasie de fer prédit l'existence d'un facteur permettant de coordonner correctement l'utilisation du fer, son stockage, son absorption, et son recyclage. Ainsi, la recherche des agents modulant l'homéostasie a considérablement évolué avec la découverte de HAMP qui est considéré comme le régulateur central de la l'homéostasie du fer.

5. Hepsidine

Hepsidine (HAMP) est un peptide hormonal appartenant à la famille des β -défensines, synthétisé dans le foie, distribué dans le plasma, et excrété dans l'urine [172]. HAMP tient son nom de son site majeur de synthèse « hep » pour hépatique et « idine » de son activité bactéricide. Cette hormone peptidique est en effet l'hormone du fer autant recherchée. Elle joue un rôle hyposidérémiant en réglant l'absorption intestinale du fer, son recyclage par les macrophages et sa mobilisation hépatique [173]. Outre son rôle dans la régulation du métabolisme du fer, HAMP joue un rôle important dans la défense innée de l'hôte contre les infections. Cependant, des études récentes ont clairement montré que la déficience en HAMP due à la dérégulation de sa synthèse semble être la cause ultime de la plupart des formes des maladies de surcharge en fer [174].

5.1 Découverte de l'hepsidine

En raison de la petite taille du gène codant HAMP et dû à la rareté des mutations aléatoires liées à ce gène, ce dernier n'a pas été trouvé par les méthodes génétiques. En fait, de multiples événements ont permis d'identifier HAMP, ainsi que sa fonction dans l'homéostasie du fer.

Lors de la purification du β -défensine-1 dans les urines des humains, Ganz et al. ont trouvé un nouveau peptide « defensin-like » qui contient 25 acides aminés et 4 ponts disulfures. En 1998, ce groupe a nommé le nouveau peptide identifié, HAMP [175]. En plus, cette équipe de recherche a montré que la concentration de ce peptide augmente significativement dans les urines des sujets septiques, reliant ainsi le peptide à l'inflammation et l'immunité innée. D'autre part, un autre groupe Krause et al. a isolé indépendamment le même peptide des sujets hémodialysés et l'a nommé LEAP-1 « liver-expressed antimicrobial peptide » [176].

La première connexion entre HAMP et le fer a été montrée dans les études effectuées par Pigeon et al. en 2001, ces derniers étaient à la recherche des gènes surexprimés dans le foie des souris surchargées en fer. Ils ont identifié que la transcription de HAMP est induite par le fer et également par l'inflammation [177].

5.2 Rôle antimicrobien de l'hepcidine

HAMP ressemble structurellement à la famille des défensines à cause des quatre ponts disulfures présents dans sa structure tertiaire. En plus, comme la plupart des peptides antimicrobiens naturels, HAMP présente deux propriétés fondamentales: la charge cationique et le caractère amphipathique (hydrophobe et hydrophile) qui facilitent sa capacité à perforer les membranes des pathogènes [178]. Comme certains peptides antimicrobiens, HAMP présente une double fonction : en plus de son rôle hyposidéremiant dans le métabolisme du fer, HAMP fait partie du système immunitaire inné, et constitue ainsi la première ligne de défense contre les infections fongiques et bactériennes. En fait, HAMP est active contre les bactéries Gram⁺ comme *Staphylococcus aureus*, les bactéries Gram⁻, par exemple *Escherichia coli* et les levures telle que *Candida albicans* [179].

Ainsi, HAMP agit de deux manières contre les bactéries et les levures :

1) En attaquant et perforant directement la membrane des pathogènes : *In vitro*, HAMP a seulement affiché des propriétés antimicrobiennes modestes à des concentrations très élevées tandis que l'importance de ses propriétés antimicrobiennes *in vivo* reste à déterminer [172].

2) En limitant la quantité du fer libre, ce qui inhibe la prolifération des micro-organismes, les patients atteints d'hémochromatose héréditaire, une maladie généralement résultant d'une carence relative en HAMP, ont signalé des infections causées par des micro-organismes inhabituels comme le Vibron, Yersinia et Listeria, mais cette susceptibilité pourrait être liée à la bactérie qui bénéficie de l'augmentation

des niveaux de fer plutôt que de la perte de tout effet antibactérien directe de HAMP [172].

Enfin, malgré sa connexion aux peptides antimicrobiens et à l'inflammation, la fonction de HAMP dans l'immunité innée reste encore à explorer.

5.3 Structure de l'hepcidine

Un seul gène code pour HAMP chez l'Homme, tandis qu'il y a deux gènes codant HAMP chez la souris, (*hepc1* et *hepc2*), qui présentent respectivement une homologie de 76% et 58% avec le gène *HAMP* humain [177, 180].

HAMP est situé sur le bras long du chromosome 19. Les 2.5 Kb du gène *Hamp* contiennent deux introns et trois exons qui se transcrivent en ARNm de 0.4 Kb. Cette ARNm est traduit en préprohepcidine de 84 acides aminés ayant dans sa partie N-terminale un site de clivage par la furine. Le clivage enzymatique permet d'obtenir un peptide de 25 acides aminés côté C-terminal, appelé hepcidine-25, qui constitue la seule forme mature et active [181, 182].

L'étude par spectrométrie de masse montre que le peptide natif de 25 acides aminés est riche en feuillets β et contient 8 cystéines formant 4 ponts disulfures. Au cours de l'évolution, ces cystéines ont été très conservées et sont retrouvées dans différentes espèces [179] (Figure 6).

Par ailleurs, l'étude par résonance magnétique nucléaire montre que HAMP 25 se présente en forme d'épingle à cheveux dont les deux feuillets β anti-parallèles sont stabilisés par 4 ponts disulfures. L'un des ponts disulfures est formé par deux cystéines adjacentes situées dans le coude β de l'épingle, ce qui tend à renforcer extrêmement cette structure et à conférer une stabilité pour HAMP en circulation [183] (Figure 7).

Pour se lier à son récepteur, HAMP nécessite l'implication de l'un de ces ponts disulfures. L'élimination individuelle des ponts disulfures ne réduit pas considérablement l'activité de HAMP. Cela indique que des multiples liaisons disulfures semblent être capables d'établir la liaison avec son récepteur. Le motif de liaison disulfure est strictement conservé à travers les espèces qui produisent HAMP comme les poissons, les amphibiens, les reptiles et les mammifères. Ainsi, HAMP d'une espèce peut se lier au récepteur d'une autre espèce, par exemple HAMP humain était capable d'interagir avec son récepteur chez la souris [184].

Outre les liaisons disulfures, les études sur la structure et la fonction de HAMP ont également montré que l'extrémité N-terminale de HAMP est importante pour son activité régulatrice du métabolisme du fer. L'étude de HAMP synthétique muté a permis d'établir que les 5 acides aminés N-terminaux sont essentiels pour l'activité de HAMP. HAMP, ayant sa partie N-terminale coupée, était inactif à la fois *in vitro* et *in vivo*, ce qui indique que cette région peut également contenir des résidus de contact nécessaires pour l'interaction avec son récepteur [184]. À noter qu'il existe d'autres formes de HAMP de 20 et 22 acides aminés retrouvées essentiellement au niveau urinaire, provenant probablement de la dégradation de HAMP 25 [175].

5.4 Sites d'expression de l'hepcidine

HAMP est principalement exprimé au niveau du foie, notamment dans les hépatocytes [185]. Également, l'expression de HAMP est détectée dans d'autres sites, mais à plus faibles concentrations, comme la rate, le cœur, l'estomac, le cerveau, les poumons et le pancréas. La détection de HAMP dans les reins a été rapportée, mais son rôle dans ce tissu reste inconnu. Par ailleurs, HAMP est exprimée dans les macrophages activés tels que les macrophages spléniques [186], les macrophages [187] et les macrophages pulmonaires [188]. Enfin, une étude récente montre que le tissu adipeux des patients obèses présente des taux élevés de HAMP par rapport au tissu adipeux d'individus non obèses, ce qui peut contribuer à l'hyposidérémie observée chez 70 % de ces patients [189].

hHEP	DTHFPICIFCCGCCHRSK - CGMCCKT
pHEP	DTHFPICIFCCGCCRKAI - CGMCCKT
rHEP	DTNFPICLFCCCKCKNSS - CGLCCIT
mHEP	DTNFPICIFCCKCCNNSQ - CGICCKT
bHEP	GCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF
fHEP	ISHISLCRWCCNCCCKANKGCGFCCKT
gHEP	GIK - - - CKFCCGCCTPGV - CGVCCR

Figure 6. Séquences de l'hepcidine chez les mammifères et les poissons.

Légende: Les espèces de mammifères sont : L'Homme (h), cochon (p), rat (r) et la souris (m). Les poissons sont : Bar (b), flet (f) et long-jawed mudsucker (g). Les cystéines conservées sont encadrées en rose. Importée de [190].

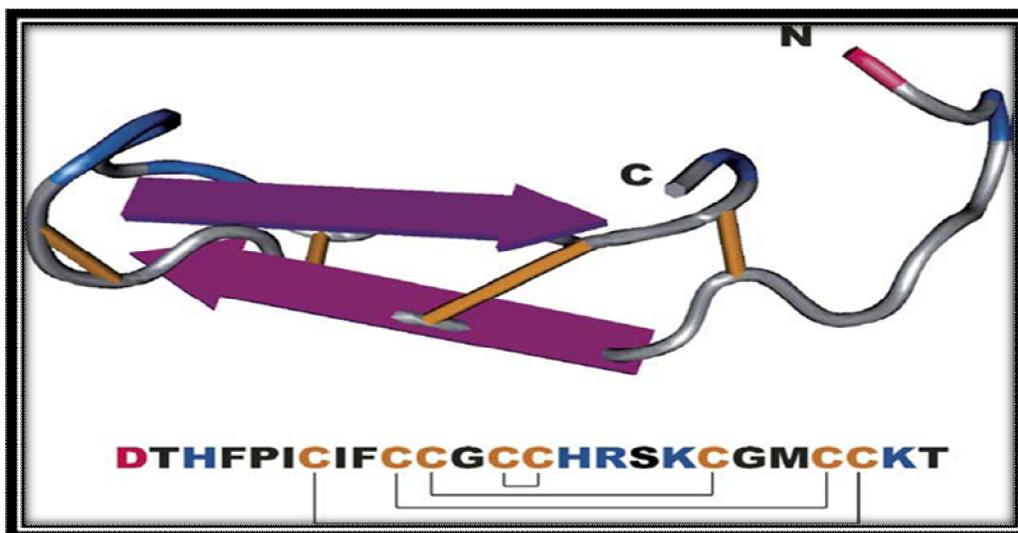


Figure 7. Structure de l'hepcidine humaine.

Légende: HAMP 25 se présente en forme d'épingle à cheveux dont les deux feuillettes β anti-parallèles contiennent 8 cystéines et sont stabilisés par 4 ponts disulfures. L'un des ponts disulfures est formé par deux cystéines adjacentes situées dans le coude β de l'épingle. Les ponts disulfures et les cystéines sont représentés en jaune. Importée de [191].

5.5 Rôle de l'hepcidine dans la régulation de l'homéostasie du fer

Le premier lien entre HAMP et l'homéostasie du fer a été établi en utilisant des modèles de souris présentant un déficit ou bien une production excessive de HAMP [176, 177]. En 2001, Nicolas et al., ont remarqué par hasard que la souris *USF2*^{-/-} « upstream transcription factor 2 », avait une surcharge sévère en fer [192]. Le gène *USF2* était connu pour être adjacent au gène codant HAMP. La souris *USF2*^{-/-} développait une surcharge massive en fer avec un dépôt dans le foie et le pancréas. En plus, les chercheurs ont montré que si le gène codant *USF2* est affecté, cela réprime sévèrement la transcription de HAMP [192]. Ces résultats étaient similaires à l'hémochromatose héréditaire de l'Homme, ce qui a suggéré que HAMP est un régulateur négatif de l'absorption intestinale du fer et de la libération du fer des macrophages. En accord avec cette idée, des souris ayant une diète faible en fer présentaient une expression fortement réduite en HAMP [193].

Une autre lignée des souris knock-out « *USF2* » exprimant des niveaux normaux d'ARNm de HAMP n'a pas montré d'altérations dans le métabolisme du fer, ce qui confirme que la surcharge en fer est due à une carence en HAMP [193]. Cependant, des souris surexprimant HAMP présentaient une carence en fer associée à une anémie ferriprive sévère. En outre, la plupart de ces souris sont mortes à la naissance, ce qui suggère que HAMP inhibe aussi le transfert du fer placentaire [193]. Également, HAMP semble réguler négativement l'exportation du fer par les hépatocytes, comme les souris surexprimant HAMP qui présentent une accumulation du fer hépatique [194].

Le rôle essentiel de HAMP dans l'homéostasie du fer a été confirmé chez les humains. Les mutations du gène *HAMP* ont été trouvées dans plusieurs patients avec hémochromatose juvénile qui est la forme la plus sévère de l'hémochromatose héréditaire [195]. À l'inverse, les patients ayant des tumeurs du foie et surexprimant HAMP souffraient d'une anémie sévère qui est seulement résolue après la résection tumorale ou bien la transplantation du foie [196].

De plus, l'injection des souris avec une dose unique de HAMP synthétique induit une hyposidérémie sévère qui dure environ 72 heures [197]. Enfin, toutes ces données impliquent que HAMP joue un rôle hyposidérémiant en causant une déficience dans l'absorption intestinale du fer alimentaire, une diminution de la libération du fer hépatique, ainsi qu'une réduction de la libération du fer par les macrophages.

5.6 Mécanisme d'action de l'hepcidine

5.6.1 Axe fonctionnel hepcidine-ferroportine

HAMP agit en se liant directement à la FPN, provoquant son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes [198, 199]. Par conséquent, la dégradation de la FPN bloque l'exportation du fer cellulaire vers la circulation [199, 200]. En considérant la distribution tissulaire du FPN, l'interaction HAMP-FPN joue un rôle important dans l'homéostasie du fer. Cette interaction contrôle l'absorption du fer dans le duodénum, ainsi que la libération du fer par les hépatocytes et les macrophages.

Lorsque les réserves en fer sont suffisantes, HAMP sera produite notamment par le foie et ciblera la FPN au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes et du foie, bloquant ainsi le passage du fer hépatique et du fer alimentaire dans la circulation. Après 1 à 2 jours ces entérocytes dégénéreront et seront dégagés dans l'intestin, supprimant ainsi l'excès du fer de l'organisme. En plus, HAMP induit la dégradation de la FPN dans les macrophages, entraînant la séquestration du fer. À noter que dans les états inflammatoires, le niveau de HAMP est élevé et est donc responsable de la rétention du fer par les macrophages malgré la diminution du taux du fer sérique [178].

Lorsque les réserves en fer sont faibles, la production de HAMP est réduite et la FPN, exprimée par les membranes basolatérales des entérocytes, les hépatocytes et les macrophages, transportera le fer dans la circulation où il se liera à la Tf.

En plus de la régulation du FPN par HAMP, l'homéostasie du fer peut également réguler l'expression du FPN. En effet, le fer et l'inflammation sont capables de réprimer l'expression du FPN indépendamment de HAMP [186, 201].

D'autre part, HAMP peut avoir un effet indirect sur le système IRE/IRP en bloquant le flux du fer cellulaire, ce qui entraîne une augmentation du fer intracellulaire. Cela affectera l'expression du DMT1, du récepteur de la Tf et du FPN qui contiennent des IREs. Il y a deux principaux isoformes de FPN: Ferroportine 1A (FPN1A), avec un motif IRE dans la région 5'UTR et Ferroportine 1B (FPN1B) manquant de ce motif. FPN1B est exprimée dans les entérocytes duodénaux où elle permet l'exportation du fer pour le reste de l'organisme, même si les entérocytes présentent une carence en fer [202]. Cependant, l'interaction entre HAMP-FPN et le système IRE/IRP n'est pas encore bien élucidé [178].

Enfin, l'expression et l'activité d'autres molécules de transport du fer, tels que DMT1, sont également affectées par HAMP. Des études ont montré qu'une augmentation aiguë de HAMP réduit l'absorption intestinale du fer, et cela par l'ubiquitination et la dégradation de DMT1 par le protéasome [203].

5.6.2 Interaction moléculaire entre l'hepcidine et la ferroportine

Les signaux moléculaires impliqués dans l'internalisation de la FPN et sa dégradation ont été récemment identifiés. Les études montrent que HAMP entraîne une phosphorylation d'une tyrosine située dans la région cytosolique du FPN [204]. Après cette phosphorylation, le complexe HAMP-FPN est internalisé par endocytose clathrine-dépendante [205]. Une fois intériorisé, la tyrosine sera déphosphorilée et la FPN sera ubiquitinée et dégradée dans les lysosomes [199].

5.7 Régulation de l'expression hépatique de l'hepcidine

5.7.1 Régulation de HAMP par le signal des réserves en fer

Les mécanismes exacts par lesquels les réserves en fer influencent l'expression hépatique de HAMP ne sont pas encore bien connus. Il est considéré que la saturation de la Tf sérique est le signal-clef qui reflète le taux des réserves hépatiques en fer [206].

A) Régulation par le fer extracellulaire :

1 - Régulation par la voie HFE/TfR2 : La synthèse hépatique de HAMP semble être réglementée en réponse à la saturation du Tf et cela par une cascade de signaux déclenchés par la forme libre de la protéine HFE « Human hemochromatosis protein » [207]. Cette protéine est codée par le gène *HFE* dont les mutations sont dues aux maladies de surcharge en fer, notamment l'hémochromatose héréditaire (HH). Appartenant à la famille des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI), la molécule HFE est présente en surface de nombreux types cellulaires et en particulier au niveau des hépatocytes. La protéine HFE s'associe par un pont disulfure à la β 2-microglobuline, interaction indispensable à sa migration à la surface cellulaire où elle rentre en compétition avec l'holotransferrine pour le site de liaison au TfR1 [208]. Il a été proposé que HFE navigue entre TfR1 et TfR2 en fonction des concentrations de holo-Tf circulante [209].

Dans le cas d'une carence en fer, le niveau d'holotransferrine est diminué, par conséquent TfR1 n'est plus saturé et va se lier par défaut à la protéine HFE. De ce fait, la forme libre de la protéine HFE diminue de la surface cellulaire, ainsi que le TfR2 se trouvant également insaturé et aucun signal n'est transmis pour la synthèse de HAMP. Enfin, la production de HAMP serait alors corrélée au nombre de molécules HFE libres à la surface cellulaire [210, 211].

Dans le cas d'une surcharge en fer, le niveau d'holotransferrine augmente et par conséquent, TfR1 se trouve saturé, et ne se lie pas à HFE. De ce fait, la forme libre de la protéine HFE se lie au TfR2 ce qui va entraîner l'expression de HAMP. Par contre, les signaux activés par cette interaction ne sont pas encore clairs, mais ils semblent

impliquer la voie des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) et ou des MAP kinases « Mitogen-activated protein (MAP) kinases » tel que ERK1/2 [212].

2 - Régulation par la voie des BMPs : Cette voie a émergé comme le régulateur critique de l'expression de HAMP. Elle contrôle une variété de processus biologiques au cours du développement embryonnaire et postnatal. En général, la signalisation BMP est modulée par des corécepteurs, comme par exemple hémoujuvéline (HJV) qui est spécifique pour la régulation du fer. L'HJV est une protéine codée par le gène *HJV* dont les mutations sont liées à l'hémochromatose juvénile et jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'expression hépatique de HAMP [213]. Exprimée sur la membrane des hépatocytes, l'HJVm (Hémoujuvéline membranaire), joue le rôle de corécepteur des BMPRs (Bone Morphogenetic Protein Receptors) et participe à la transmission du signal né de l'interaction entre les BMPs et leurs récepteurs [214].

Des études ont montré que la surcharge en fer stimule l'expression des gènes codant les BMPs. Ainsi, la signalisation par BMPRs et HJVm induit la phosphorylation du complexe SMAD1/SMAD5/SMAD8 cytoplasmiques qui s'associe au Smad4. Ensuite, ce complexe va être transloqué dans le noyau pour agir comme facteur de transcription au niveau des « BMP-responsive elements » (BMP-RE) localisés dans le promoteur du gène HAMP [214], activant ainsi l'expression hépatique de HAMP. Ce complexe active aussi l'expression de divers gènes comme Id1 (inhibitor of DNA binding 1), Smad7, Atoh8 (atonal homolog 8) qui de même induisent l'expression de HAMP. Un défaut d'expression de Smad4 au niveau du foie des souris donne lieu à une surcharge sévère en fer due à la diminution de l'expression de HAMP (11). Par contre, dans le cas de carence en fer, l'HJVm sera clivée par TMPRSS6 (transmembrane protease serine 6) en une forme soluble (HJVs) capable de réprimer l'expression de HAMP [215].

B) Régulation par les réserves de fer intracellulaire :

L'expression de HAMP peut être également régulée par les réserves de fer intracellulaire. Bien que les molécules de détection du fer extracellulaire et intracellulaire semblent être différentes, il semble que les deux utilisent la voie de signalisation des BMPs pour réguler l'expression de HAMP. HFE et Tfr2 ne sont pas nécessaires pour cette régulation car HFE et/ou TFR2 mutées n'empêchent pas la diminution de l'expression de HAMP après déplétion du fer intracellulaire. Bien que le mécanisme de détection de fer intracellulaire ne soit pas très clair, de nouvelles études suggèrent que cette détection peut être due à l'expression de BMP6 [216]. L'expression de BMP6 est régulée par le fer intracellulaire et la perturbation de son expression conduit chez la souris à une faible expression de HAMP accompagnée d'une sévère surcharge en fer, sans autres anomalies significatives. BMP6 interagit directement et spécifiquement avec le corécepteur HJV. Bien que des études aient mis en évidence le rôle spécifique de BMP6 dans la régulation de HAMP, il reste à déterminer comment la production de BMP6 elle-même est régulée par le fer.

5.7.2 Régulation de l'hepcidine par l'érythropoïèse et l'hypoxie

Outre les réserves en fer, l'érythropoïèse et l'hypoxie affectent également le métabolisme du fer. Dans l'anémie, la concentration de l'hémoglobine ainsi que le transport d'oxygène aux tissus sont réduits, ce qui entraîne une hypoxie et stimule en même temps l'érythropoïèse [217]. Ces stimuli diminuent la synthèse de HAMP pour éliminer l'effet inhibiteur sur l'absorption du fer et la libération du fer par les macrophages afin qu'il y ait plus de fer disponible pour l'érythropoïèse [178].

A) Régulation de HAMP par l'érythropoïèse : L'expression de HAMP est diminuée dans les anémies ferriprives, anémies hémolytiques et les anémies associées avec une érythropoïèse inefficace. Bien que les voies impliquées dans cette régulation ne soient pas très bien étudiées, elles peuvent comporter des protéines solubles produites soit par les érythroblastes de la moelle osseuse, soit par la quantité du fer circulant ou bien l'hypoxie.

Dans des modèles de souris présentant une anémie causée par des saignements ou par une hémolyse, deux études ont montré que la suppression de HAMP était dépendante d'une activité intacte de l'érythropoïèse. Lorsque cette dernière a été inhibée par irradiation ou bien en utilisant des agents cytotoxiques, l'expression de HAMP n'a pas diminué malgré la présence d'une anémie sévère [218].

Deux protéines produites par les précurseurs érythroïdes, le facteur de différenciation de croissance 15 (GDF15) et la protéine de la gastrulation (TWSG1), ont été proposées comme médiateurs pour la suppression de HAMP durant les anémies associées à une érythropoïèse inefficace [219] :

- GDF15 : Les études chez des patients thalassémiques ont montré une concentration élevée de GDF15 « Growth differentiation factor 15 » sérique, qui est un membre de la famille TGF- β « Transforming growth factor TGF β » capable de réprimer directement l'expression de HAMP [220].

- TWSG1 : C'est une protéine produite pendant la maturation des érythroblastes. TWSG1 supprime HAMP in vitro et agit en interférant avec la régulation de HAMP en bloquant la voie des BMPs. Chez l'Homme la régulation de TWSG1 n'est pas bien étudiée mais son expression est augmentée chez les souris thalassémiques [221].

B) Régulation de HAMP par l'hypoxie : L'expression de HAMP est diminuée par l'hypoxie mais la pertinence physiologique de cette régulation n'est pas claire [217, 222]. Cette diminution d'expression peut être attribuée à l'effet de l'hypoxie sur l'expression de l'érythropoïétine (EPO) et sur l'activité érythropoïétique via une interaction directe avec les récepteurs d'EPO au niveau des hépatocytes [223]. Les études ont montré que l'EPO peut bloquer directement l'expression du gène HAMP ou bien indirectement en inhibant les voies SMAD et Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [171, 224].

La diminution de l'expression de HAMP en réponse à l'hypoxie peut être également associée à la stabilisation hépatique du facteur inductible par l'hypoxie (HIF1) [225] et les effets en aval sur la voie de signalisation BMP/SMAD [226, 227].

Une étude a montré que HIF-1 peut se lier directement au promoteur de HAMP et empêcher sa transcription [225], mais une autre étude a montré que la surexpression ou l'inactivation de HIF-1 ne modifie pas l'expression de HAMP dans les cellules HepG2. D'autre part, l'augmentation de l'activité de HIF est associée à un clivage de l'HJV membranaire qui à son tour réprime l'expression de HAMP [227].

Enfin, les souris dépourvues de HIF-2a intestinales expriment des taux plus faibles de FPN1 et du DMT1 et par conséquent ne parviennent pas à induire l'absorption du fer même lorsque l'expression de HAMP est réduite [228]. Ces résultats suggèrent que dans les conditions d'hypoxie et/ou de carence en fer, l'expression de HIF-2a favorise l'absorption intestinale du fer par augmentation de l'activité de DMT1 et de FPN1.

5.7.3 Régulation de l'hepcidine par le signal inflammatoire

La synthèse de hepcidine augmente rapidement durant l'infection et l'inflammation. Le répertoire des cytokines inflammatoires capables de moduler l'expression de HAMP a été bien déterminée.

L'interleukine 6 (IL-6) est la cytokine inflammatoire majeure qui induit l'augmentation de HAMP dans le sang [221]. Chez des sujets volontaires infusés avec l'IL-6, l'excrétion urinaire de HAMP a été augmentée significativement dans les deux heures suivant la perfusion [222].

D'autres cytokines peuvent également réguler la production de HAMP, puisque les souris IL-6^{-/-} ayant une inflammation chronique possèdent une expression élevée de HAMP par rapport aux souris de type sauvage. Chez la souris, l'interleukine 1 beta (IL-1 β) a été montré capable de stimuler l'expression de HAMP hépatocytaire indépendamment de l'IL-6. Par contre, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) ne semble avoir aucun effet ou même il réprime HAMP [222, 229, 230]. Enfin, d'autres cytokines inflammatoires, ainsi que les effets directs des molécules microbiennes, peuvent également contribuer à l'augmentation de HAMP.

Régulation de l'hepcidine par la voie (JAK)/STAT-3: Durant l'inflammation, les macrophages constituent des relais cellulaires pour l'activation de la synthèse de HAMP hépatique. Une fois activés, les macrophages secrètent l'IL-6 qui stimule l'expression du gène *HAMP* au niveau des hépatocytes. Effectivement, l'IL-6 induit l'expression de HAMP par l'intermédiaire de la voie Janus kinase (JAK)/STAT-3 et le site de liaison STAT3 a été identifié au niveau du promoteur de HAMP à proximité du promoteur BMP-RE [231]. Des études ont montré qu'il existe une certaine interférence entre les voies BMP/SMAD et JAK/STAT3 pour contrôler les niveaux de HAMP hépatique. En fait, la mutation touchant BMP-RE diminue l'effet d'IL-6, tandis que la réponse BMP est accrue lorsque le site de liaison STAT3 est supprimé [232].

Par conséquent, l'augmentation de HAMP durant l'inflammation entraîne une diminution de l'absorption intestinale du fer et une rétention du fer par les macrophages [222]. Cela entraîne le développement d'hyposidérémie qui se développe au cours des infections ou des maladies inflammatoires. Cette réponse pathologique est considérée comme étant une réaction de défense de l'organisme qui vise à limiter la quantité du fer libre pour inhiber la prolifération des micro-organismes [233]. D'autre part, la séquestration du fer en raison de l'inflammation peut limiter la disponibilité de ce métal pour l'érythropoïèse et elle contribue ainsi au développement de l'anémie de l'inflammation, également connu sous le nom de l'anémie des maladies chroniques.

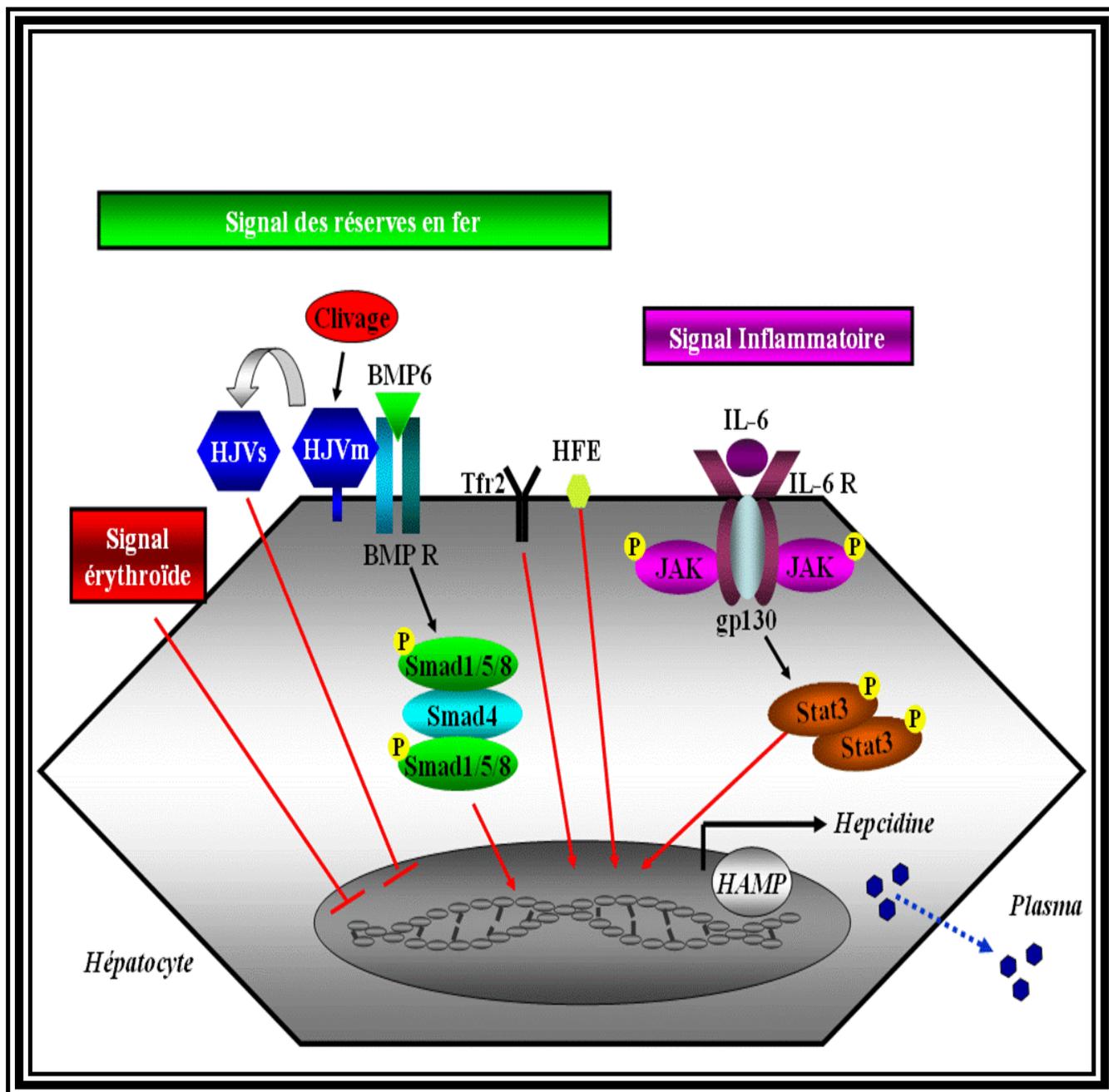


Figure 8. Régulation de l'expression hépatique de l'hepcidine.

Légende: L'expression de l'hepcidine (*HAMP*) répond à plusieurs facteurs physiologiques connus, comme le niveau des réserves hépatiques en fer, la demande en fer nécessaire pour l'érythropoïèse, ainsi que l'hypoxie et les situations inflammatoires.

5.8 Pathologies liées à l'hepcidine

Une production inappropriée de HAMP contribue à la pathogenèse de divers troubles liés au métabolisme du fer. Une carence relative en hepcidine est associée au développement d'une surcharge en fer, par contre un excès relatif de HAMP entraîne une restriction de fer et le développement d'anémie.

5.8.1 Hémochromatose héréditaire

Une carence en hepcidine entraîne le développement d'une surcharge systémique en fer due à l'absorption excessive de ce métal. En absence de HAMP, l'expression de la FPN1 au niveau de la surface basolatérale des entérocytes augmente, ce qui conduit à une absorption élevée du fer alimentaire. En cas de carence en hepcidine, les macrophages présentent également une augmentation de FPN1 sur leurs membranes cellulaires qui résulte en une exportation élevée du fer vers le sang. Le fer plasmatique en excès s'accumule dans les organes dans lesquels l'absorption dépasse le taux d'exportation. Le foie est le plus souvent affecté par la surcharge en fer due à l'absorption accrue de NTBI par les hépatocytes (Figure 9).

Les mécanismes moléculaires qui causent une déficience en hepcidine sont divers. Dans l'hémochromatose héréditaire (HH), une maladie caractérisée par une accumulation progressive du fer dans divers organes, les causes de la carence en hepcidine sont dues aux mutations soit du gène *HAMP*, soit l'un des gènes *HFE*, *HJV* et *TfR2* codant les molécules impliquées dans la détection et la transduction des signaux de régulation du fer. Une autre forme très rare d'hémochromatose n'est pas liée à une carence en hepcidine mais à une résistance de la FPN contre ce peptide antimicrobien. En outre, la forme la plus grave de l'hémochromatose c'est l'hémochromatose juvénile qui se développe avec des mutations dans le gène *HAMP* ou *HJV* où les niveaux de HAMP sont totalement ou presque absents.

Toutes les formes d'hémochromatoses ont en commun un taux de HAMP anormalement réduit et le degré de la déficience en hepcidine est en corrélation avec la gravité de la surcharge en fer. Effectivement, l'accumulation du fer peut atteindre dix fois la quantité normale d'un individu sain. Ainsi, les patients développent une

symptomatologie très variée, comprenant la cirrhose, l'hépatocarcinome, le diabète, la cardiomyopathie, l'arthrite et autres complications [234].

La phlébotomie est actuellement le principal traitement pour les patients atteints d'hémochromatose héréditaire. Par contre, à son tour, la phlébotomie semble entraîner une nouvelle diminution des taux d'hepcidine qui serait prévu pour améliorer l'absorption du fer alimentaire ce qui nécessite des phlébotomies répétitives.

5.8.2 Anémie des maladies inflammatoires chroniques (ACD)

Les syndromes inflammatoire chez l'Homme, ainsi que les modèles de souris présentant un taux élevé en hepcidine montrent que cela est suffisant pour développer une hyposidérémie et une anémie [235] (Figure 10).

Des études ont montré que l'induction de HAMP hépatique par LPS dépend de la voie de signalisation médiée par le récepteur TLR4 [236]. De plus, il est connu que durant l'infection, l'activation des macrophages à travers les TLRs stimulera la transcription du facteur NF- κ B qui sera responsable de la transcription des gènes codant une cascade de cytokines inflammatoires, telles que IL-1 et IL-6 qui stimuleront l'expression de HAMP hépatique [213, 237]. Ce dernier, en plus de son activité antimicrobienne, entraînera l'internalisation et la dégradation de la FPN1, causant ainsi la séquestration du fer intracellulaire et une diminution des taux de fer sérique, d'où le développement d'hyposidérémie [199].

La réponse hyposidérémique inflammatoire est destinée à limiter la disponibilité du métal aux micro-organismes envahisseurs, contribuant ainsi à la défense immunitaire de l'organisme. L'inflammation est caractérisée par une diminution du fer sérique, une augmentation de la ferritine et une séquestration du fer par les macrophages [222].

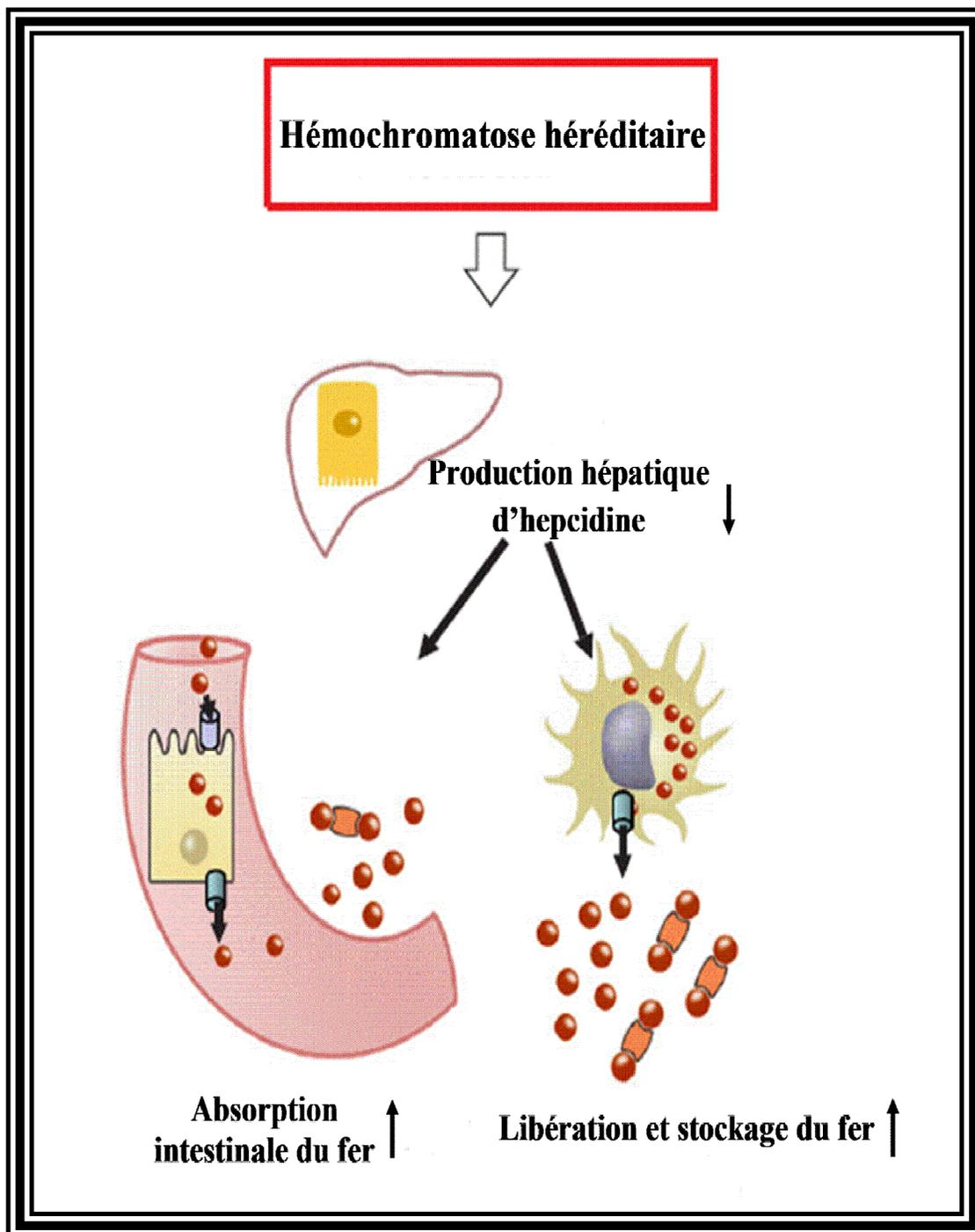


Figure 9. Physiopathologie de l'hémochromatose

Légende: L'Hémochromatose est caractérisée par une faible production de l'hepcidine, ce qui augmente l'absorption intestinale du fer ainsi que sa libération par les macrophages. Cela conduit inévitablement au stockage progressif du fer dans les tissus. Importée de [238].

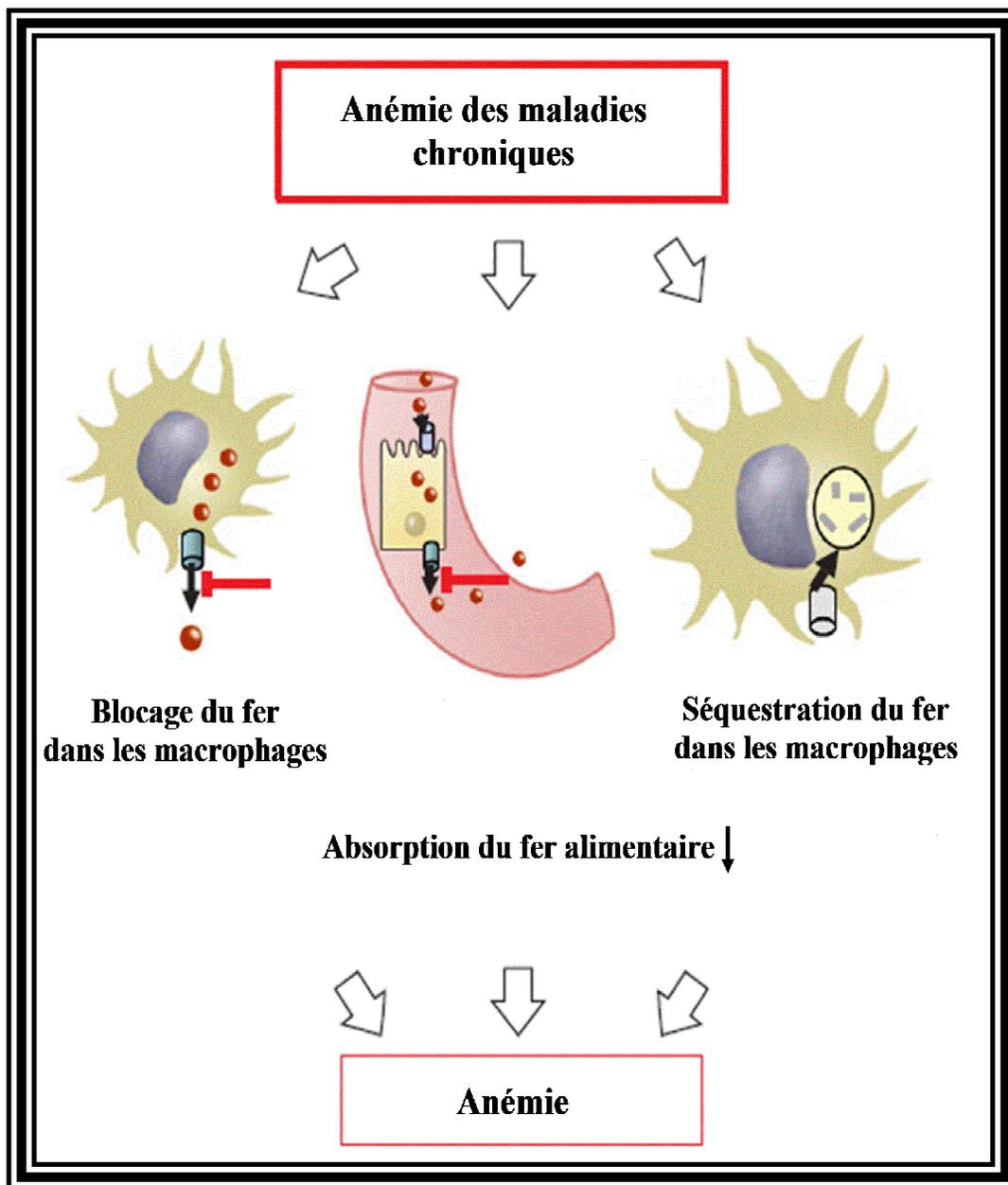


Figure 10. Physiopathologie de l'anémie des maladies chroniques

Légende: Dans les maladies inflammatoires chroniques, la production de l'hépcidine est élevée, cela inhibe la libération du fer des macrophages et diminue l'absorption intestinale de ce métal, ce qui entraîne le développement d'anémie. Importée de [238].

6. Les récepteurs Toll-like

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre l'invasion des micro-organismes. Les microbes sont complexes et présentent une grande variété de structures qui seront détectées par le système immunitaire. En utilisant les TLRs, les cellules comme les macrophages, les éosinophiles, les cellules dendritiques et les neutrophiles jouent un rôle crucial dans la défense de l'hôte, en reconnaissant des motifs moléculaires associés à des pathogènes, nommés (PAMPs) « Pathogen Associated Molecular Patterns » [239].

Après activation, les TLRs engagent plusieurs voies de signalisations adressées à tuer les agents pathogènes. Cela stimulera une réponse immunitaire innée contre le microbe en provoquant une réponse inflammatoire locale qui puisse finalement être en relation avec la génération d'une réponse immunitaire adaptative plus spécifique, médiée par les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT).

6.1 Structure, localisation et ligands des TLRs

6.1.1 Structure des TLRs

Les TLRs ont été les premiers récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) à être identifiés. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I ayant une structure tertiaire divisée en trois domaines (Figure 11):

- Un domaine extracellulaire responsable de la reconnaissance des PAMPs. Ce domaine est constitué d'un nombre variable de répétitions riches en leucines « Leucine Rich Repeats » (LRR) dont chacun est formé de 20 à 30 acides aminés contenant le motif conservé « xLxxLxLxx » [240].

- Un domaine transmembranaire.

- Un domaine C terminal cytoplasmique comprenant une séquence « Toll/IL-1 Receptor » (TIR) qui ressemble à celle du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1), responsable de l'interaction et le recrutement de diverses molécules adaptatrices nécessaires pour la transduction du signal [241].

À noter que les TLRs diffèrent essentiellement par leur domaine LRR. Ainsi, TLR2 et TLR4, qui sont deux récepteurs majeurs dans la défense antibactérienne, ne possèdent que 24% d'homologie au niveau de leurs domaines extracellulaires [242]

6.1.2 Localisation des TLRs

Actuellement, 10 et 12 TLRs fonctionnels ont été identifiés respectivement chez l'Homme et la souris [243]. Ces TLRs sont exprimés dans divers types de cellules du système immunitaire, tels que les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les LB et les LT, les neutrophiles, les cellules NK « Natural Killer », les monocytes et les éosinophiles, ainsi que sur des cellules non immunes, telles que les fibroblastes, les synoviocytes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules épithéliales [244]. Les TLRs sont exprimés au niveau de différents compartiments cellulaires. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont exprimés à la surface cellulaire. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR13 sont exprimés dans les vésicules intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique (RE), les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes. Enfin, TLR11 est exprimé à la fois au niveau membranaire et intracellulaire [245],[246]. (Figure 11).

Au niveau cellulaire, la mobilisation des TLRs est contrôlée par des diverses protéines au sein du RE, y compris UNC93B1, PRAT4A et gp96 :

- UNC93B1 : Interagit avec TLR3, TLR7 et TLR9 et régule leur transport à partir du RE vers les endosomes [247].
- PRAT4A : Régule le transport de TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 et TLR9 du RE vers la membrane plasmique et les endosomes [248].
- gp96 : Membre des protéines de choc thermique au niveau du RE qui fonctionne comme protéine chaperon pour la plupart des TLRs [248].

6.1.3 Ligands des TLRs

L'activation des TLRs est initiée par leur liaison aux PAMPs. Ces derniers sont caractérisés par trois propriétés [249]:

- 1) Leurs structures sont rarement présentes chez les cellules de l'hôte.
- 2) Ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes, ce qui permet de reconnaître une énorme diversité des microbes par un nombre restreint de récepteurs.
- 3) Ils sont essentiels à la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance.

Les TLRs reconnaissent différents types de PAMPs dérivés des bactéries et des champignons pathogènes, des virus et des parasites protozoaires.

a) Les PAMPs bactériens : Les TLRs peuvent détecter différents composants de la paroi cellulaire bactérienne, comme le LPS des bactéries Gram⁻ reconnues par TLR4, les peptidoglycanes des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ reconnus par TLR2, les lipoarabinomannanes (LAM) des mycobactéries reconnues par TLR2, les lipopeptides diacyl ou triacyl des bactéries, des mycobactéries et des mycoplasmes reconnus par les hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6, les flagellines des bactéries flagellés reconnues par TLR5, et l'ADN génomique bactérien riche en répétition cytosine-guanine (CpG) non méthylées reconnus par TLR9 [250, 251].

b) Les PAMPs fongiques : Des études ont montré que les souris déficientes en « myeloid differentiation primary response gene 88 » (MyD88) sont sensibles aux infections fongiques, telles que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Cryptococcus neoformans*. D'autres analyses ont révélé que plusieurs composantes fongiques sont reconnues par les TLRs, comme les phospholipomannanes et les β -glucanes reconnues par TLR2 et les glucuronoxylomannanes reconnues par TLR4 [250, 252, 253].

c) Les PAMPs viraux : Les virus sont constitués de protéines d'enveloppe et d'acides nucléiques simples brins (sb) et doubles brins (db), qui sont reconnus par des différents TLRs, notamment les TLRs endosomiaux. Les protéines d'enveloppe des virus, tels que le virus respiratoire syncytial (VRS) et le virus de la tumeur mammaire des souris (MMTV), sont reconnues par TLR4 [254]. De plus, les acides nucléiques viraux sont des PAMPs aussi importants : le génome des virus à ADN, comme l'herpès simplex virus (HSV) et le cytomégalovirus murin (MCMV) contient l'ADN CpG non-méthylé qui est reconnu par TLR9. Le génome des virus à ARNsb, qui est riche en uridine ou uridine/guanosine, est reconnu par TLR7 et TLR8. Pendant leur réplication, les virus à ADNdb et les virus à ARNsb produisent des ARNdb qui seront reconnus par TLR3 [250, 252].

d) Les PAMPs des protozoaires : Plusieurs infections par les protozoaires peuvent toucher l'Homme, telles que la narcolepsie, la maladie de Chagas, la toxoplasmose, le paludisme et la leishmaniose. Ces maladies sont causées respectivement par *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* et *Leishmania*. Les phospholipides glyco-inositol (GPI) et les glycosylphosphatidylinositol (GPI) des *Trypanosomes*, *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* sont reconnus par TLR2 et TLR4. D'autre part, les alkyl-acylglycerols insaturés des *Trypanosomes* et les lipophosphoglycans (GPL) insaturés des *Leishmanias* sont reconnus par TLR2. Enfin, l'ADN génomique des espèces des *Trypanosomes* est reconnu par TLR9 [240, 250, 251].

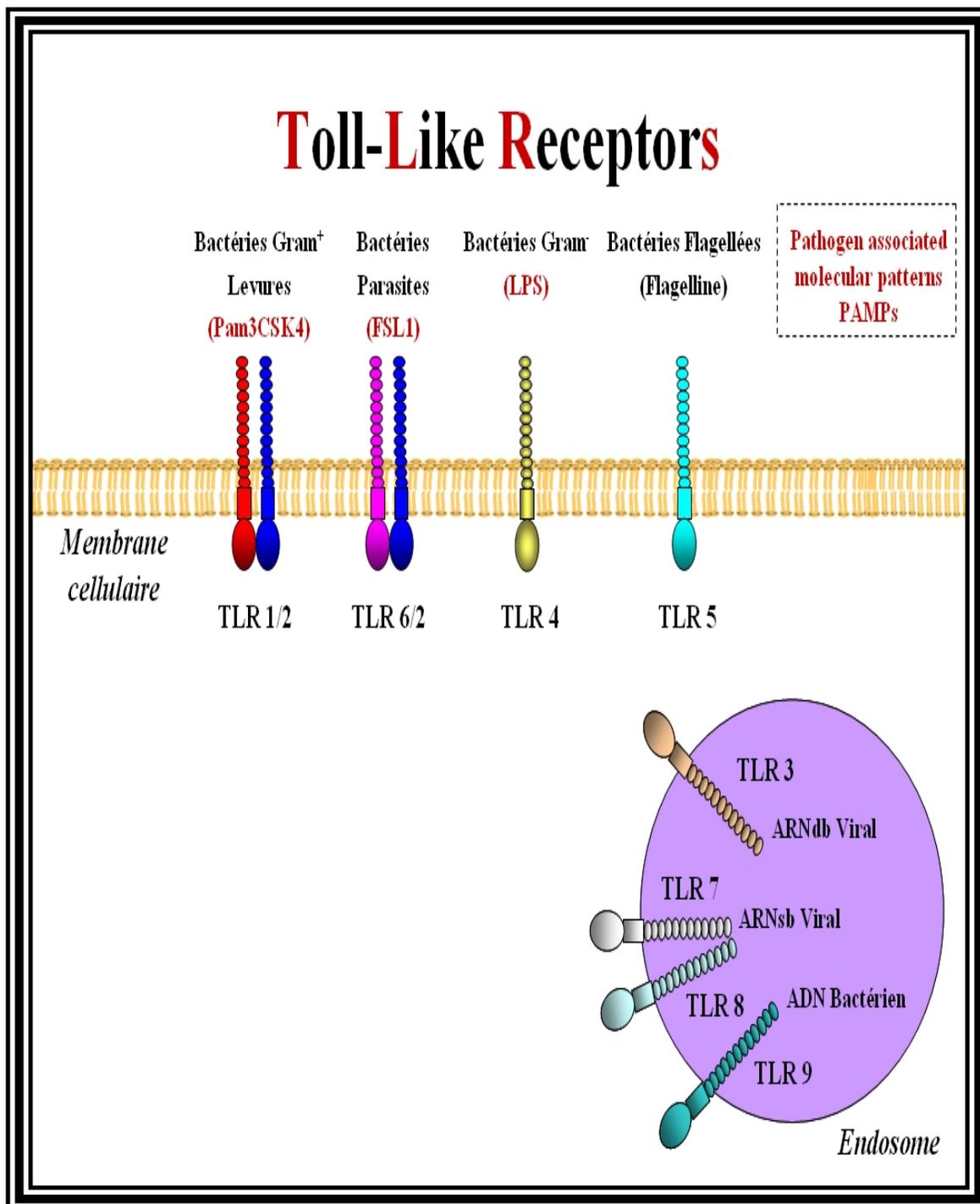


Figure 11. Les récepteurs Toll-like et leurs ligands.

Légende: Les TLRs sont exprimés au niveau de différents compartiments cellulaires. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11 sont exprimés sur la surface cellulaire. TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés sur les endosomes.

6.2 Modulation de la réponse immunitaire par le TLRs

Bien que l'immunité innée soit efficace pour prévenir les infections et réduire la charge pathogène, l'élimination complète de l'invasion microbienne et le contrôle de l'infection sont assurés par l'immunité adaptative. La détection des PAMPs par les TLRs déclenche non seulement l'activation de l'immunité innée, mais également l'immunité adaptative (Figure 12).

a) Stimulation de l'immunité innée : Le complexe PAMPs-TLRs entraîne l'activation et le recrutement de diverses cellules impliquées dans la réponse innée, telles que les macrophages, les cellules NK, les éosinophiles et les CD [255]. L'activation des cellules NK potentialise leurs activités cytotoxiques en induisant la production des perforines, des peptides antimicrobiens et des cytokines immunostimulatrices, telles que IL-6, IL-8 et IFN γ [256]. D'autre part, les polynucléaires neutrophiles sont également activés et libèrent leur contenu en granules [257]. Aussi, les polynucléaires éosinophiles produisent du TNF α et de la protéine ECP (eosinophil cationic protein) qui est un médiateur cytotoxique puissant [258]. Par ailleurs, les macrophages réagissent par la sécrétion des cytokines et l'induction des ROI (reactive oxygen intermediates) [259]. Finalement, les CD immatures localisées en périphérie ont une forte capacité de phagocytose, ce qui facilite la capture de l'antigène et son acidification [260]. En outre, la maturation des CD par une variété de composants microbiens est induite par des signaux transmis par les TLRs et se manifeste par l'expression des molécules de costimulation, telles que CD80/CD86 et initie la production de plusieurs médiateurs, tels que TNF- α , les interférons (IFNs), les interleukines (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12) et différentes chémokines [244]. Une fois arrivées à échéance, les CD perdent leur capacité d'endocytose et migrent dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes, dérivés des peptides microbiens, complexés au CMH du classe II aux cellules T naïves, initiant ainsi une réponse immunitaire adaptative spécifique [261]. Ainsi, les CD qui sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) capables d'activer les LT naïfs se situent à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [262].

b) Stimulation de l'immunité adaptative : L'activation des LT peut être directe par stimulation des TLRs exprimés à leur surface, tels que TLR2 et TLR4, ou bien indirecte par l'activation des TLRs des CPA [257]. Ces derniers, surtout les cellules dendritiques, vont orienter la différenciation des LT helper (TH) en TH1 ou TH2 et initier la différenciation des lymphocytes cytotoxiques TCD8. En effet, les CD vont sécréter l'IL-12 et de l'INF, ce qui différencie les TH en TH1, tandis que la différenciation en TH2 est médiée par l'IL-10 [263].

En outre, l'activation des LB par les TLRs augmente leur sécrétion de cytokines. Par exemple, l'activation du TLR2 ou du TLR4, ou bien du TLR9, entraîne la sécrétion d'IL-10 et d'IL-6, tandis que l'activation simultanée des trois TLRs entraîne la sécrétion d'IL-10, l'IL-6 et d'INF γ [264]. En plus, l'activation des LB par les TLRs entraîne une augmentation de la production des immunoglobulines et notamment les IgM [265, 266].

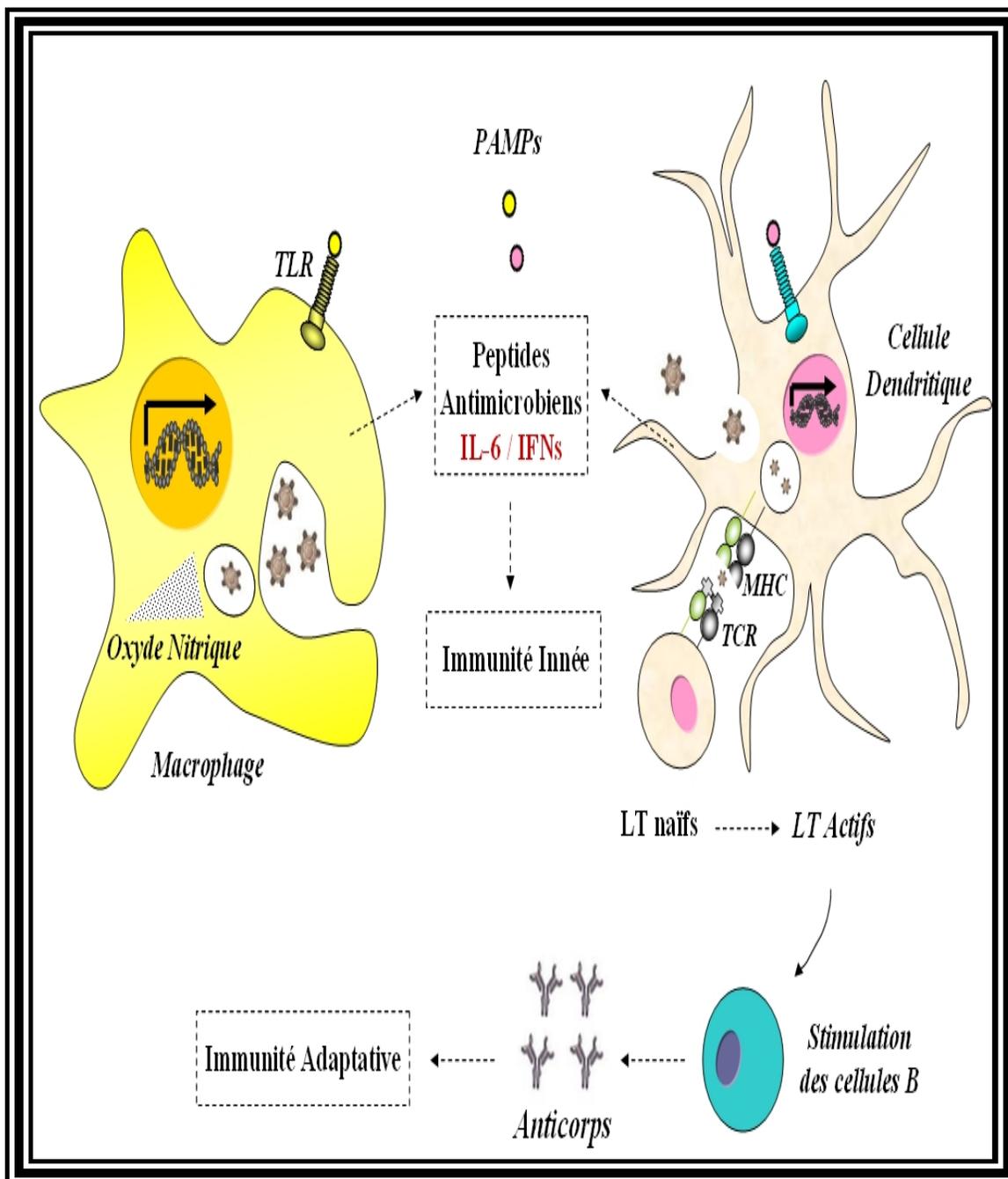


Figure 12. Modulation de la réponse immunitaire par les récepteurs Toll-Like.

Légende: La reconnaissance des agents infectieux par les macrophages et les cellules dendritiques (DC) induit la production des cytokines (IL-6, IFNs) qui déclenchent l'inflammation. Les molécules de costimulation et d'autres cytokines sont également induites, ce qui permettra l'activation des Lymphocyte T et B, et la réponse adaptative.

6.3 Voies de signalisation des TLRs

Après activation par les PAMPs, les TLRs stimulent des voies de signalisations spécifiques aux microbes qui induisent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire. La spécificité de cette réponse dépend du recrutement d'une ou de plusieurs protéines adaptatrices comme MyD88, « TIR domain containing adaptor protein » (TIRAP), « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β » (TRIF) et « Toll-receptor-associated molecule » (TRAM) [267]. L'activation des TLRs facilite leur dimérisation pour former des homodimères. D'autre part, TLR2 peut aussi former des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6 [268]. Ainsi, la dimérisation des TLRs déclenche l'activation des voies de signalisations à partir de leur domaine cytoplasmique [269]. Ce dernier joue un rôle essentiel dans cette activation, puisqu'une mutation dans son gène bloque l'activation du TLR4 par du LPS [270].

Actuellement, deux voies de transduction du signal sont activées par les TLRs : La voie MyD88 dépendante et la voie MyD88 indépendante [271] (Figure 13).

a) Voie de signalisation dépendante de la protéine MyD88 : Tous les TLRs, à l'exception de TLR3, interagissent par l'intermédiaire du domaine TIR avec la protéine adaptatrice MyD88 [272]. Seul TLR4 utilise la protéine TIRAP comme un adaptateur supplémentaire pour recruter MyD88. Cette dernière contient un « Death domain » (DD) aminoterminal par l'intermédiaire duquel elle interagit avec les sérine-thréonine kinases de la famille des « IL-1 receptor-associated kinase » (IRAK). Ainsi, la protéine MyD88 fonctionne comme un adaptateur entre le domaine TIR des TLRs et les kinases impliquées dans la signalisation [273]. Des études sur des souris MyD88^{-/-} ont confirmé que cette protéine joue un rôle essentiel dans l'activation des MAP kinases et des facteurs de transcription comme NF- κ B (Nuclear Factor κ b) et AP-1 (Activator Protein-1) [259, 274].

Ces facteurs régulent respectivement l'expression des gènes codant des cytokines inflammatoires comme TNF- α et IL-6, ainsi que l'expression des gènes codant des

peptides antimicrobiens, tels que BDH-2/3 (beta-défensine humaine 2/3) et des protéines du métabolisme du fer, telle que la FTH (Ferritin Heavy Chain) [51, 275, 276, 277].

b) Voie de signalisation indépendante de la protéine MyD88 : Des études sur des souris MyD88^{-/-} ont également révélé l'existence d'une voie activée par TLR3 et TLR4 qui est indépendante de la protéine MyD88 [278, 279]. En effet, l'induction de NF-κB par le LPS (TLR4) et les ARNdb (TLR3) n'est pas abolie chez les souris MyD88^{-/-} [280]. Effectivement, TLR3 et TLR4 utilisent une autre protéine adaptatrice nommée TRIF ou TICAM-1 [281]. TLR3 fixe directement TRIF sur son domaine TIR alors que TLR4 utilise la protéine TRAM comme intermédiaire pour fixer TRIF [282]. Finalement, cette voie de signalisation activera les MAP kinases et le facteur de transcription NF-κB, ainsi que IRF3 (interferon regulatory factor 3) qui régule l'expression des gènes codant les IFNs [283].

TLR4 est le seul TLR qui recrute quatre protéines adaptatrices et qui active les deux voies dépendantes et indépendantes de MyD88. Une fois activé par du LPS, le TLR4 utilise la voie MyD88 pour induire une phase précoce d'activation de NF-κB et des MAP kinases [267]. Par la suite, TLR4 subit une endocytose pour être livré à des vésicules intracellulaires où il active la voie MyD88 indépendante pour médier la phase tardive d'activation de NF-κB et des MAP kinases, ainsi que la phosphorylation d'IRF3.

Bien que l'activation de la voie TRIF soit suffisante pour l'induction des IFN de type I, l'activation des deux voies MyD88 et TRIF sont tous les deux nécessaires pour une activation robuste de NF-κB et des MAP kinases ainsi que l'induction ultérieure de cytokines inflammatoires.

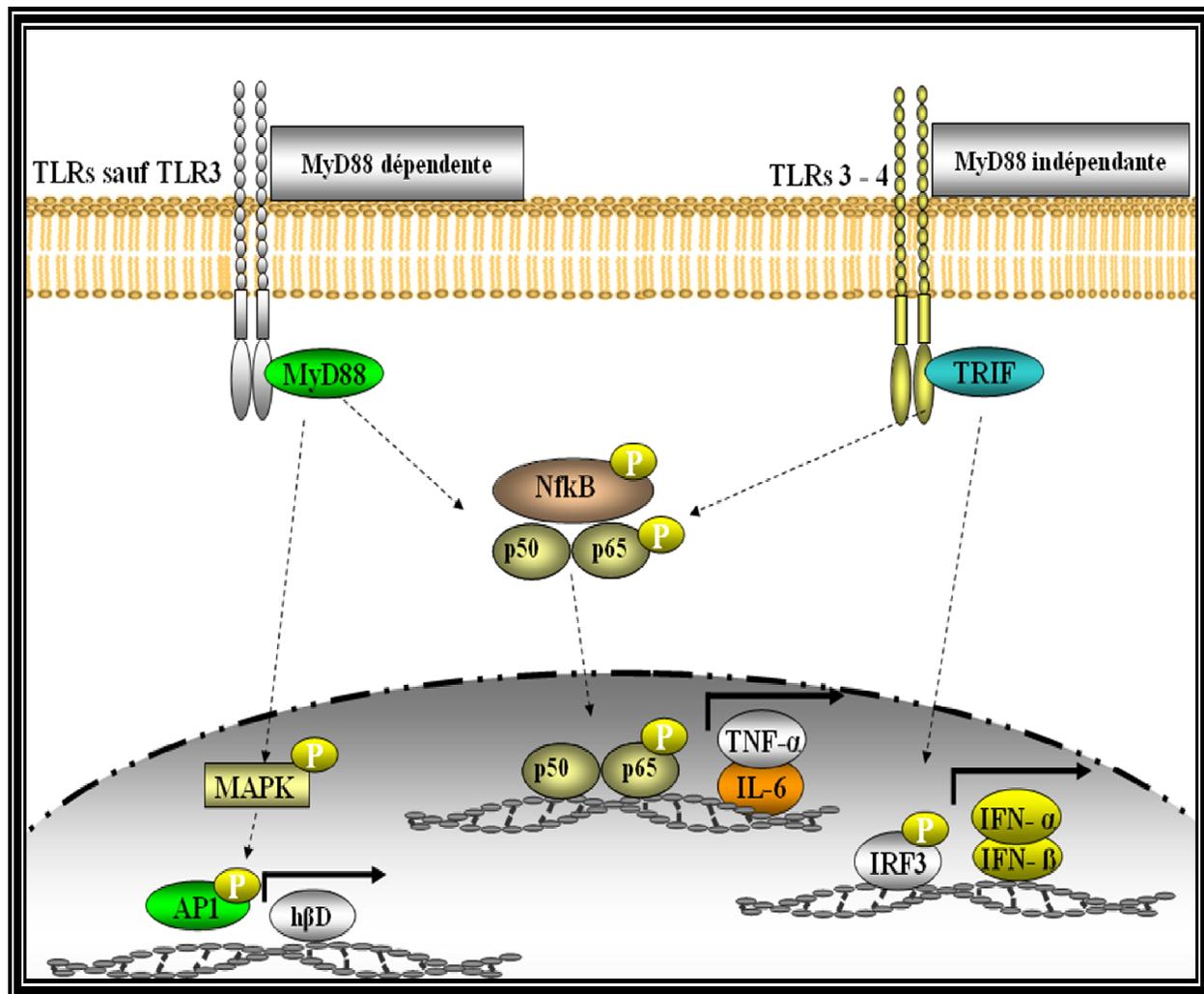


Figure 13. Voies de signalisation des TLRs.

Légende: Tous les TLRs sauf TLR3 induisent une voie de signalisation impliquant la protéine adaptatrice MyD88 qui active les MAP Kinase et le facteur de transcription NF-κB. De plus, TLR3 et TLR4 activent une voie alternative impliquant la protéine adaptatrice TRIF qui active les facteurs de transcription NF-κB et IRF3.

7. Objectifs du projet de doctorat

Le fer est un oligoélément essentiel pour presque tous les microbes. Les pathogènes microbiens utilisent des multiples mécanismes pour capter ce métal. Pour ralentir la prolifération microbienne, l'hôte répond rapidement aux invasions microbiennes par diminution de la concentration de fer dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la reconnaissance des pathogènes microbiens est un élément essentiel pour l'initiation de la réponse immunitaire innée, tels que l'inflammation.

Il est maintenant bien établi que l'un des signaux inflammatoires les plus efficaces est celui médié par le LPS de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatives. Le LPS active TLR4 pour induire une libération massive de cytokines inflammatoires chez l'hôte infecté. Cette réponse est également accompagnée d'une hyposidérémie : un mécanisme de défense primitif qui contribue à la réduction du fer circulant tout en minimisant sa disponibilité pour les agents pathogènes.

HAMP est devenu l'agent clé des hyposidérémies rencontrées durant l'inflammation. HAMP agit comme le régulateur principal de l'exportation du fer cellulaire en se liant à l'exportateur FPN et induisant sa dégradation. Ainsi, HAMP inhibe l'exportation de fer des macrophages et des cellules épithéliales de l'intestin, ce qui conduit à une augmentation de stockage du fer dans les macrophages et à une diminution de la capacité à absorber le fer à partir de l'intestin. En cas de maladies chroniques, la séquestration du fer et l'hyposidérémie peuvent limiter la disponibilité de ce métal pour l'érythropoïèse et contribuent ainsi à l'anémie inflammatoire.

Précisément, les travaux de ce projet de doctorat répondent à trois objectifs correspondant chacun à un chapitre de cet ouvrage :

1) Étudier la régulation de HAMP au niveau des macrophages :

Il a été montré que HAMP est synthétisé principalement dans le foie. D'autre part, il existe des preuves que HAMP peut être également produit par les macrophages. Toutefois, la régulation moléculaire de l'expression de HAMP au niveau des macrophages est inconnue. Nous avons montré dans des études précédentes que chez la souris, l'induction de HAMP est dépendante de TLR4 [284]. Comme les macrophages expriment divers TLRs à leur surface, on a mis l'hypothèse selon laquelle la signalisation des TLRs peut être importante pour la production de HAMP dans des macrophages. En outre, lors de l'inflammation, nous avons examiné si les niveaux accrus du fer dans les macrophages peuvent affecter la production des cytokines ultérieures. Cette étude revêt une importance quant à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués d'une part dans la régulation de HAMP macrophagique et d'une autre part dans la rétention du fer sérique et sa séquestration dans les macrophages, contribuant ainsi au développement d'hyposidérémie rencontrée dans les maladies inflammatoires chroniques.

2) Étudier le rôle des TLRs et de la protéine adaptatrice MyD88 dans le développement d'hyposidérémie rencontrée durant la phase aigüe de la réponse inflammatoire :

On a déjà montré que l'induction de HAMP hépatique dépend des voies de signalisations médiées par TLR4 [284]. Par contre, les souris déficientes en TLR4 ont conservé leur capacité à diminuer le taux du fer circulant après injection avec du LPS, ce qui suggère que les changements aigus dans l'homéostasie du fer provoquée par LPS peuvent se produire à la fois par des mécanismes dépendants et indépendants de TLR4 [236]. Cela nous a poussé à explorer les mécanismes moléculaires par lesquels les TLRs et leurs protéines adaptatrices régulent les gènes impliqués dans le métabolisme du fer. En fait, la compréhension du rôle des TLRs et de leurs protéines adaptatrices dans le développement d'hyposidérémie présente un intérêt clinique, comme ceci va permettre de développer des stratégies thérapeutiques pour lutter contre la

séquestration du fer dans les macrophages au cours de l'inflammation pour limiter le développement des anémies inflammatoires.

3) Explorer le rôle probable de la protéine adaptatrice MyD88 dans les voies de signalisations des réserves en fer :

Durant notre travail conçu pour répondre aux deux premiers objectifs, nous avons montré que l'activation des TLRs nécessite la présence de la protéine adaptatrice MyD88 pour induire l'expression de HAMP au niveau des macrophages [285] et que la protéine MyD88 s'avère utile pour développer et maintenir une réponse inflammatoire adéquate chez la souris lors du choc endotoxique médié par du LPS [286]. Plus précisément, les souris MyD88^{-/-} étaient incapables de réduire le taux du fer circulant et de le séquestrer au niveau des macrophages spléniques [286]. D'autre part, on a constaté que les souris MyD88^{-/-} représentent un taux élevé de fer par rapport aux souris sauvages. Ainsi, on a décidé d'étudier l'implication possible de la protéine adaptatrice MyD88 dans la régulation systémique de l'homéostasie du fer. Bien que le rôle de MyD88 dans l'immunité innée soit bien établi, cette étude apportera un rôle novice pour cette protéine dans le métabolisme du fer.

Section 2. MANUSCRIT 1

Bacterial cell wall constituents induce hepcidin expression in macrophages
through MyD88 signaling

Inflammation, 2012

Antonio Layoun¹, Manuela M. Santos^{1,2}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)
and Institut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Manuela M. Santos, Centre de recherche, CHUM – Hôpital
Notre-Dame, Pav. De Sève Y5625, 1560 rue Sherbrooke est, Montréal (Québec) H2L
4M1, Canada Tel: + 1 (514) 890-8000 ext. 28928 Fax: + 1 (514) 412-7661

Key Words: Hpcidin, iron, macrophages, inflammation, TLR, MyD88, hypoferremia

Contribution des auteurs

A. Layoun est responsable de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction
de cet article.

M.M.Santos a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abstract

Hepcidin is a key regulator of iron recycling by macrophages that is synthesized mainly by hepatocytes but also by macrophages. However, very little is known about the molecular regulation of hepcidin in macrophages. In the present study, we investigated hepcidin regulation in the RAW264.7 macrophage cell line and in murine peritoneal macrophages (MPMs) stimulated with different toll-like receptor (TLR) ligands. We found that TLR-2 and TLR-4 ligands activated hepcidin expression in RAW264.7 cells and in wild-type MPMs, but not in MPMs isolated from TLR2^{-/-}, TLR-4-deficient or MyD88^{-/-} mice. IL-6 production by RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (TLR4 ligand) was enhanced by high amounts of iron present in the culture medium. We conclude that hepcidin expression in macrophages is regulated mainly through TLR2 and TLR4 receptors via the MyD88-dependent signalling pathway, and that autocrine regulation of iron accumulation in macrophages by hepcidin may affect the levels of pro-inflammatory cytokine production.

Introduction

The growth of many microorganisms is extremely sensitive to the lack of iron [287, 288]. Thus, an important host defense response to infectious agents involves iron withdrawal from the circulation and its storage in specialized cells, mostly macrophages [289]. Iron-related defense mechanisms include the induction of iron-binding proteins, the repression of dietary iron absorption, and the increase of iron storage in organs, primarily in macrophages and in the spleen [290]. These coordinated changes result in lowering the amount of circulating iron, or hypoferremia, which can develop within hours of an inflammatory stimulus. An important regulator of the hypoferremic response is the antimicrobial peptide hepcidin [291]. By binding to the cellular iron exporter ferroportin and inducing its degradation [199], hepcidin inhibits iron export from both macrophages and epithelial cells in the intestine, leading to increased iron storage within macrophages and diminished capacity to absorb iron from the intestine. Accordingly, hepcidin is highly induced in inflammatory settings and during infections [217, 292] and, as such, plays a central role in the development of the so-called anemia of chronic disease (ACD) or anemia of inflammation [290, 293], which occurs when iron availability becomes insufficient to meet daily erythropoiesis needs.

Hepcidin has been shown to be mainly synthesized in the liver, but there is mounting evidence that hepcidin can also be produced by macrophages [294, 295, 296]. However, the molecular regulation of macrophage hepcidin expression is unknown. Macrophages express surface Toll-like receptors (TLRs), which recognize molecular patterns conserved through evolution in a wide range of microorganisms collectively termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [297].

TLR4 is the primary signaling receptor for enteric Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS) and chlamydial heat shock protein 60, whereas TLR2 is the signaling receptor for Gram-positive bacterial cell wall components; bacterial, mycobacterial, and spirochetal lipoproteins; and fungi. TLR3 transduces the response to double-stranded (ds) RNA, TLR5 is the receptor for bacterial flagellin, and TLR9 is

the receptor for bacterial DNA, which contains short unmethylated CpG dinucleotides. TLR7 and TLR8 recognize viral single-stranded (ss) RNA. While certain TLRs (TLRs 1, 2, 4, 5, and 6) are expressed on the cell surface, others (TLRs 3, 7, 8, and 9) are found almost exclusively in intracellular compartments such as endosomes, and their ligands, mainly nucleic acids, require internalization to the endosome before signaling is possible [252].

We have shown in previous studies that LPS-induced hepcidin expression *in vivo* is dependent on TLR4 [292], indicating that TLR signaling may be important for the activation of hepcidin production in macrophages. In monocytes, autocrine production of hepcidin has been shown to down-regulate ferroportin expression, thereby contributing to iron sequestration within these cells [296]. Activated macrophages secrete many different inflammatory cytokines, including IL-6, which have been shown to drive hepcidin expression in the liver [230]. However, whether increased iron levels within macrophages in turn affect IL-6 production has not yet been investigated.

In the present study, we used the RAW 264.7 cell line and primary mouse peritoneal macrophages (MPMs) to investigate the regulation of hepcidin expression through TLR signaling after stimulation with distinct TLR ligands. Furthermore, we evaluated the effect of iron availability in the medium on the ability of stimulated macrophages to produce IL-6.

Materials and methods

Cell culture and reagents

The murine macrophage cell line RAW264.7 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Livingston, MT, USA). RAW 264.7 cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Wisent, QC, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (FBS, Gibco, NY, USA). RAW264.7 cells were seeded at a density of 10⁶ cells/well into 6-well plates and maintained in culture for 24 hours prior to experiments.

Animals

All procedures were performed in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines after approval by the institutional Animal Care Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Female wild-type C57BL/6 mice aged between 6 and 8 weeks were purchased from Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA, USA). Tlr2^{tm1Kir} female mice in the C56BL/6 background, C3H/HeJ and C3H/HeOuJ mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). MyD88^{-/-} deficient mice with the B6 genetic background were kindly provided by Dr. Shizuo Akira, Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, and Exploratory Research for Advanced Technology (ERATO), Japan Science and Technology Corporation, and were maintained as described previously [298]. All animals were permanently housed under specific pathogen-free conditions.

Isolation and culture of murine peritoneal macrophages (MPMs)

MPMs were isolated from mice 3 days after intraperitoneal injection of 1 mL of 3.8% thioglycollate medium and cultured in RPMI-1640 (supplemented with penicillin, streptomycin, L-glutamine, and 10% FCS). Enrichment of the recovered macrophages was confirmed by flow cytometric analysis (Coulter Epics Elite counter, Coulter, Hialeah, FL, USA) using the F4/80 antibody (Caltag, CA, USA) after blocking nonspecific staining with CD16/CD32 antibodies (Pharmingen, Mississauga, ON, CA) [299], and was consistently found to be above 95%.

Cell treatments

Bacterial lipoprotein Pam3CSK4 (0.5 mg/ml), polyionosine-polycytidylic acid (Poly(I:C)) (10 mg/ml), lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 055:B4 (100 ng/ml), purified flagellin from *Salmonella typhimurium* (100 ng/ml); lipoprotein synthetic FSL1 (100 ng/ml); single-stranded RNA derived from the HIV-1 long terminal repeat ssRNA40 (1 µg/ml) and Type B CpG oligonucleotide ODN1826 (1 µM) were purchased from InvivoGen (San Diego, USA). Cells were cultured in serum-free medium for 24 hours in the presence of the ligands. In iron depletion or iron repletion experiments, cells were cultured with 200 µM of desferoxamine DFO (Mayne Pharma, Montreal, Canada) for 12 h [300] or with 20 µM of ferric ammonium citrate (FAC) (Fisher Scientific, Montreal, Canada) for 24 h, and subsequently stimulated with 100 ng/ml LPS for 4 hours. All treatments were tested in triplicate and the experiments were repeated at least 3 times.

Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) [301], and RT was performed with the Thermoscript RT-PCR system (Invitrogen). Hepcidin (*Hamp*) and β -actin mRNA levels were measured by real-time PCR in a Rotor Gene 3000TM Real Time DNA Detection System (Montreal Biotech Inc., Kirkland, QC, Canada) with the QuantiTect SYBRGreen I PCR kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), as described [236, 302], and expression levels of hepcidin were normalized to the housekeeping gene β -actin.

The primers employed were: β -actin – 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' and 5'-GGTGTGGAAGGTCTCAA-3'; *Hamp* – 5'-AGAGCTGCAGCCTTTGCAC-3' and 5'-GAAGATGCAGATGGGGAAGT-3'; IL-6 – 5'-AACGATGATGCACTTGCAGA-3' and 5'-CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG-3'.

Statistical analysis

All statistics were calculated using SigmaStat® 3.1 (Systat Software, Richmond, CA). All values in the figures are expressed as means \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated statistically by 1-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Results

Hepcidin activation in RAW 264.7 macrophages by TLR ligands.

Macrophages express abundant TLRs that enable them to sense the presence of pathogens via recognition of PAMPs [303]. To investigate the molecular regulation of hepcidin expression in macrophages, we treated the murine macrophage cell line RAW 264.7 for 24 hours with a variety of TLR agonists: Pam3CSK4 (TLR1/2), Poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), Flagellin (TLR5), FSL1 (TLR6/2), ssRNA40 (TLR7), and CpG ODN1826 (TLR9) (Figure 1^{m1} A). Hepcidin mRNA levels were undetectable in unstimulated macrophages, while macrophages treated with Pam3CSK4, FSL1 or LPS, TLR2 and TLR4 ligands significantly increased hepcidin expression. However, neither TLR stimulation by viral or bacterial nucleic acids using TLR3, TLR7 or TLR9 ligands nor TLR5 stimulation by flagellin had any effect on hepcidin expression. Similar results were obtained when using primary macrophages, MPMs, as shown in Figure 1^{m1} B. Thus, only TLR2 and TLR4 ligands were capable of stimulating hepcidin mRNA in murine macrophages.

TLR2 is required for hepcidin induction in MPMs by Pam3CSK4 and FSL1

To further understand whether activation of TLR2 is required for Pam3CSK4 and FSL1 to induce hepcidin expression, we used MPMs isolated from TLR2 knockout mice (TLR2^{-/-}). As shown in Figure 2^{m1}, treatment with Pam3CSK4 and FSL1 failed to increase hepcidin expression in TLR2^{-/-} macrophages, confirming that TLR2 receptor is required to activate hepcidin expression in macrophages by Pam3CSK4 and FSL1.

TLR4 is required for hepcidin induction in MPMs by LPS

Next, we used C3H/HeJ mice, a mouse strain with a spontaneous loss-of-function mutation in TLR4 [304, 305] to evaluate the need for TLR4-mediated signaling in activation of hepcidin by LPS. MPMs treated with LPS failed to increase hepcidin expression in C3H/HeJ macrophages (Figure 3^{m1}), thereby confirming that the activation of hepcidin expression by LPS is TLR4-dependent.

The adaptor protein MyD88 is required for hepcidin induction in MPMs

Upon recognition of microbial products, TLRs transduce signals through multiple pathways by recruiting different adaptor molecules. MyD88 is one of the adaptor molecules utilized by multiple TLRs. While TLR2 agonists signal solely through MyD88, TLR4 agonists signal via MyD88-dependent and MyD88-independent pathways [297]. We asked whether hepcidin up-regulation mediated by stimulation through TLR2 and TLR4 in macrophages depends on MyD88. As shown in Figure 4^{m1}, when macrophages from MyD88 knockout mice (MyD88^{-/-}) were stimulated by TLR2 (Pam3CSK4 and FSL1) or TLR4 (LPS) ligands no up-regulation of hepcidin was detected. Therefore, both TLR2- and TLR4-mediated hepcidin up-regulation relied completely on the MyD88 adaptor molecule.

Macrophage iron levels affect IL-6 production

Hepcidin induction in monocytes has been shown to reduce ferroportin expression and result in iron accumulation within monocytes [296]. Therefore, we next questioned whether macrophage iron levels in our experimental model would affect the production of IL-6, the major cytokine involved in hepcidin induction in hepatocytes [222]. RAW 264.7 cells were treated with the iron chelator desferrioxamine (DFO) or with ferric ammonium citrate (FAC), and were subsequently stimulated with LPS. We found that LPS-triggered hepcidin induction was significantly suppressed in iron-depleted macrophages. Conversely, in FAC-treated macrophages hepcidin induction by LPS was noticeably enhanced compared to cells grown in normal medium (Figure 5^{m1}). Hence, IL-6 production in macrophages depends on iron levels, suggesting a pivotal role for iron in regulating pro-inflammatory cytokine expression in stimulated macrophages.

Discussion

Hepcidin is a key regulator of iron metabolism produced by hepatocytes as well as other cells, including macrophages [187, 296]. In hepatocytes, hepcidin mRNA has been shown to be primarily stimulated by pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-1 β [306, 307]. In contrast, stimulation of macrophages with cytokines does not induce hepcidin in macrophages (Dongmei Wang, unpublished observations, and [185, 294, 295, 308]), suggesting that hepcidin mRNA is differently regulated in macrophages and hepatocytes.

In this study, we investigated the molecular regulation of hepcidin expression in macrophages stimulated through TLRs ligands. We found that only TLR2 and TLR4 agonists, representing gram-positive (TLR2 ligands) and gram-negative (TLR4) bacteria wall constituents, up-regulate hepcidin mRNA expression in both the macrophage-like cell line RAW264.7 and in primary murine peritoneal-derived macrophages. The regulation of hepcidin expression in macrophages by Pam3CSK4/FSL1 and LPS was TLR2 and TLR4 dependent, respectively, further confirming the important role of TLR-recognition in hepcidin induction in macrophages [187, 292]. We further demonstrate that TLR2- and TLR4-mediated hepcidin up-regulation was completely abrogated in MyD88^{-/-} macrophages, suggesting that MyD88 signaling is required for hepcidin induction through TLRs.

Macrophages play a central role both in iron homeostasis and in the immune response, as they recycle iron from senescent red blood cells and, during inflammation and infection, produce pro-inflammatory cytokines and antibacterial molecules, including hepcidin.

Prior studies have shown that macrophages are important producers of hepcidin [187, 294, 295, 296, 309] and that within macrophages, hepcidin localizes in mycobacteria-containing phagosomes, where it exerts its antimycobacterial activity [295] by directly disrupting bacterial and fungal membrane function [310] and by interfering with intracellular nucleic acids [311].

In addition to its antibacterial activity in phagosomes, hepcidin can also be secreted [295] and can affect iron homeostasis and intracellular iron levels in macrophages by decreasing the levels of the iron exporter ferroportin [290, 294, 296]. In this study, we further investigated whether increased iron levels in macrophages may affect subsequent cytokine production. We demonstrate that cultured peritoneal macrophages exposed to iron show increased production of IL-6 in response to TLR4 agonists suggesting that iron retention within macrophages may enhance cytokine production by activated macrophages. Our results are in accordance with previous reports using freshly isolated peritoneal macrophages from $Hfe^{-/-}$ mice, a mouse model of the iron overload disease hereditary hemochromatosis in humans [312, 313]. $Hfe^{-/-}$ macrophages show a blunted cytokine response to LPS [314], a response that has been ascribed to differences in iron levels, which are lower in $Hfe^{-/-}$ than in wild-type macrophages [315]. Thus, our findings presented here provide additional evidence that hepcidin-mediated elevation of intracellular iron plays an important role in the cytokine response of macrophages and hence subsequent immune responses.

In summary, in contrast to hepatocytes, macrophage hepcidin expression is positively regulated by gram-positive and gram-negative bacteria wall constituents through TLR2 and TLR4 receptor requiring MyD88 signaling, and the ensuing iron retention may boost macrophage cytokine production.

Acknowledgments:

We acknowledge the help of Dr. Peter P. Liu from the Heart and Stroke/Richard Lewar Centre of Excellence, University of Toronto, Canada with the $MyD88^{-/-}$ mouse. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant no. MOP44045). AL is the recipient of a Ph.D. scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). MMS is the recipient of a Research Scholarship (Senior) from the FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec).

Figures

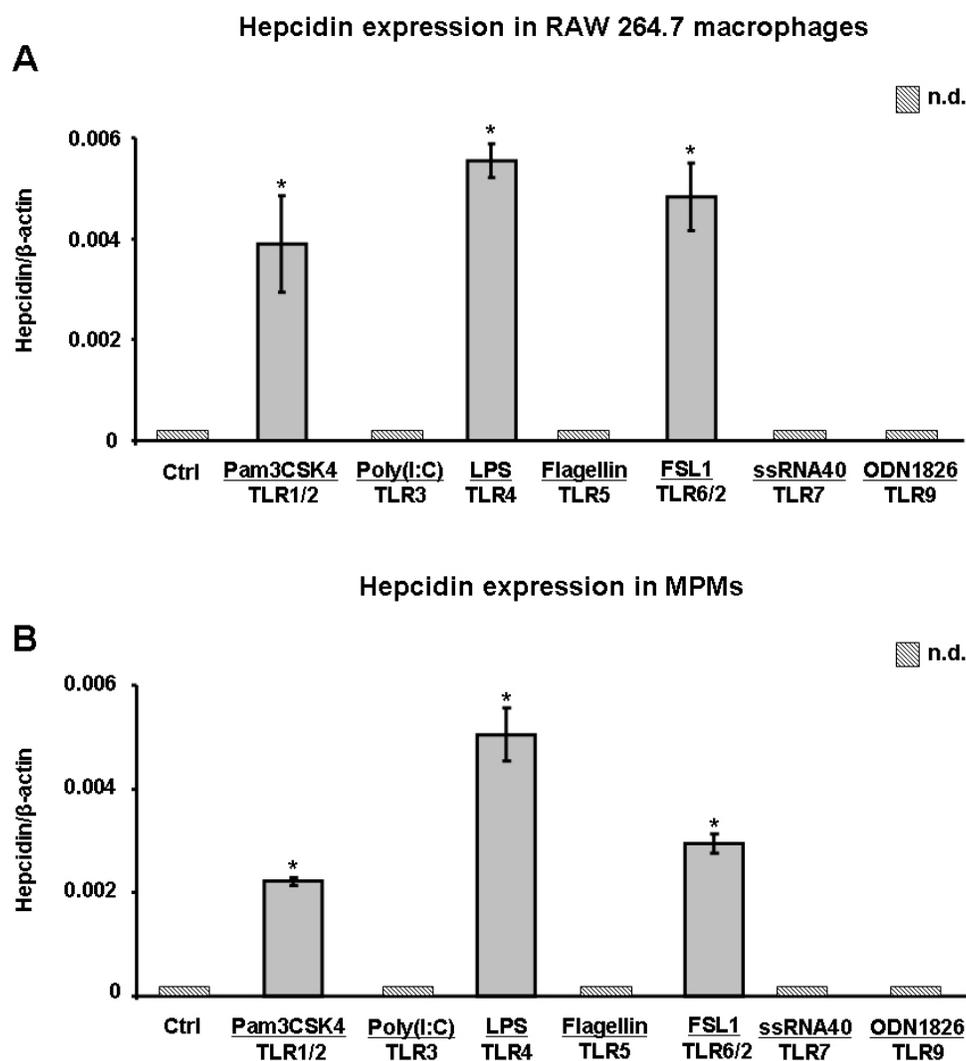


Figure 1m1. TLR2 and TLR4 ligands induce hepcidin expression in RAW 264.7 and in murine peritoneal macrophages. Hepcidin mRNA levels in (A) RAW 264.7 macrophages and in (B) murine peritoneal macrophages (MPMs) stimulated with TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6/2, TLR7 and TLR9 ligands. Data are presented as mean \pm SEM; n.d. (not detectable); * $P < 0.05$ versus control (Ctrl). Results are representative of three similar experiments performed independently.

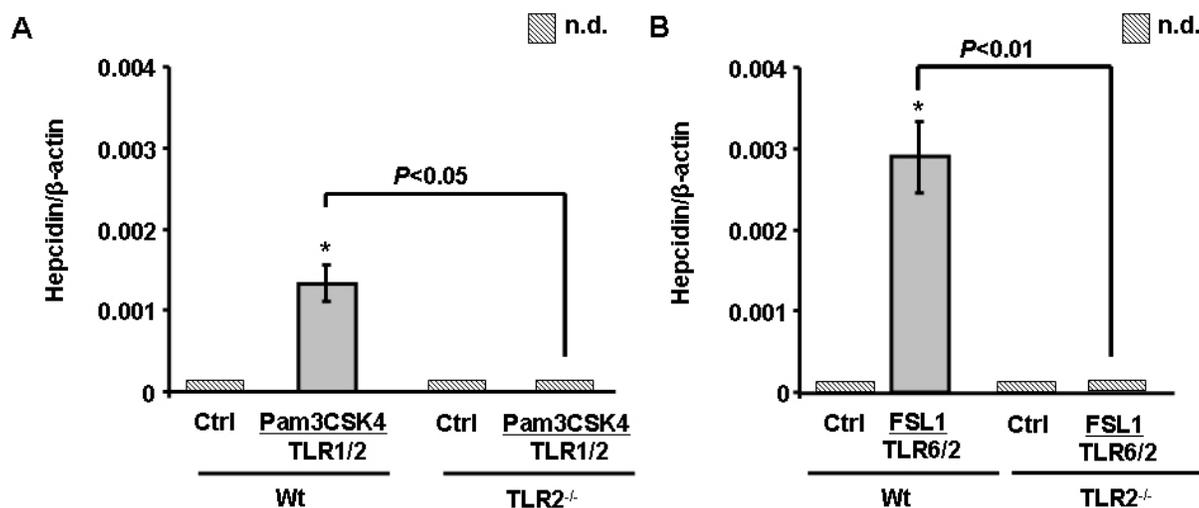
Hepcidin expression in TLR2^{-/-} MPMs

Figure 2m1. TLR2 is required for hepcidin stimulation by Pam3CSK4 and FSL1 in murine peritoneal macrophages. Hepcidin mRNA levels in murine peritoneal macrophages (MPMs) obtained from wild-type (Wt) and TLR2^{-/-} mice and stimulated with (A) Pam3CSK4 and (B) FSL1. Data are presented as mean \pm SEM; n.d. (not detectable); * $P < 0.05$ versus control (Ctrl). Results are representative of three similar experiments performed independently (3 mice per group).

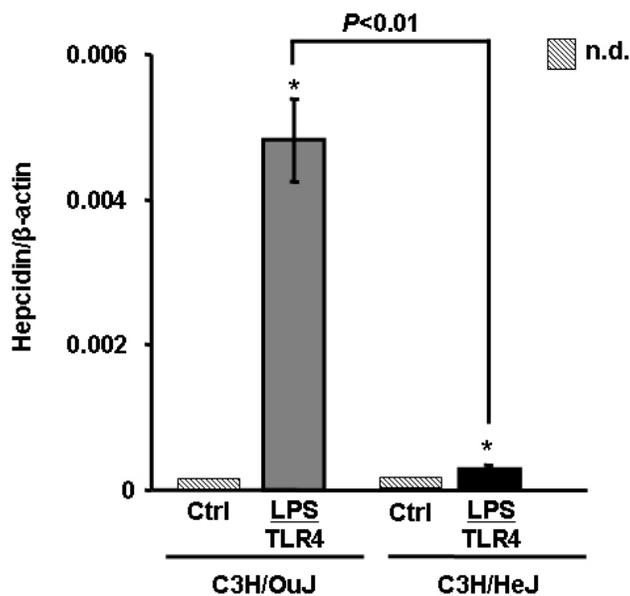
Hepcidin expression in TLR4^{-/-} MPMs

Figure 3m1. TLR4 is required for hepcidin stimulation by LPS in murine peritoneal macrophages. Hepcidin mRNA levels in murine peritoneal macrophages (MPMs) obtained from wild-type (C3H/OuJ) and TLR4-deficient (C3H/HeJ) mice stimulated with LPS. Data are presented as mean \pm SEM; n.d. (not detectable); * $P < 0.05$ versus control (Ctrl). Results are representative of four similar experiments performed independently (4 mice per group).

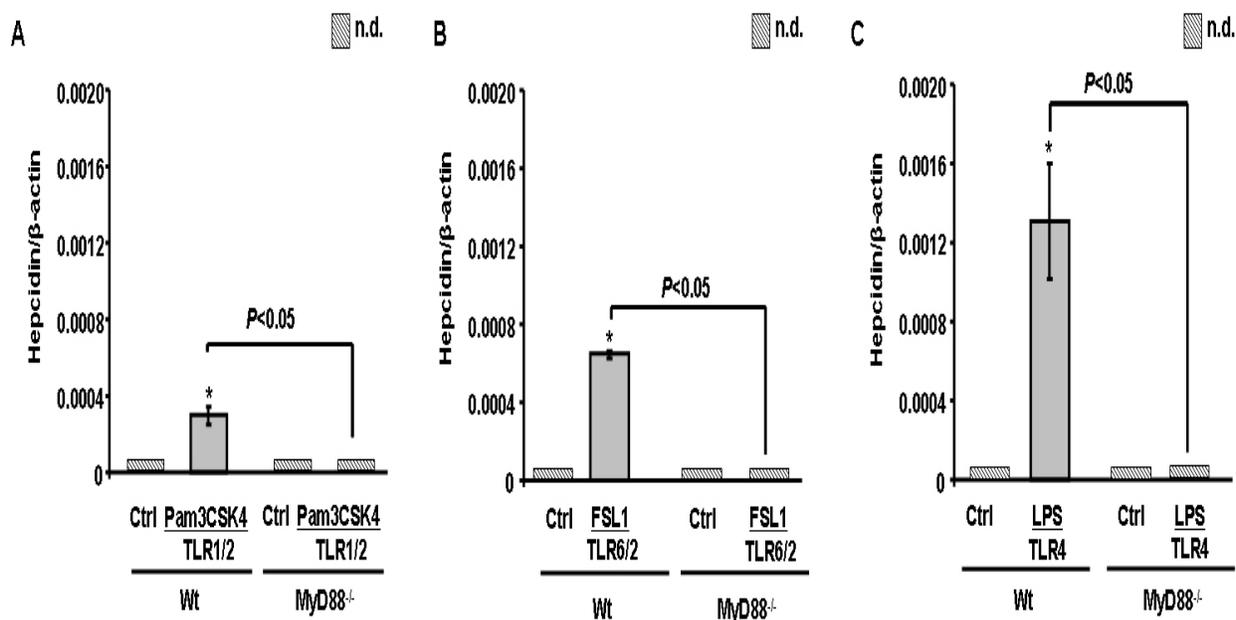
Hepcidin expression in MyD88^{-/-} MPMs

Figure 4m1. MyD88 signaling is essential for hepcidin stimulation by TLR2 and TLR4 ligands in murine peritoneal macrophages. Hepcidin mRNA levels in murine peritoneal macrophages (MPMs) obtained from wild-type (Wt) and MyD88^{-/-} mice and stimulated with (A) Pam3CSK4; (B) FSL1; and (C) LPS. Data are presented as mean ± SEM; n.d. (not detectable); * $P < 0.05$ versus control (Ctrl). Results are representative of three similar experiments performed independently (3 mice per group).

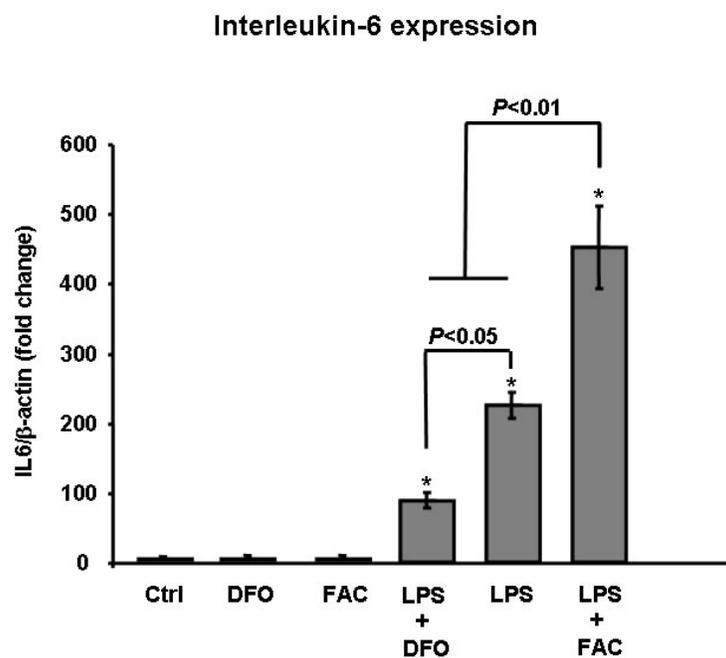


Figure 5m1. IL-6 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages varies with iron levels. IL-6 mRNA levels RAW264.7 macrophages incubated with ferric ammonium citrate (FAC) or with the iron chelator desferrioxamine (DFO) and stimulated with LPS. Data are presented as mean \pm SEM; n.d. (not detectable); * $P < 0.001$ versus control (Ctrl). Results are representative of three similar experiments performed independently.

Section 3. MANUSCRIT 2

Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 is required for sustained endotoxin-induced acute hypoferremic response in mice

The American journal of Pathology, June 2012, Vol. 180, No. 6

Short title: LPS-triggered hypoferremia in MyD88^{-/-} mice

Antonio Layoun¹, Hua Huang¹, Annie Calvé¹, Manuela M. Santos^{1,2}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Manuela Santos, Centre de recherche, CHUM – Hôpital Notre-Dame, Pav. De Sève Y5625, 1560 rue Sherbrooke est, Montréal (Québec) H2L 4M1, Canada Tel: + 1 (514) 890-8000 ext. 28928 Fax: + 1 (514) 412-7661.

Contribution des auteurs

A. Layoun est responsable de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article.

M.M.Santos a supervisé l'ensemble de l'étude et est responsable de la rédaction de cet article.

H. Huang et A. Calvé, ont contribué aux analyses expérimentales.

Abstract

Hypoferremia, associated with immune system activation, involves a marked reduction in the levels of circulating iron levels coupled with iron sequestration within macrophages. Toll-like receptor (TLR) signaling plays an important role in the development of the hypoferremic response, but how downstream signaling events affect genes involved in iron metabolism is incompletely understood. In this study we investigated the involvement of MyD88-dependent and MyD88-independent (TRIF) TLR signaling in the development of hypoferremia. Using MyD88- and TRIF-deficient mice we show that MyD88 and TRIF signaling are critical for the upregulation by LPS of the iron regulator hepcidin. In addition, MyD88 signaling is required for the induction of lipocalin 2 secretion and iron sequestration in the spleen. Activation of TLR4 and TLR3 signaling through LPS and poly(I:C) treatments resulted in rapid downregulation of hemochromatosis (Hfe) and ferroportin (Fpn1) expression in the spleen, independently of MyD88 or TRIF signaling and pro-inflammatory cytokine production. However, lack of MyD88 signaling significantly impaired the hypoferremic response triggered by LPS, indicating that solely ferroportin and Hfe downregulation is insufficient to maintain hypoferremia. The extent of the hypoferremic response was found to be limited by initial, basal iron levels. Taken together, our results suggest that targeting specific TLR signaling pathways by affecting the function of adapter molecules may provide new strategies to counteract iron sequestration within macrophages during inflammation.

Introduction

Inflammation is viewed as a protective response by the body necessary to remove, control or neutralize injurious stimuli [316]. Examples of harmful stimuli that can trigger an acute inflammatory response include invading pathogens, damaged cells, and irritants. Acute inflammation is triggered by the innate immune system, which represents the first line of defense in response to invading pathogens or tissue damage and plays a major role in host defense [297]. The innate immune response is activated through germline-encoded receptors, called pattern recognition receptors (PRRs), which recognize molecular patterns conserved throughout evolution in a wide range of microorganisms, collectively termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Among the best characterized PRR families are the Toll-like receptors (TLRs), which are responsible for sensing invading pathogens outside of the cell and in intracellular endosomes and lysosomes [297]. Each TLR recognizes specific PAMPs. For example, TLR4 together with myeloid differentiation factor 2 (MD2) recognizes extracellular lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. In addition, TLR4 is also involved in the recognition of viruses by binding to viral envelope proteins. TLR3 detects viral double-stranded (ds) RNA in the endolysosome and is involved in the recognition of polyinosinic polycytidylic acid (poly(I:C)), a synthetic dsRNA analog.

After ligand binding, TLRs dimerize and undergo a conformational change required for the recruitment of downstream signaling molecules, which include a variety of adaptor molecules. Two major pathways have been identified based on the usage of the distinct adaptor molecules, namely MyD88 and TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF; also known as TICAM-1) [297]. The MyD88 adaptor protein is essential for the downstream signaling of most TLRs. One exception is TLR3, which recruits TRIF adaptor protein in response to stimulation with dsRNA. The end result of these signaling cascades is the stimulation of gene expression and subsequent activation of antimicrobial and inflammatory activities.

Several of the genes that modify their expression levels during the TLR-mediated innate immune response are intrinsically linked to the control of iron metabolism. They are involved in the regulation of cellular iron uptake, release and storage and play a pivotal role in the so-called hypoferremic response [317]. The hypoferremic response involves a marked reduction in the levels of extracellular iron associated with circulating iron levels and has been regarded as an important defense mechanism by which the host limits iron acquisition by invading pathogens. Extensive studies in the past have revealed that iron is sequestered within macrophages during the hypoferremic response, resulting in limited iron availability for erythropoiesis [317]. While a transient hypoferremic response may be viewed as beneficial, long term iron sequestration within macrophages becomes a critical factor contributing to the development of anemia of chronic disease (ACD) or anemia of inflammation [290]. ACD is frequently found in patients suffering from infections, malignancies and autoimmune disorders, and can substantially contribute to the morbidity of the underlying disease. In many instances, ACD is a predictor of adverse outcomes.

Mechanistically, iron diversion from the circulation into storage has been attributed to the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 following immune activation [317]. These pro-inflammatory cytokines regulate the levels of several iron metabolism genes, including the iron importer transferrin receptor,[318, 319] the iron exporter ferroportin [320, 321, 322] and the iron storage protein ferritin [323]. Ferroportin binds to hepcidin, an antimicrobial peptide [324, 325] that induces ferroportin endocytosis and degradation [199]. Hence, hepcidin plays a pivotal role in controlling iron efflux from macrophages during the hypoferremic response.

In previous studies, we found that mice deficient in TLR4 are unable to regulate hepatic hepcidin expression in response to LPS, indicating that hepcidin induction in the liver is dependent on the signaling pathways mediated by TLR4 [284]. However, TLR4-deficient mice retained the ability to mount a hypoferremic response, suggesting that acute changes in iron homeostasis elicited by LPS may occur through both TLR4- and non-TLR4-dependent mechanisms [236]. These studies led us to question whether

genes involved in iron metabolism may be regulated via divergent adaptor proteins and downstream signaling pathways triggered by TLR ligands.

In this study, to gain further insight into the mechanisms involved in the acute hypoferremic response, we investigated the role of alternative TLRs adaptors, namely MyD88 and TRIF, by using MyD88^{-/-} and TRIF-deficient mice. In addition, Hfe and lipocalin 2 (Lcn2), two important proteins in iron metabolism [326, 327] and iron sequestration during infections [328, 329], were also examined for their potential role during the acute hypoferremic response using Hfe^{-/-} and Lcn2^{-/-} mice.

Materials and Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines after approval by the institutional Animal Care Committee of the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). C57BL/6 (B6) wild-type female mice aged between 6 and 8 weeks were purchased from Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA, USA). TRIF-deficient ($\text{Trif}^{\text{Lps2/Lps2}}$) mice were purchased from Jackson Laboratories (C57BL/6J-*Ticam1*^{Lps2/J}; Bar Harbor, ME, USA). MyD88^{-/-} deficient mice and Lcn2^{-/-} mice with the B6 genetic background were kindly provided by Dr. Shizuo Akira, Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, and Exploratory Research for Advanced Technology (ERATO), Japan Science and Technology Corporation, and were maintained as described previously [328, 330]. Hfe^{-/-} mice in the 129/SvEvTac background were kindly provided by Dr. Nancy C. Andrews, Howard Hughes Medical Institute and Harvard Medical School, Children's Hospital (Boston, MA, USA)[331] and were backcrossed onto the B6 background for 10 generations at our animal facility [284]. All animals used in the experiments were female and were permanently housed under specific pathogen-free conditions.

Animal treatments

Mice were fed a commercial diet (Teklad Global 18% protein rodent diet; Harlan Teklad, Madison, WI, USA). Where indicated, dietary iron overload was produced by giving 8-week-old mice the same commercial diet supplemented with 2.5% (w/w) carbonyl iron (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 2 weeks.[299] Acute inflammation was produced by a single i.p. injection of different TLRs ligands: LPS (*Escherichia coli* serotype 055:B5, 1 µg/g unless otherwise indicated; Sigma-Aldrich; Poly(I:C), 12.5 µg/g (EndoFitTM < 0.001 EU/µg endotoxin) and Zymozan, 250 µg/g (EndoFitTM < 0.001 EU/µg endotoxin) were purchased from InvivoGen (San Diego,

USA). In other experiments, mice were injected with recombinant mouse IL-6 (1 µg/g i.p; Cedarlane Laboratories, Hornby, ON, Canada). Control mice were similarly injected with an equivalent volume of sterile saline solution (0.9% NaCl).

IL-6 assays:

IL-6 protein levels in serum were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits as per manufacturer's instructions (mouse IL-6 ELISA kits from R&D (Minneapolis, USA)).

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis:

Protein concentrations were measured using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Equivalent amounts of protein from tissue extracts were loaded to perform electrophoresis. For analysis of Lcn2 in serum, 1.5 µL of serum was boiled in loading buffer containing 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, and bromophenol blue for 5 min. Proteins were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk solution and incubated with the following antibodies: ferroportin (Fpn1), a kind gift from Dr. Kostas Pantopoulos, McGill University, Montreal, Canada,[332] Hfe (Alpha Diagnostic, San Antonio, USA), Lcn2 (R&D) and β-actin (Abcam, Cambridge, USA). To detect immunocomplexes formed, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling, Danvers, USA), anti-mouse IgG (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) or anti-goat IgG (R&D) were used as secondary antibodies. Staining intensity was developed with the chemiluminescence system from Amersham Biosciences.

Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) :

Total RNA from tissue samples was isolated by acid phenol extraction [301] (Trizol, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) as recommended by the manufacturer, and reverse transcription was performed with the Omniscript reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) system from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). mRNA levels of selected genes were measured by real-time PCR in a Rotor Gene 3000 Real Time DNA Detection System (Montreal Biotech, Kirkland, QC, Canada) with QuantiTect SYBRGreen I PCR kits (Quiagen) as described,[333] using the primer sequences shown in Table 1. Expression levels were normalized to the housekeeping gene β -actin.

Table 1. Genes and primer sequences used in quantitative real time PCR

Gene	Forward	Reverse
β-actin	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	5'-GGTGTTGAAGGTCTCAA-3'
Hamp1	5'-AGAGCTGCAGCCTTTGCAC-3'	5'-GAAGATGCAGATGGGGAAGT-3'
Fpn1	5'-CCCATCCCCATAGTCTCTGT-3'	5'-CTTGCAGCAACTGTGTCACC-3'
Hfe	5'-TCTTGGATCCTCCACGTTTC-3'	5'-TCATCCACATAGCCCCTAGC-3'
Lcn2	5'-CCTCAAGGACGACAACATCA-3'	5'-ACCCATTGAGTTGTCAATGC-3'

Serum iron and total iron binding capacity

Serum iron and total iron-binding capacity were assessed by colorimetric assay with the Kodak Ektachem DT60 system (Johnson & Johnson, Ortho Clinical Diagnostics, Mississauga, ON), and transferrin saturation was calculated from these data [299].

Measurement of iron concentration in the spleen

Splenic iron concentration was assessed by acid digestion of tissue samples, followed by iron quantification with atomic absorption spectroscopy [236].

Statistical analysis

All statistics were calculated using SigmaStat® 3.1 (Systat Software, Richmond, CA). All values in the figures are expressed as means \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Contribution des auteurs

A. Layoun est responsable de la réalisation la majorité des travaux de recherche et la rédaction de cet article.

M.M.Santos a supervisé l'ensemble de l'étude.

Results

TLR agonists trigger hypoferremic responses in mice. To investigate the involvement of TLRs and associated signaling pathways in hypoferremia, we first studied hypoferremic responses to activation of TLR2 (MyD88), TLR3 (TRIF) and TLR4 (MyD88 and TRIF signaling) by treating mice with Zymosan (TLR2 agonist), poly(I:C) (TLR3 agonist) and LPS (TLR4 agonist). As shown in Figures 1^{m2}A and 1^{m2}B, serum iron levels and transferrin saturation were significantly lower in mice treated with TLR ligands when compared with saline-treated controls. Thus, stimulation with TLR ligands resulted in a significant reduction of circulating iron. These results indicate that both MyD88 and TRIF signaling can generate an acute hypoferremic response.

MyD88 signaling is required for sustained LPS-induced hypoferremic response. To further understand the involvement of MyD88 and TRIF-mediated signaling in the hypoferremic response, we next examined the role of these two major pathways during LPS-induced acute hypoferremia using mice deficient in either MyD88 (MyD88^{-/-}) or TRIF (Trif^{Lps2/Lps2}) protein. Mice were treated with LPS or saline, and serum iron levels and transferrin saturation were examined at 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours post-injection (Figures 2^{m2}A and 2^{m2}B). We found that the hypoferremic response in Trif^{Lps2/Lps2} mice was very similar to that observed in wild-type mice, with a sharp drop in circulating iron peaking at 6 hours post-treatment and persisting for up to 24 hours. However, while MyD88^{-/-} mice responded with an initial drop of serum iron parameters up to 3 hours after LPS injection, they were unable to sustain this response. In fact, serum iron levels in MyD88-deficient mice started rising again after 3 hours and even increased significantly above basal levels after 24 hours ($P < 0.05$). Thus, lack of MyD88 signaling significantly impairs the hypoferremic response triggered by LPS.

Dual signaling of MyD88 and TRIF is critical for the activation of the iron regulator hepcidin during LPS-induced hypoferremia. Having established that MyD88 is important for maintaining low circulating iron levels during the acute response to LPS, we sought to investigate the mechanism associated with the suppressed hypoferremic response in MyD88^{-/-} mice. Thus, we next assessed levels of hepcidin, the major regulatory hormone involved in iron metabolism [290]. As shown in Figure 2^{m2} C, hepcidin levels significantly rose in wild-type mice 3 and 6 hours after LPS treatment, confirming previous work demonstrating the ability of LPS to induce hepcidin [217, 284]. Unexpectedly, both MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice failed to upregulate their hepatic hepcidin mRNA levels, with hepcidin levels remaining constant for up to 24 hours.

To further confirm the need for both MyD88 and TRIF signaling to activate hepcidin we measured hepatic hepcidin levels in wild-type and MyD88^{-/-} mice stimulated with poly(I:C) to activate the TRIF pathway. We found that poly(I:C) caused a significant reduction in circulating iron as judged by the reductions in serum iron and transferrin saturation seen at 6 hours post-injection (Figure 3^{m2} A and 3^{m2} B). However, hepcidin mRNA levels remained unchanged in both mouse strains in the liver and spleen (Figures 3^{m2} C and 3^{m2} D). Taken together these results indicate that signaling through both adaptor molecules, MyD88 and TRIF, is necessary to achieve hepcidin induction, suggesting that there may be hepcidin-independent pathways participating in the acute hypoferremic response in mice.

IL-6 production is suppressed in MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice, but the ability to induce hepcidin in response to IL-6 is retained. Since hepcidin elevation during inflammatory conditions has been shown to be mediated mainly by IL-6,[222] we examined whether IL-6 production stimulated by LPS in MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice was compromised and could thus explain the lack of hepcidin activation in these mice. We found that serum IL-6 levels, which peaked at 6 hours post-treatment in wild-type mice, were indeed severely impaired in both MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice (Figure

4^{m2} A), with the lowest levels being observed in MyD88^{-/-} mice. Next, to test whether MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice maintain the ability to elevate hepcidin in response to IL-6, we treated mice with recombinant mouse IL-6. As shown in Figures 4^{m2} B and 4^{m2} C, IL-6 treatment lead to a mild but significant decrease in circulating iron as well as induction of hepcidin in all mice strains, indicating that MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice retain the ability to regulate hepcidin levels in response to IL-6.

Suppression of the iron exporter ferroportin by LPS is independent of MyD88 and TRIF signaling. Ferroportin, which is most likely the only cellular iron exporter in mammals [129] also plays a major role during the hypoferremic response [320, 321, 322]. Ferroportin mRNA levels have been reported to be downregulated in macrophages during inflammation, therefore limiting iron efflux and increasing iron sequestration within macrophages [187, 334]. Thus, we measured ferroportin levels during the acute response to LPS in the spleen, a macrophage-rich organ that expresses high ferroportin levels [321]. Both wild-type and MyD88^{-/-} mice showed a sharp reduction of mRNA ferroportin expression between 1.5 and 12 hours after LPS treatment (Figure 5^{m2} A). Furthermore, ferroportin protein levels also decreased in the spleens of both wild-type and MyD88^{-/-} mice (Figure 5^{m2} B-D). To further investigate the requirement for TRIF signaling for ferroportin mRNA downregulation, we elicited TRIF signaling through TLR3 by treating wild-type and Trif^{Lps2/Lps2} mice with poly(I:C). As shown in Figure 5^{m2} E, both mouse strains were able to significantly downregulate ferroportin mRNA in the spleen 6 hours after poly(I:C) injection. Taken together, these results indicate that ferroportin downregulation during acute hypoferremia is independent from MyD88 or TRIF signaling.

Next, we measured iron concentrations in the spleen, which represents a major site of iron storage during inflammation [335]. As shown in Figure 5^{m2} F, iron levels significantly rose in wild-type and Trif^{Lps2/Lps2} mice at 12 and 24 hours after LPS injection, albeit to lower extent in Trif^{Lps2/Lps2} mice at 24 hours compared to wild-type mice, but remained unchanged in MyD88^{-/-} mice.

The hereditary hemochromatosis (HFE) gene is downregulated during the acute hypoferremic response without requiring MyD88 and TRIF signaling.

Extensive studies in the past have demonstrated that, at least in cell culture models, HFE[326, 327] is involved in cellular iron uptake - through regulation of transferrin receptor 1- (TfR1) mediated uptake of transferrin-bound iron,[336] as well as in iron release [337]. Since hypoferremia is associated with removal of iron from circulation, we reasoned that Hfe may participate in the development of hypoferremia by enhancing the ability of macrophages to take up iron via their interaction with TfR1. Thus, we investigated whether Hfe levels changed in the spleens of mice treated with LPS. We found that Hfe mRNA and protein levels in the spleen were significantly downregulated in both wild-type and MyD88^{-/-} mice (Figure 6^{m2} A and 6^{m2} B). Similarly, poly(I:C) treatment significantly reduced Hfe mRNA expression in the spleen of both wild-type and Trif^{Lps2/Lps2} mice (Figure 6^{m2} C). These results suggest that, similarly to ferroportin, Hfe downregulation during the acute hypoferremic response occurs independently of MyD88 and TRIF signaling pathways.

The reduction in circulating iron during the hypoferremic response is limited by basal iron levels but not by Hfe.

To further elucidate the potential role of Hfe during hypoferremia, we used Hfe^{-/-} mice and followed their response to LPS treatment. As shown in Figure 6^{m2} D, Hfe^{-/-} mice retained the ability to lower their circulating iron after LPS treatment, albeit their serum iron values were consistently more elevated than those found in wild-type mice measured at the same time-point. Because Hfe-deficient mice have higher basal levels of circulating iron than wild-type mice, we wondered whether the inability of Hfe^{-/-} mice to reduce serum iron to approach values seen in wild-type mice in response to LPS was due to their higher initial iron levels. To answer this question, we placed wild-type mice on an iron-enriched diet for 2 weeks and then treated them with LPS. Similarly to what we had observed in Hfe^{-/-} mice, iron-loaded wild-type mice were still able to significantly reduce serum iron levels. However, they consistently remained above levels observed in mice that were not iron loaded (Figure 6^{m2} D). Importantly, when data were analyzed

in terms of fold changes, the reduction of serum iron levels was indistinguishable among wild-type mice maintained on the standard diet, iron-loaded wild-type mice and Hfe^{-/-} mice (Figure 6^{m2} E). These results suggest that the initial, basal serum iron level rather than the absence of Hfe expression is the principal factor determining the differences observed between wild-type and Hfe^{-/-} mice.

MyD88 signaling is critical for the induction of the iron-siderophore-binding protein lipocalin 2. During bacterial infection, the mammalian spleen and macrophages synthesize abundant amounts of lipocalin 2 (Lcn2), an antimicrobial protein that has been shown to mediate an innate immune response to bacterial infection by sequestering circulating iron [328, 329]. To determine whether iron sequestration by Lcn2 may contribute to the rapid drop in serum iron observed during acute inflammation, we first measured splenic mRNA and serum protein levels of Lcn2 in LPS-treated wild-type and MyD88^{-/-} mice. We found that Lcn2 production upon LPS stimulation was severely impaired in MyD88-deficient mice, as shown in Figure 7^{m2} A and 7B, indicating that Lcn2 induction requires MyD88 signaling.

Next, we sought to evaluate the importance of Lcn2 in the acute hypoferremic response triggered by LPS by using Lcn2-deficient mice. As shown in Figure 7^{m2} C, serum iron levels in Lcn2^{-/-} mice were indistinguishable from wild-type mice treated with LPS at each time-point examined. Thus, Lcn2 is not involved in the acute hypoferremic response elicited by LPS.

Taken together, these results show that Lcn2 is regulated by a pathway largely dependent on MyD88 signaling. However, in the absence of bacterial siderophores, Lcn2 does not participate in iron sequestration during the acute hypoferremic response elicited by LPS.

Discussion

The current studies were undertaken to clarify the role played by the TLR signal adaptor molecules MyD88 and TRIF in regulating the coordinated expression of genes involved in iron metabolism during the acute hypoferremic response. We show that signaling through TLRs leads to acute hypoferremia and that mice with targeted disruption of MyD88 were unable to maintain this hypoferremic response. Furthermore, MyD88^{-/-} mice manifested impairment in appropriately regulating the expression of hepcidin and lipocalin 2 as well as in the ability to store iron in the spleen during hypoferremia.

Iron uptake – HFE-TfR1 interaction. We show for the first time that Hfe expression in the spleen is downregulated during the acute hypoferremic response in vivo. Earlier studies have shown that Hfe and transferrin compete for the same binding sites on TfR1,[337, 338] and that the expression of Hfe in macrophages and monocytes inhibit iron uptake, an effect that was shown to depend on the ability of Hfe to bind to TfR1.[337] While it is difficult to extrapolate these previous observations to in vivo systemic effects during inflammation, reduction of Hfe levels during hypoferremia may allow for more iron-bound transferrin to associate with TfR1, thereby enhancing the iron uptake capability of the cells. Thus, our results may suggest a novel mechanism, Hfe suppression, by which macrophages may enhance transferrin-mediated iron uptake during the hypoferremic response. The proposed role for Hfe in regulating in vivo iron uptake is in line with recent studies showing that Hfe expression impairs iron uptake in erythroid cells [339]. Further investigations are needed to understand whether the expression levels of Hfe can affect iron uptake via TfR1 in macrophages in response to inflammation.

TfR1 on the other hand has been shown to be upregulated through a pathway dependent on NF- κ B induction in the early phases of hypoferremia,[319] and downregulated at later stages by proinflammatory cytokines [318, 340]. Since Hfe downregulation was also observed in the MyD88 mice, which have impaired NF- κ B activation and induction of NF- κ B-dependent proinflammatory cytokines,[341] this

suggests that Hfe suppression in response to inflammation is MyD88-independent. We also found that Hfe downregulation is TRIF-independent, because $\text{Trif}^{\text{Lps2/Lps2}}$ mice treated with poly(I:C) also downregulate Hfe expression in the spleen. Ultimately, the coordinated upregulation of TfR1 [319] and downregulation of Hfe may contribute to the early development of hypoferrremia by increasing transferrin-mediated iron uptake from the blood.

In our study we found that circulating iron dropped significantly from basal levels in $\text{Hfe}^{-/-}$ mice treated with LPS. However, at each time-point examined, $\text{Hfe}^{-/-}$ mice showed markedly higher serum iron levels when compared to wild-type mice. Similar outcome could be reproduced when wild-type mice were fed an iron-enriched diet, indicating that the reduction in circulating iron during the hypoferrremic response is limited by the initial basal iron levels rather than by the presence or absence of Hfe. These findings may help explain inconsistencies between previously reported studies investigating the role of Hfe during acute hypoferrremia [284, 307, 342, 343], since the severity of iron accumulation in $\text{Hfe}^{-/-}$ mice has been shown to differ considerably with the genetic background [284, 344] and may additionally be affected by the standard commercial diet used [222]. Furthermore, our results suggest that only a limited amount of iron can be removed from the circulation during the immediate acute hypoferrremic response.

Iron storage and sequestration. The inability to maintain the hypoferrremic response in $\text{MyD88}^{-/-}$ mice may be associated with failure to appropriately store iron in macrophages, judging from the differences observed in iron accumulation in the spleen, a response that we found to be dependent on MyD88 signaling.

Lcn2 is an important protein involved in iron sequestration and is rapidly induced upon TLR activation by a pathway that we show here to be dependent on MyD88 signaling. While iron sequestration by Lcn2 has been shown to play an important role in limiting bacterial growth during the innate immune response,[328] here we show that the hypoferrremic response triggered by LPS is very similar in Lcn2 -deficient and wild-type mice. This result suggests that Lcn2 action during infection is directly related

to its ability to bind iron-loaded bacterial siderophores and that, in contrast, binding of Lcn2 to endogenous siderophores [345, 346] does not contribute to iron removal from the circulation. The importance of sequestering iron-siderophore complexes to limit iron availability to invading pathogens during the initial phase of the innate immunity response is highlighted by the finding that mice deficient in Lcn2 show substantially accelerated lethality when infected with *E. coli* [328].

Iron release – Fpn1-Hamp axis. In this study we found that, unlike wild-type mice, both MyD88- and TRIF-deficient mice were unable to upregulate hepcidin expression upon stimulation with LPS but yet retained the ability to induce hepcidin when injected with recombinant IL-6. Thus, the lack of hepcidin induction in the mutant mice seems to be attributable to the severe impairment in cytokine production, notably IL-6 in MyD88-deficient mice, as shown in this and previous studies [341]. Similarly, previous studies reported that TRIF^{-/-} mice show impaired inflammatory cytokine production after LPS stimulation, and it has therefore been proposed that cooperation between the MyD88-dependent and MyD88-independent (TRIF-dependent) signaling pathways is required for TLR4-mediated inflammatory cytokine production [347].

While poly(I:C) treatment did not induce hepcidin expression in the liver or spleen in wild-type mice, splenic hepcidin has been shown to be induced in fish (rainbow trout) [348]. Despite the lack of hepcidin induction, TRIF-deficient mice developed acute hypoferrremia in response to LPS and poly(I:C). These finding further supports previous studies [284] suggesting that hepcidin-independent mechanisms likely contribute to the development of acute hypoferrremia induced by TLR agonists.

Contrary to hepcidin regulation, ferroportin suppression during the acute hypoferrremic response occurs largely independently of MyD88 and TRIF signaling. In macrophages, ferroportin expression is regulated at several levels, including transcriptional regulation, [322, 349, 350, 351] translational regulation,[199, 321, 352] and posttranslational regulation by hepcidin [199] Earlier studies have shown that ferroportin expression in macrophages is regulated at the level of mRNA translation

during inflammation. This has been reported to occur by a mechanism involving iron regulatory protein (IRP) 1 binding to the iron-responsive element (IRE) [334, 353] found at the 5' site of the ferroportin transcript [322]. The IRP1/IRE translation block of ferroportin was found to be mediated by nitric oxide (NO), [353] an important physiological regulator produced by macrophages during inflammation. However, ferritin genes, which also have an IRE located at the 5' site, are regulated in the opposite direction by NO, that is, ferritin synthesis substantially increases and leads to increased sequestration of intracellular iron in ferritin [354]. Thus, it is not clear how the IRP1/IRE mechanism may contribute to ferroportin mRNA repression during the initial phase of the inflammatory response. Nevertheless, once intracellular iron rises, deactivation of IRPs by iron would be expected to promote translation of ferroportin, and it is at this later phase of the inflammatory response that hepcidin may be envisioned to play a critical role in maintaining ferroportin repression [199].

Ultimately, as with Hfe, the ability to rapidly downregulate ferroportin mRNA levels, which is retained in both MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice, may contribute to the initial drop in serum iron levels seen in these mice.

MyD88-dependent and MyD88-independent regulation of iron homeostasis during inflammation. The work presented here suggests that the acute hypoferremic response may be regulated in at least two phases. The immediate phase allows for a rapid decrease in circulating iron and, because is also observed in MyD88^{-/-} mice, it does not depend on NF-κB activation (MyD88- and TRIF-independent) and subsequent pro-inflammatory cytokine production. Iron removal from the circulation during this early phase may be mediated by the coordinated control of augmented cellular iron uptake via TfR1 due to Hfe downregulation, and limited iron efflux through direct suppression of ferroportin expression. Accordingly, suppression of Hfe and ferroportin expression was also observed in MyD88^{-/-} mice. However, because hypoferremia is not maintained in MyD88^{-/-} mice compared to wild-type mice these reductions are not sufficient to sustain the hypoferremic response.

The second phase is largely MyD88- and TRIF-dependent and requires NF- κ B activation. Binding of LPS to TLR4 initially transmits signals for the early-phase activation of NF- κ B by recruiting MyD88 (MyD88-dependent pathway). The TLR4-LPS complex is then internalized and retained in the endosome, where it triggers signal transduction by recruiting TRIF, which leads to the activation of late-phase NF- κ B and IRF3 for the induction of type I interferon (TRIF-dependent pathway) [297]. Both early- and late-phase activation of NF- κ B is required for the induction of inflammatory cytokines, e.g. IL-6 and TNF- α , which in turn activate the expression of genes involved in the regulation of iron export (hepcidin) and sequestration (lipocalin 2). Binding of poly(I:C) to TLR3 activates the TRIF-dependent pathway to induce type I interferon and pro-inflammatory cytokines.

Additional removal of circulating siderophore-loaded iron from invading pathogens may ensue by compatible binding of bacterial siderophores to Lcn2, and further repression of ferroportin protein can be achieved through hepcidin induction. Progressive accumulation of iron within macrophages becomes detectable by 12h post LPS injection, as measured in spleen samples using atomic absorption spectroscopy. When sustained over long periods of time, this response may lead to the development of functional iron deficiency with consequent limited erythropoiesis as seen in ACD.

In summary, our study provides evidence indicating that it may be possible to interfere with the progression of hypoferrremia by suppressing TLR-induced inflammatory pathways. We propose that targeting specific TLR signaling pathways by affecting the function of adapter molecules may provide new and complementary strategies to counteract iron sequestration within macrophages triggered by immune system activation.

Acknowledgments:

We acknowledge the help of Dr. Peter P. Liu from the Heart and Stroke/Richard Lewar Centre of Excellence, University of Toronto, Canada with the MyD88^{-/-} mouse strain and Marco Constante from the Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain for critically reviewing the manuscript.

Figures

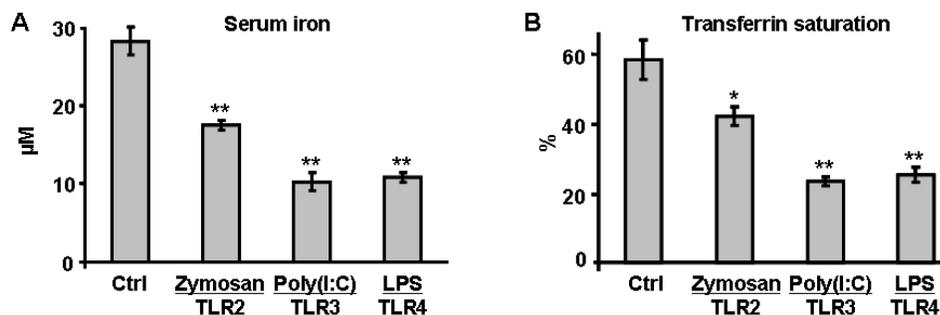


Figure 1m2. Distinct TLR ligands trigger acute hypoferremia in mice: (A) Serum iron levels and (B) transferrin saturation were measured in wild-type mice 6 hours after treatment with Zymosan, Poly(I:C) and LPS. Data are presented as mean \pm SEM with $n=6$ mice/group. Results are representative of two similar experiments performed. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ vs. saline-treated mice (Ctrl).

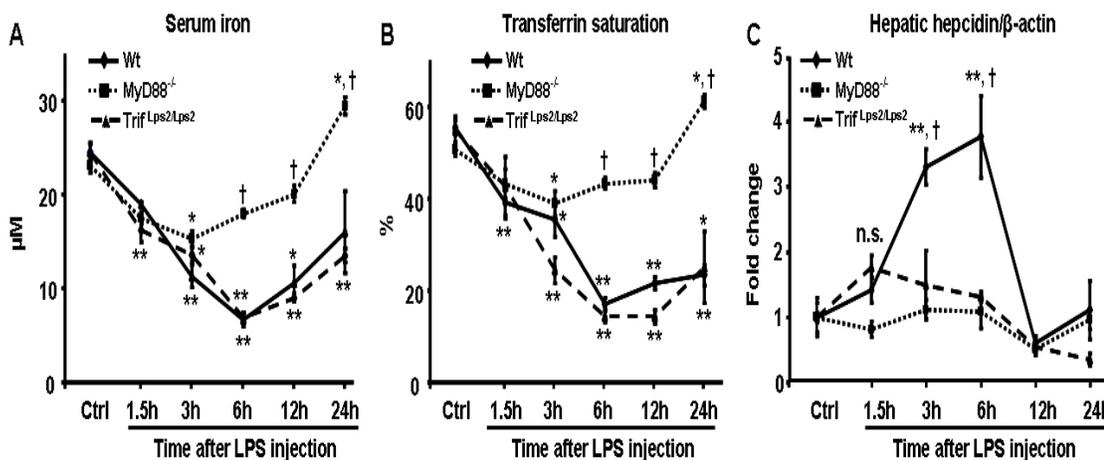


Figure 2m2. MyD88-deficient mice are unable to sustain the acute hypoferremic response induced by LPS: (A) Serum iron levels; (B) transferrin saturation and (C) hepatic hepcidin mRNA levels in wild-type (Wt), MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice measured 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours after LPS or saline (Ctrl) injection. Data are presented as mean \pm SEM with $n=4$ mice/group. Results are representative of three independent experiments performed. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ vs. saline-treated mice (Ctrl); † $P < 0.001$ MyD88^{-/-} vs. Wt or Trif^{Lps2/Lps2} mice; n.s. – not significant.

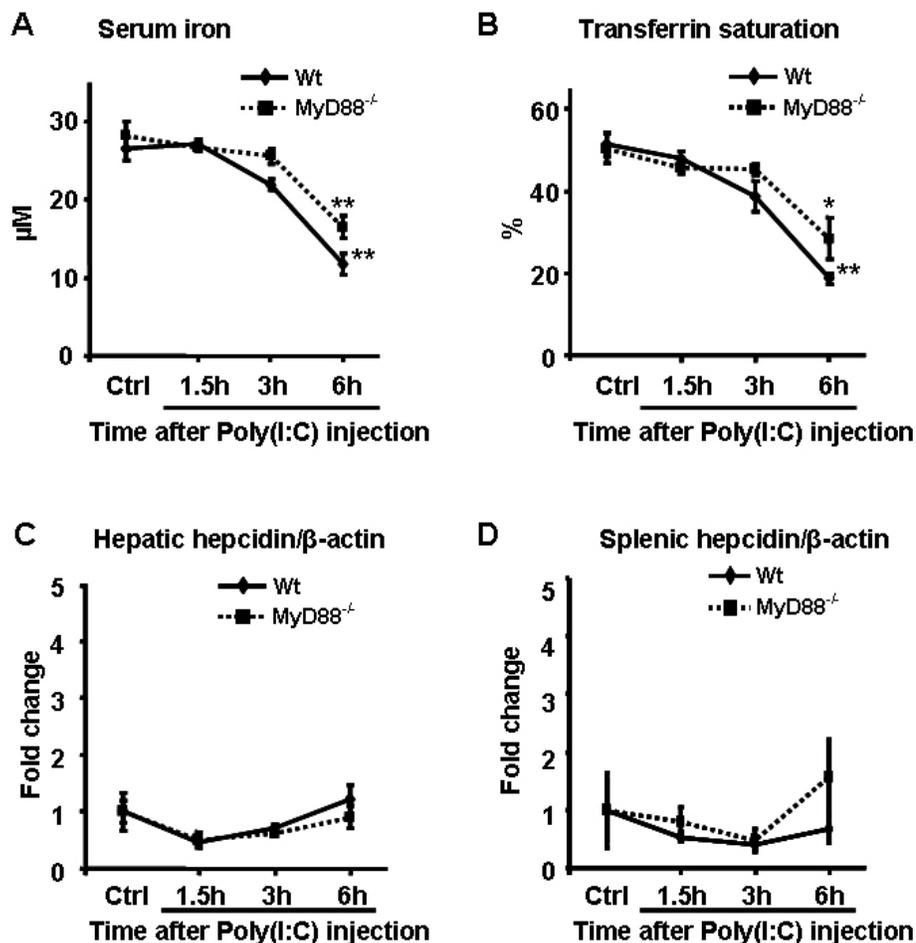


Figure 3m2. TLR3 activation induces acute hypoferremia in wild-type and MyD88^{-/-} mice without hepcidin induction: (A) Serum iron levels, (B) transferrin saturation, and hepcidin mRNA levels in (C) liver and (D) spleen of wild-type (Wt) and MyD88^{-/-} mice measured 1,5, 3 and 6 hours after saline (Ctrl) or poly(I:C) treatment). Data are presented as mean \pm SEM with n=4 mice/group. Results are representative of three similar experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ poly(I:C)-treated vs. saline-treated mice (Ctrl).

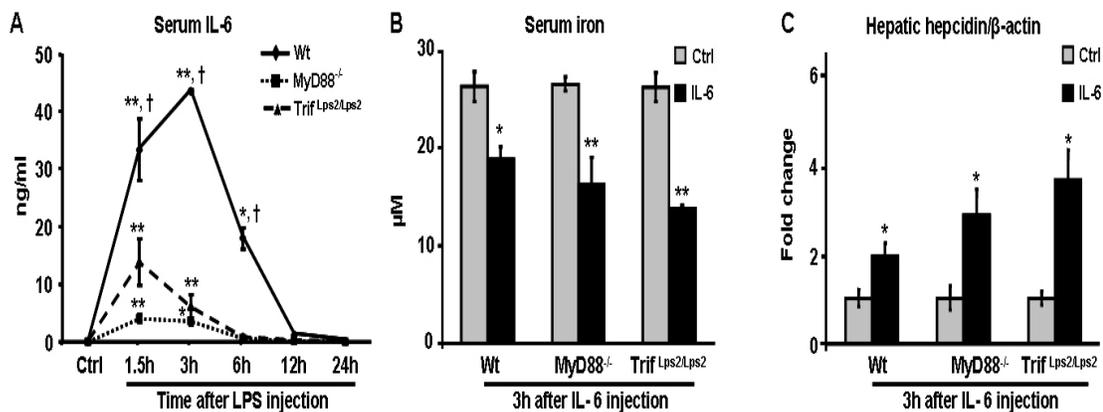


Figure 4 m2. MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice fail to produce IL-6 following LPS treatment but retain the ability to respond to IL-6 stimulation. (A) IL-6 serum levels in wild-type (Wt), MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice measured 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours after LPS or saline (Ctrl) injection. Data are presented as mean \pm SEM with n=4 mice/group. Results are representative of three independent experiments performed. (B) Serum iron levels and (C) hepcidin mRNA levels in the liver of wild-type (Wt), MyD88^{-/-} and Trif^{Lps2/Lps2} mice measured 3 hours after saline (Ctrl) or IL-6 treatment. Data are presented as mean \pm SEM with n=4 mice/group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ LPS or IL-6 treatments vs. saline-treated mice (Ctrl); † $P < 0.05$ Wt vs. MyD88^{-/-} or Trif^{Lps2/Lps2}

mice.

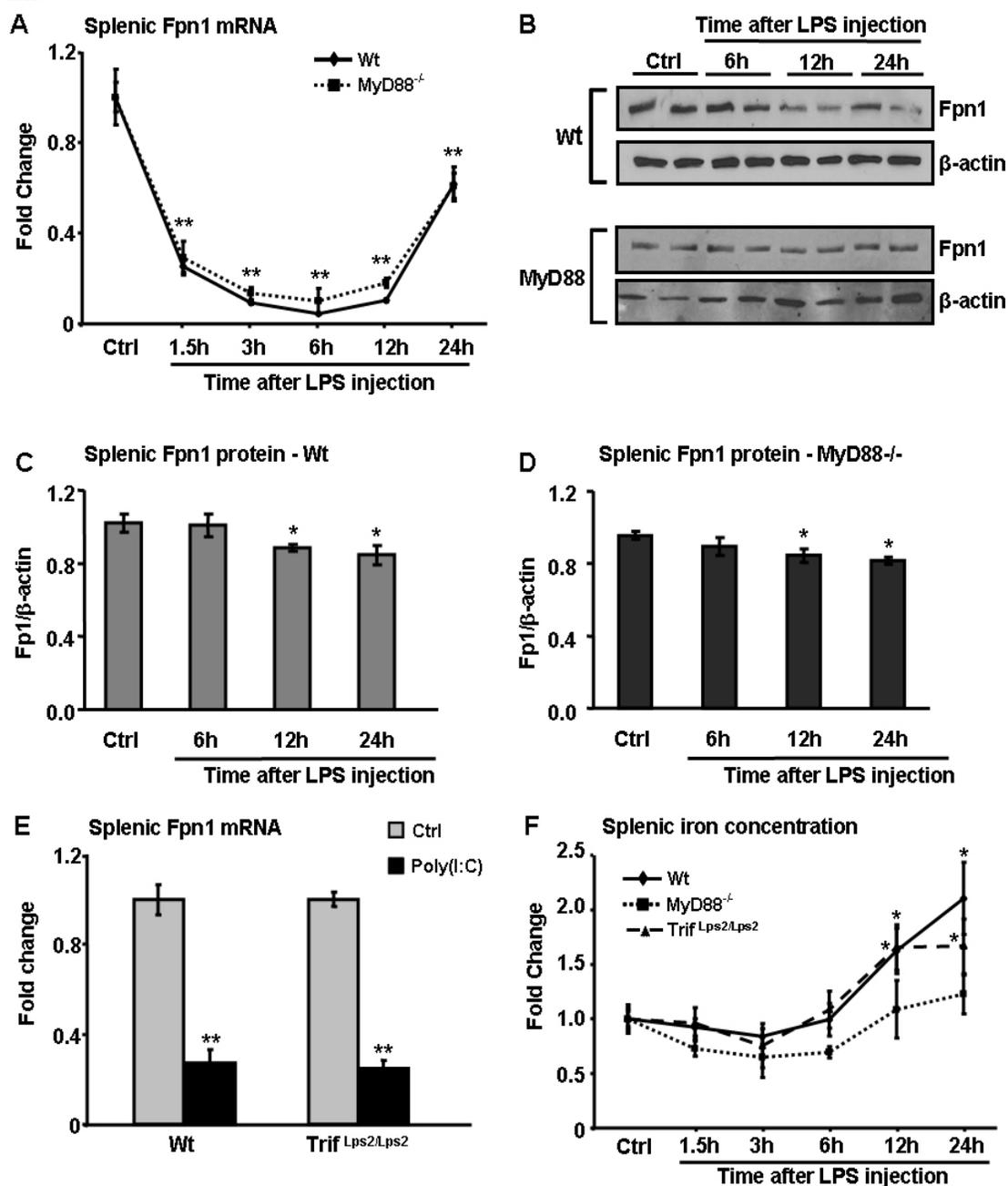


Figure 5m2. MyD88 and TRIF signaling are not required for ferroportin downregulation, but MyD88 is critical for iron storage in the spleen. (A) Ferroportin (Fpn1) mRNA and (B) Fpn1 protein levels in the spleen of wild-type and MyD88^{-/-} mice treated with saline (Ctrl) and LPS. Fpn1 protein expression levels were calculated relative to β -actin in (C) wild-type and (D) MyD88^{-/-} mice using western blots from two independent experiments (n=4 per time point). **P* < 0.05 and ***P* < 0.001 vs. saline-treated mice (Ctrl). (E) Ferroportin (Fpn1) mRNA levels in the spleen of wild-type and Trif^{Lps2/Lps2} mice 6 hours after treatment with saline (Ctrl) and poly(I:C). Data are presented as mean \pm SEM with n=4 mice/group. Results are representative of three similar experiments. ***P* < 0.001 LPS or poly(I:C) treatments vs. saline-treated mice (Ctrl). (F) Splenic iron concentration in wild-type (Wt), Trif^{Lps2/Lps2} and MyD88^{-/-} mice measured 12 and 24 hours after LPS or saline (Ctrl) injection. Data are presented as mean \pm SEM with n=4 mice/group. Results are representative of three similar experiments. **P* < 0.05 vs. saline-treated mice (Ctrl).

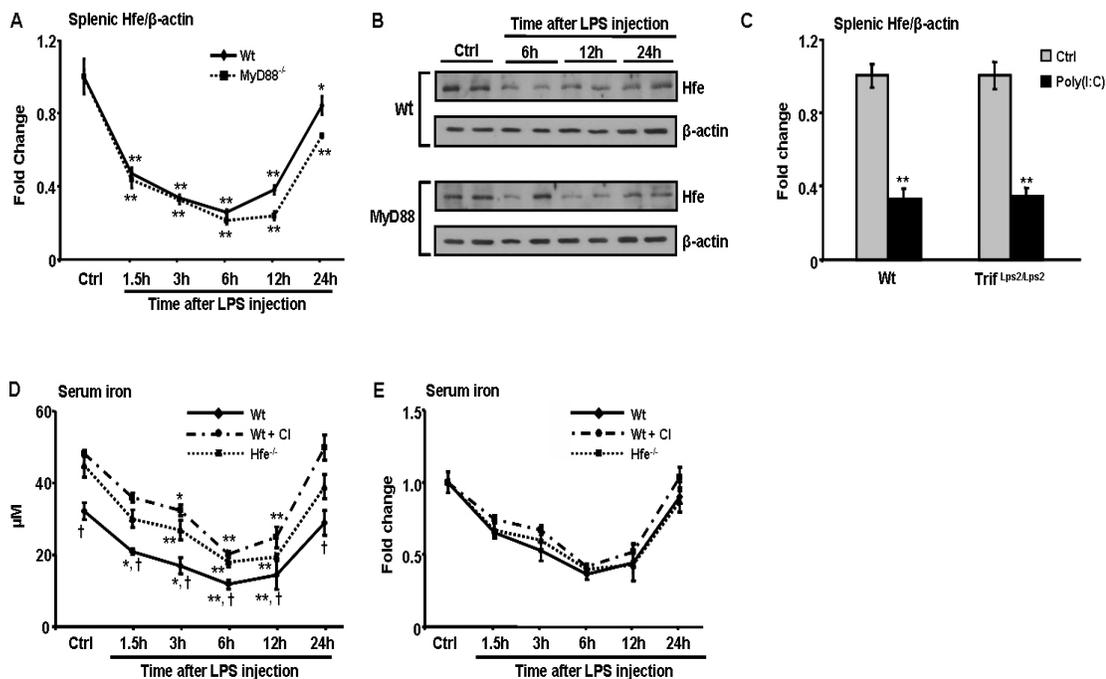


Figure 6m2. The role of HFE in the hypoferremic response. (A) Hfe mRNA and (B) Hfe protein levels in the spleen of wild-type (Wt) and MyD88^{-/-} mice treated with saline (Ctrl) and LPS. (C) Hfe mRNA levels in the spleen of wild-type (Wt) and Trif^{Lps2/Lps2} mice measured 6 hours after poly(I:C) treatment. Data are presented as mean ± SEM with n=4 mice/group. Results are representative of three independent experiments. **P* < 0.05 and ***P* < 0.001 LPS or poly(I:C) vs. saline treated mice (Ctrl). (D and E) Serum iron levels expressed in (D) μM and in (E) fold change in wild-type (Wt) and Hfe^{-/-} mice fed a standard diet and wild-type mice fed a standard diet supplemented with 2,5% carbonyl iron (Wt + CI) measured at 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours after LPS (0.1 μg/g) or saline (Ctrl) injection. Data are presented as mean ± SEM with n=6 mice/group. Results are representative of two similar experiments. **P* < 0.05 and ***P* < 0.001 LPS vs. saline-treated mice (Ctrl); †*P* < 0.05 Wt vs. Wt + CI or Hfe^{-/-} mice.

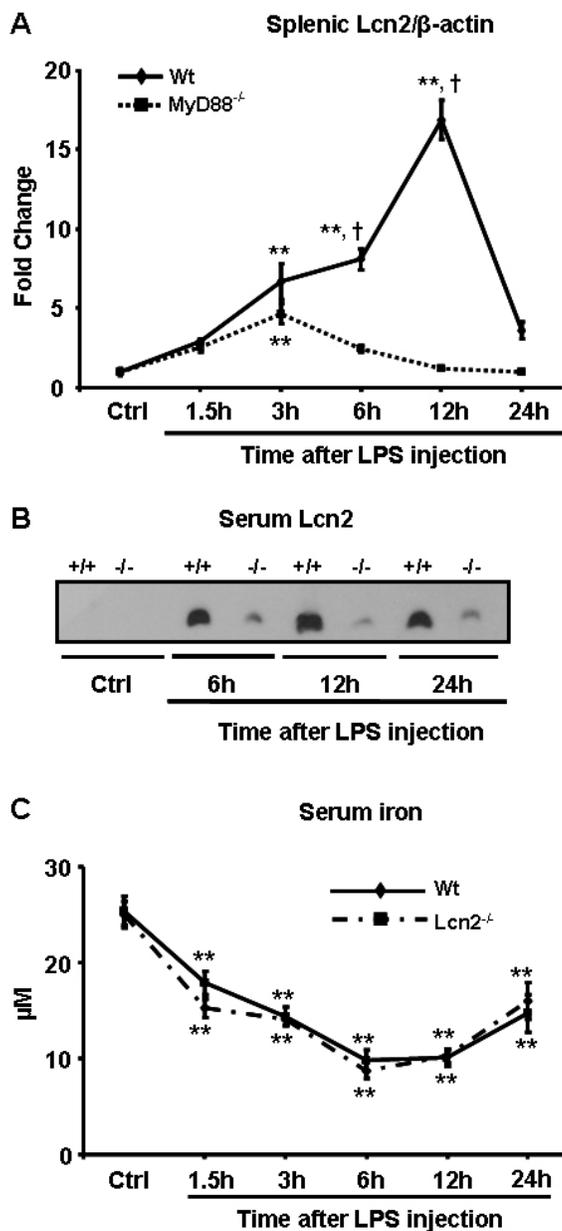


Figure 7m2. The role of Lcn2 in the hypoferremic response. (A) Lcn2 mRNA in the spleen and (B) Lcn2 protein levels in the serum of wild-type (Wt or +/+) and MyD88^{-/-} (-/-) mice after LPS treatment. Data are presented as mean \pm SEM with n=4 mice/group. Results are representative of three independent experiments. (C) Serum iron levels in wild-type (Wt) and Lcn2^{-/-} mice after LPS treatment. Data are presented as mean \pm SEM with n=6 mice/group. * P < 0.05 and ** P < 0.001 LPS vs. saline-treated mice (Ctrl). † P < 0.05 Wt vs. MyD88^{-/-} mice.

Section 4. MANUSCRIT 3

Defective iron-sensing and hepcidin regulation in MyD88 knockout mice
links MyD88 adaptor protein to Smad4

Manuscript in preparation

Antonio Layoun^{1*}, Gabriela Fragoso^{1*}, Annie Calvé¹, Marco Constante¹, Macha¹
Samba¹, M.M. Santos^{1,2}

¹Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Manuela Santos, Centre de recherche, CHUM – Hôpital Notre-Dame, Pav. De Sève Y5625, 1560 rue Sherbrooke est, Montréal (Québec) H2L 4M1, Canada Tel: + 1 (514) 890-8000 ext. 28928 Fax: + 1 (514) 412-7661.

Contribution des auteurs

A. Layoun et G. Fragoso ont participé également à la réalisation des travaux expérimentaux et à la rédaction de cet article.

A. Calvé, M. Constante et M. Samba ont contribué à l'analyse expérimentale.

M.M.Santos a supervisé l'ensemble de l'étude et est responsable de la rédaction de cet article.

Abstract

Iron homeostasis is tightly regulated such as to provide virtually all cells in the body with this essential element, particularly red blood cells, while at the same time defending against its toxicity, which is well manifested in the iron overload disease hereditary hemochromatosis and in transfusional iron overload[355]. Central to the control of the amount of iron absorbed daily from the diet is the peptide hormone hepcidin[356]. Here we show that, unexpectedly, mice lacking myeloid differential factor 88 (MyD88) accumulate significantly more iron in their livers than wild-type counterparts in response to iron loading, and this independently on the expression of well-known molecules relying on MyD88 function, namely toll-like receptors (TLRs). We further show that MyD88 interacts with Smad4 and that this interaction is critical for hepcidin induction through the Smad4 iron-sensing pathway. Our results reveal a previously unknown link between MyD88 and Smad4 and provide new mechanistic insights into the regulation of hepcidin through the iron-sensing pathway in iron overload.

Introduction

Iron is an oligoelement necessary for normal functioning of all body cells. In humans, although it is present in very small quantity, iron plays an essential role in many biological functions. This metal is an essential component of proteins and enzymes involved in diverse metabolic processes such as oxygen transport, DNA synthesis and energy production [357]. It's also essential for the regulation of cell growth and differentiation [358]. However, because iron can participate in the generation of free radicals, it can be also harmful. Thus, the level of iron in the body must be well regulated. Hepcidin, a 25 amino acid peptide mainly produced by hepatocytes, is thought to be the major key regulator of iron metabolism [190]. Hepcidin binds to ferroportin, the major cellular iron exporter, internalises it within the cell and induces ferroportin degradation, inhibiting iron recycling and hence availability for erythropoiesis [199].

Erythropoietic activity, host defense and multiple signals reflecting systemic iron stores and concentrations converge to regulate hepcidin production and thereby affect iron homeostasis [171]. During infections, microbes use multiple complex mechanisms to acquire iron from their host, while hosts resist infection by sequestering iron in macrophages, thereby starving microbes of iron and slowing their multiplication within the host [238]. Recently, we found that MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) adaptor molecule is required for hepcidin induction in macrophages subsequent to Toll-like receptors (TLRs) stimulation with their corresponding pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [285]. Moreover, we have shown that early changes in plasma iron during inflammation are independent of changes in hepcidin expression and that TLRs signal adaptor protein MyD88 is required to sustain acute hypoferremic response in mice [286].

On the other hand, we noticed that MyD88^{-/-} mice present higher levels of iron and its storage protein ferritin in their liver when compared to wild type. Therefore, we questioned whether MyD88 could play a role in iron sensing. Signaling through bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) is considered to be the fundamental pathway

regulating hepcidin levels in response to intracellular and extracellular iron concentrations [359]. In the liver, BMP6 binds to BMP receptor and interacts with hemojuvelin (HJV), a BMPRII co-receptor involved in iron regulation, which will then activate the SMAD transcriptional system [360]. Subsequently, phosphorylated SMAD 1/5/8 forms a complex with SMAD4 and translocates to the nucleus to bind directly the BMP-responsive elements (BMP-RE) on hepcidin promoter, thus inducing hepcidin transcription [214, 361, 362]. Therefore, disruption in BMP6 signaling reduces hepcidin expression and causes severe iron overload in mice [363].

In in this study we further investigate the potential role of MyD88 in iron sensing by analysing iron metabolism in MyD88-deficient mice in response to iron overloading.

Materials and Methods

Animals

C57BL/6 (B6) wild-type (Wt) female mice aged 6-8 weeks were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). TRIF-deficient mice (C57BL/6J-Ticam1Lps2/J; TrifLPS2/LPS2), Tlr2tm1Kir/J, Tlr3tm1Flv/J (all B6 background) and the C3H substrains, C3H/HeOuJ (wild-type) and C3H/HeJ (Tlr4-deficient; Tlr4d) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). MyD88^{-/-} mice (B6 background), kindly provided by Dr. Shizuo Akira (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, and Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan), were maintained as described[328, 330]. The animals used in the experiments were female, unless otherwise indicated, and were permanently housed under specific pathogen-free conditions.

Animal treatments

Control mice were given a commercial diet containing (Teklad Global 18% protein rodent diet; Harlan Teklad, Madison, WI). Dietary iron overload was produced by giving mice the same commercial diet supplemented with 25 g per kilogram carbonyl iron (2.5% wt/wt carbonyl iron; Sigma-Aldrich) for 2 weeks[302]. For acute iron administration experiments, mice received 2 mg of elemental iron per kg mouse weight as iron sulphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) by oral gavage 5 hours prior to sacrifice [364].

Hematologic measurements and transferrin saturation

Red blood cell (RBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), and mean corpuscular volume (MCV) were measured with an automated cell counter calibrated for murine samples (ABC vet counter; ABX Hématologie, Montpellier, France). Serum iron was assessed by colorimetric assay with the Kodak Ektachem DT60 system (Johnson & Johnson, Ortho Clinical Diagnostics, Mississauga, ON).

Measurement of tissue iron concentration

Liver iron concentrations were assessed by acid digestion of tissue samples, followed by iron quantification with atomic absorption spectroscopy[299].

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, ON), and reverse transcription was performed with the Omniscript RT kit (QIAGEN, Mississauga, ON). mRNA expression levels of genes of interest were measured by real-time PCR in a Rotor Gene 3000 Real Time DNA Detection System (Montreal Biotech, Kirkland, QC) with QuantiTect SYBRGreen I PCR kits (QIAGEN, Mississauga, ON) as described[365]. The primers used are presented in the **Supplementary table 1**. Expression levels were normalized to the housekeeping gene β -actin (*Actb*) unless otherwise indicated.

Serum ferritin ELISA assay

Ferritin was measured in serum with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit as per manufacturer's instructions (Kamiya Biomedical, Seattle).

Histology

Liver tissue sections were stained with Perls' Prussian blue for ferric iron detection (iron stain kit; Sigma Immunochemicals).

Cell culture

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells (ATCC, Manassas, VA) and MyD88 KO HEK293 cells (HEK293-IA3), a kind gift from G. Stark (Department of Molecular Genetics, Lerner Research Institute, Cleveland, OH)[366], were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM; Wisent Inc., Montreal, QC). Huh7 human hepatoma cell lines (ATCC) were maintained in Dulbecco's modification eagle's essential medium (DMEM; Wisent Inc.). Cell lines were supplemented with

10% Fetal Bovine Serum (FBS; Wisent Inc.), and penicillin/streptomycin (Wisent Inc.) and were incubated at 37⁰C and 5% CO₂.

Plasmids

Plasmid 12287 (pCMV-HA-MyD88) and plasmid 12627 (pRK-Smad4-Flag) were purchased through an MTA agreement with Addgene (Cambridge, MA). The wild-type (-1234/+73) *HAMP* promoter reporter construct HAMP-Luc used in the present study was previously described[367]. The HAMP-Luc Δ BMP-RE1 construct, in which the BMP-RE1 site was mutated from GGCGCC to AGAACC[232], was obtained using the QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and the mutations were confirmed by direct sequencing.

Transfection and co-immunoprecipitation assays

HEK293 IA3, and Huh7 cells were transiently transfected using LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) as recommended by the manufacturer with indicated plasmids. The total amount of DNA was kept constant. For assessment of SMAD4 and MyD88 interactions, MyD88 knockout HEK293-IA3 cells were used. Twenty-four hours after transfection, cells were lysed in 1 mL RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholic acid 0.1 % SDS and protease inhibitor cocktail (Complete Mini) (Roche)). Cell lysates were then incubated with the indicated antibodies (anti-Flag or anti-HA antibody; Genscript, Piscataway, NJ, USA), after which EZview Red Protein A Affinity Gel (Sigma) was added. For control reactions, mouse IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used. The immune complexes were precipitated and washed thoroughly with RIPA buffer. Immunoprecipitated proteins were then eluted by adding sample buffer and were subsequently fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and visualized by immunoblotting using anti-Flag and anti-HA antibodies.

SDS–PAGE and Western blot analysis

Liver nuclear extracts were prepared with Nuclear Extract Kits (Active Motif, Carlsbad, CA), were separated on 10% SDS–polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). The membranes were immunoblotted with the following antibodies: phospho-Smad1/5/8, Smad1, Smad4, MyD88 and β -tubulin (Cell Signaling, Danvers, MA) and β -actin (Abcam, Cambridge, MA). As a secondary antibody, anti–rabbit IgG (Cell Signaling) or anti–mouse IgG (GE Healthcare) were used. Antigen-antibody complexes were visualized with the ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

Reporter assay

Huh7 cells were seeded on 24-well plates and were transiently cotransfected by lipofection with *Renilla* reporter and *Firefly* reporter under the 1.3 kb of the hepcidin promoter and MyD88. The total amounts of DNA were kept constant by supplementation with an empty vector (pCMV-HA). After 24h cells were harvested and luciferase activity was measured by using the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Mississauga, ON, Canada) with a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). Data were normalized for transfection efficiency by dividing *Firefly* by *Renilla* luciferase activity.

Statistical analysis

All statistics were calculated with Prism software (GraphPad, San Diego, CA), with a pre-specified significant *P* value of 0.05. Multiple comparisons were evaluated statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Results

Myeloid differential factor 88 (MyD88) is a universal adapter protein used by almost all Toll-like receptors (TLRs), except TLR3 that uses the TRIF adapter

exclusively, to activate the transcription factor NF- κ B [368]. We have previously reported that mice deficient in MyD88, unlike Trif-deficient mice, are unable to maintain LPS-induced acute hypoferremic response as they fail to divert iron from the circulation into the spleen [286]. To further investigate the possible involvement of MyD88 in iron metabolism we first assessed iron levels in the liver, the major iron storage organ in the body, in MyD88-deficient mice. Compared to wild-type (Wt) and Trif-deficient mice, used as controls, MyD88^{-/-} animals present consistently higher iron concentrations in the liver (Fig. 1m3a). In addition, MyD88^{-/-} mice also have about twice the levels of serum ferritin seen in Wt mice (Fig. 1m3b), and higher levels of hepatic H-ferritin protein (Supplementary Fig. 1m3a), further confirming that MyD88 deficiency results in elevated liver iron storage. The increased iron concentration in MyD88^{-/-} livers is not due to altered erythropoiesis or circulating iron, as erythroid parameters and serum iron levels in MyD88^{-/-} mice are similar to those in Wt and Trif-deficient mice (Fig. 1m3c and Supplementary Fig. 1m3b). Instead we hypothesized that MyD88 deficiency might impact on the ability to regulate the amount of iron obtained from the diet and consequent storage of the excess iron in the liver. To test this hypothesis, mice were challenged with an iron-enriched diet for 2 weeks to mimic chronic iron overload. As measured by atomic absorption spectrometry, this treatment results in a 5.6-fold increase of iron accumulation in the livers of MyD88^{-/-} mice compared to the 3.5-fold increase seen in Wt mice, (Fig. 1m3d) and was further confirmed by Perls' staining for ferric iron in liver samples (Fig. 1m3e). In contrast, iron levels in the spleen of iron-loaded MyD88^{-/-} mice are similar to Wt mice (Supplementary Fig. 1m3c). These results imply that MyD88^{-/-} mice are unable to appropriately regulate intestinal iron absorption. Therefore we next assessed the expression levels of the master regulator of iron absorption, hepcidin[356]. As seen in Fig. 1m3f, albeit able to significantly increase their hepcidin mRNA expression in the liver upon chronic dietary iron-loading, MyD88^{-/-} mice have manifestly lower levels of hepcidin than iron-loaded Wt mice. Similar results were obtained when MyD88^{-/-} mice were challenged with acute iron overload [369, 370] through the administration of one single dose of iron sulfate by oral gavage. Despite a significant increase of circulating

iron (Supplementary Fig. 1m3d-e), hepcidin induction was again significantly lower in MyD88^{-/-} compared to Wt mice (Supplementary Fig. 1m3f).

Having established that MyD88-deficient mice have a limited ability to down-regulate iron absorption when iron-challenged, we next investigated whether the impact of MyD88 on hepcidin regulation is dependent on signaling through upstream Toll-like receptors (TLRs). To this end, we tested mice deficient for TLRs that signal through the MyD88 (Tlr2^{-/-}), through Trif (Tlr3^{-/-}), and through both, the MyD88 and Trif pathways (Tlr4-deficient or Tlr4d). Mice deficient in Tlr2, Tlr3 and Tlr4, contrary to MyD88^{-/-} mice, respond very similarly to Wt mice when challenged with the iron-enriched diet, both in terms of iron accumulation in the liver (Fig. 1m3g), as well as hepcidin mRNA induction (Fig. 1m3h), ruling out a possible role for TLRs in iron-sensing.

Altogether, our data demonstrate that mice lacking functional MyD88 adaptor molecules present an insufficient hepcidin induction in response to chronic or acute iron-overloading, and as such a defect in the regulation of intestinal iron absorption, most likely due to deficient iron-sensing.

In vivo, iron loading induces the expression of Bmp6 mRNA in the liver [364], believed to be the very initial step in the activation of the Bmp6/Smad4 signaling cascade for hepcidin induction in response to iron overloading [371]. Thus, we next sought to understand whether Bmp6 activation was compromised in MyD88^{-/-} mice. Liver Bmp6 mRNA expression is induced by iron both in Wt and MyD88^{-/-} mice, and it is even higher in iron-loaded MyD88^{-/-} mice, demonstrating that the absence of MyD88 does not affect the ability of the knockout mice to induce Bmp6 (Fig. 2m3a). However, this induction is not accompanied by the expected rise in hepcidin, and consequently the ratio between Hepcidin (Hamp) mRNA and Bmp6 mRNA, which is unchanged in Wt mice, remains considerably lower in MyD88^{-/-} mice compared to Wt mice (Fig. 2 m3b), indicating a defect in the downstream signaling transmission initiated by Bmp6. Measurements of the mRNA levels of Atoh8 and Id1, two genes shown to be induced by iron through the Bmp6/Smad4 pathway[364], further

reinforced the idea that the main defect in MyD88^{-/-} mice resides in the Bmp6/Smad4 down-stream signaling pathway of targeted genes (Fig. 2m3c-d).

Bmp6 signals through phosphorylation of a subset of Smad proteins (Smads 1, 5, and 8) [372], followed by translocation of the phosphorylated complexes into the nucleus where they regulate the transcription of specific target genes, including hepcidin [373]. We next analyzed phosphorylation levels of Smad1/5/8 in liver nuclear extracts from dietary iron-loaded MyD88^{-/-} and Wt mice. No significant differences regarding Smad1/5/8 phosphorylation were detected when comparing Wt to MyD88^{-/-} mice (Fig. 2m3e).

For the activation signal to be successfully transmitted, phosphorylated Smad1/5/8 form heteromeric complexes with the common mediator Smad4, and then translocate into the nucleus. Thus, we next investigated whether the lack of MyD88 could affect the amount of Smad4. Notably, while Smad4 mRNA levels in the liver remain unchanged in response to iron loading in Wt mice, and these levels are similar to that found in MyD88^{-/-} mice (Fig. 2m3g), Smad4 protein levels are noticeably lower in MyD88^{-/-} mice compared to Wt mice (Fig. 2m3f).

Together, our data is in line with previous findings that Smad4 deficiency in mice causes iron overload due to insufficient hepcidin activation [361], in that the iron-sensing deficiency we report in MyD88^{-/-} mice is due to a lack of Smad4 protein and consequent deficient hepcidin induction, thus revealing a new and unsuspected link between MyD88 and Smad4.

Next, to further confirm the link between these two proteins we investigated the role of MyD88 in Smad4-mediated transcriptional activation of hepcidin in vitro. We transfected human MyD88 into Huh7 hepatoma cells and found that this leads to a significant increase of endogenous hepcidin mRNA levels compared to cells transfected with the empty plasmid, an effect that can be further enhanced by treatment with BMP6 (Fig. 3m3a). We also examined the effects of MyD88 on the Smad4-

dependent activation of hepcidin by using a HAMP-luciferase (HAMP-luc) human reporter gene promoter [367]. As reported previously [367, 374], two distinct BMP6-signaling activators relevant to hepcidin induction, namely BMP6 and Activin B, activated the HAMP-luc reporter gene [374]. Importantly, MyD88 transfection leads to similar levels of HAMP-luc activation as elicited by BMP6 and Activin B (Fig. 3m3b) consistent with the proposed role for MyD88 in hepcidin activation. To further investigate the link between the Bmp/Smad4 pathway and MyD88-mediated hepcidin activation, we mutated the BMP-responsive element (BMP-RE1) located at position -84/-79 of the HAMP promoter, which is essential for BMP6-mediated hepcidin activation [232], thus generating the construct HAMP-luc Δ BMP-RE1. The mutation of this vital responsive element dramatically abolishes the induction of hepcidin by MyD88 and, as expected, by BMP6 and Activin B [232, 374]. We next asked whether MyD88 could directly associate with SMAD4. To answer this question, we cotransfected HEK293-I3A cells with SMAD4-Flag and HA-MyD88 expression vectors. As shown in Fig. 3m3c, HA-tagged MyD88 was coimmunoprecipitated with Flag-tagged SMAD4, and reciprocally, Flag-tagged SMAD4 was immunoprecipitated with HA-tagged MyD88, demonstrating that indeed SMAD4 can associate with MyD88. Finally, we confirmed by western blotting the presence of both Myd88 and SMAD4 in nuclear extracts from Huh7 cells (Fig. 3 m3d).

Taken together, these results further consolidate our finding of a direct interaction between MyD88 and Smad4, and are consistent with the hypothesis that the lack of MyD88 leads to insufficient Smad4 expression in the nuclei, affecting iron-mediated hepcidin induction through the Bmp6/Smad4 signaling pathway.

Discussion

While we were establishing the role of TLRs signaling through MyD88 adaptor protein in the acute phase of hypoferrinemia, we noticed that the control group of MyD88^{-/-} mice present higher levels of liver and circulating ferritin when compared to wild type and Trif-deficient mice. Ferritin is the major protein implicated in iron storage. In the circulation, it acts as a delivery mechanism, and serum levels usually reflect total body iron stores [375]. Ferritin can be abnormally elevated in a wide range of disease states including malignancy, diabetes, infection, inflammation, and chronic iron-overload syndromes [376, 377, 378, 379].

As our mice are elevated in specific pathogen free conditions and they don't present any diseases related to their phenotype, we decided to further investigate the possible involvement of the MyD88 adaptor protein in iron metabolism, since serum ferritin values are considered a good index of increased iron stores. In fact, when compared to wild-type and Trif-deficient mice, MyD88^{-/-} mice presented higher iron storage in the livers, confirming that MyD88 deficiency results in heightened liver iron storage. Therefore, we further investigated in the possible causes behind the described phenotype.

Assessment of erythropoietin activity:

Hemolytic anemia (HA) is a type of anemia that occurs when the bone marrow is unable to replace prematurely destroyed red blood cells. HA is observed in autoimmune diseases (autoimmune hemolytic anemia), genetic disorder (thalassemia or sickle cell anemia), infections or exposure to certain drugs or toxins. It's already established that high levels of iron and ferritin are encountered in the liver and the circulation in either thalassemia or sickle cell anemia [380]. Therefore, we investigated whether the increased in liver iron concentration in MyD88^{-/-} was due to altered erythropoiesis or circulating iron. However, the erythroid parameters and serum iron levels were similar to wild type and Trif-deficient mice, hence ruling out a possible defect in erythropoiesis activity due to MyD88 deficiency.

Assessment of iron sensing pathways:

Increased body iron stores are found in the different forms of hereditary hemochromatosis (HH), where serum ferritin levels broadly parallel the entity of iron stores. All these hereditary disorders have inappropriately low hepcidin levels with consequent excessive iron release to the plasma from enterocytes and macrophages [381]. In contrast to HH phenotype, MyD88^{-/-} mice presented a normal serum iron level and their liver iron concentration was less prominent than in Hfe^{-/-} mice [284]. When MyD88^{-/-} mice were challenged with high iron diet, the capability of MyD88^{-/-} mice to control iron absorption seems not adequate, resulting in a significant higher liver iron accumulation when compared to wild type mice. On the other hand, although MyD88^{-/-} mice were able to induce their hepatic hepcidin upon dietary iron, this expression was unsubstantial and inappropriate to maintain a normal iron homeostasis. These results suggest a defect in MyD88^{-/-} mice in iron sensing pathways leading to insufficient hepcidin induction.

Before analysing the recognized signaling pathways involved in iron sensing, we investigated the possible role of TLRs in the observed MyD88^{-/-} phenotype. Recent studies have shown that metals like nickel, palladium and cobalt are able to directly ligate and trigger TLR4 on dendritic cells [382, 383]. However, despite that TLRs can be activated by some metals, mice deficient in TLRs showed same iron parameters as wild type mice. Thus, ruling out any related role with TLRs.

Intracellular and extracellular iron detection mechanisms were shown to induce the expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) which is the primary regulator of endogenous hepcidin [359]. In the liver, BMP6 interact with Hemojuvelin (HJV), a BMP co-receptor specialized for iron regulation, which will activate the SMAD transcriptional system [360].

Subsequently, phosphorylated SMAD 1/5/8 forms a complex with SMAD4 and translocates to the nucleus to bind directly the BMP-responsive elements (BMP-RE) on hepcidin promoter, thus inducing hepcidin transcription [214, 361, 362]. Therefore, a

disruption in BMP6/Smad4 signaling pathway will result in reduced hepcidin expression and severe iron overload [361].

Based on that, we investigated whether Bmp6 activation was impaired in MyD88^{-/-} mice. However, hepatic Bmp6 expression was induced by iron in wild type and MyD88^{-/-} mice. Moreover, this expression was higher in MyD88^{-/-} mice, showing that the absence of MyD88 does not affect Bmp6 induction. On the other hand, despite the high level of BMP6 observed in MyD88^{-/-} mice, hepcidin remained lower when compared to wild type mice. Moreover, others genes which were regulated similarly to hepcidin in that context, showed also a reduced expression in MyD88^{-/-} mice [384]. Thus, confirming the defect in Bmp6/Smad4 signaling pathway.

From another side, Smad1/5/8 phosphorylation was similar in wild type and MyD88^{-/-} mice. Although hepatic Smad4 mRNA were unchanged in response to iron loading, Smad4 protein levels were noticeably lower in MyD88^{-/-} mice compared to wild type mice. Thus, we show for the first time that MyD88^{-/-} lack, results in Smad4 deficiency which causes an inadequate hepcidin expression and liver iron loading.

Furthermore, we confirmed those results by showing that cells transfected with MyD88 coding vectors, led to a significant increase in hepcidin transcription compared to cells transfected with an empty plasmid, an effect that could be further enhanced by treatment with BMP6. Finally, we investigated whether MyD88 could directly associate with SMAD4.

Indeed, using coimmunoprecipitation, we showed for the first time a possible interaction between Smad4 and MyD88 protein. Finally, those results may indicate that by its association to Smad4, MyD88 could protect the latter from degradation, thus assuring its translocation with SMAD1/5/8 into the nucleus to induce hepcidin expression.

On the other hand, the activation of hepcidin promoter by inflammatory stimuli requires not only the activation of STAT -3, but also activation of the SMAD1/5/8-SMAD4 pathway [361]. This falls in line with our results, saying that the MyD88 protein is required for optimal activation of STAT-3 and for proper signaling through SMAD1/5/8-Smad4. Therefore, this clarifies more the low levels of hepcidin observed in MyD88^{-/-} mice during the inflammatory reaction.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant no MOP123246) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant no 412326-2011) to MMS. AL is a recipient of a PhD scholarship from the NSERC. MMS is a recipient of the Research Scholarship (Senior) from Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS)

Figures

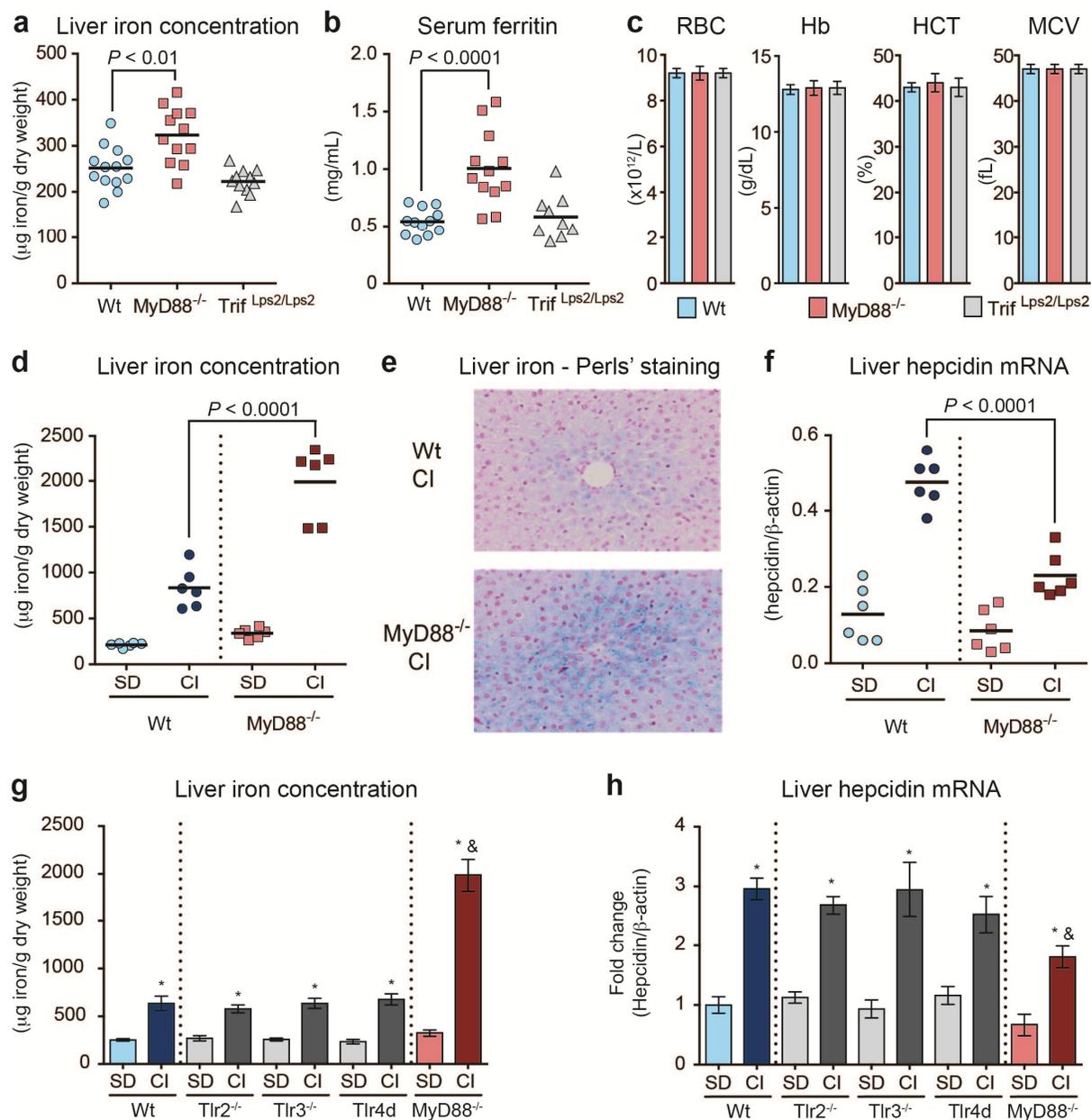


Figure 1m3. Enhanced iron accumulation in the liver and inability to appropriately up-regulate hepcidin in response to dietary iron challenge in MyD88-deficient mice. (a-c) Increased body iron stores with normal erythropoietic parameters in MyD88^{-/-} mice fed a standard diet. (a) Liver iron concentration measured by atomic absorption spectrometry; (b) serum ferritin levels; and (c) erythroid parameters: red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT) and mean corpuscular volume (MCV) in wild-type (Wt – blue circles), MyD88- (MyD88^{-/-} - red squares) and Trif-deficient (Trif^{Lps2/Lps2} – grey triangles) mice. Results are presented as combined data from 2 independent experiments performed with $n = 6$ mice per group. (d-f) MyD88-deficient mice are unable to limit iron absorption to the same extent as wild-type mice when challenged with an iron-enriched diet. (d) Liver iron concentration; (e) Perls' Prussian blue staining of ferric iron in liver sections (original magnification 200x); and (f) liver hepcidin mRNA levels in mice fed a standard diet (SD – light colors) or carbonyl iron supplemented diet (CI, 2.5% wt/wt - dark colors) for 2 weeks. The results are representative of a minimum of three independent experiments using $n \geq 4$ mice per group. (g-h) MyD88^{-/-} inability to respond to dietary iron challenge is independent of signaling through upstream toll-like receptors. (g) Iron concentration and (h) hepcidin mRNA levels in the liver of wild-type (Wt – blue bars), Tlr2-; 3- and 4-deficient mice (Tlr2^{-/-}, Tlr3^{-/-} and Tlr4d – gray bars) and MyD88^{-/-} mice (red bars) fed a standard diet (SD – light colors) or carbonyl iron supplemented diet (CI, 2.5% wt/wt - dark colors) for 2 weeks. All animals were 10 weeks old at the end of the experiments. The results are presented as means \pm SEM, $n \geq 5$ mice per group. Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance: * $P < 0.05$, compared with respective controls fed the standard diet; and & $P < 0.01$ compared with Wt mice; n.s. – not significant.

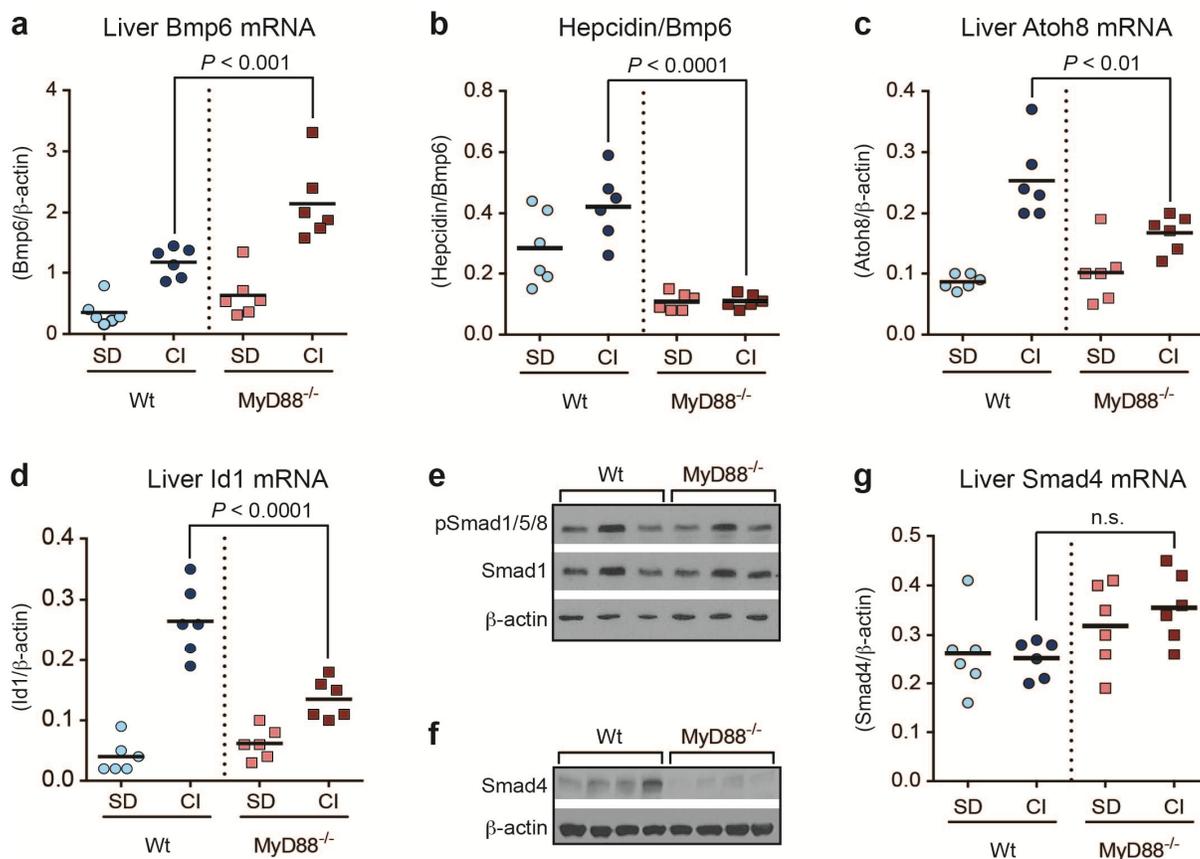


Figure 2m3. Defective signaling through the Bmp6/Smad pathway in response to dietary iron loading in MyD88^{-/-} mice involves diminished Smad4 levels in the liver. (a-b) Appropriate expression of Bmp6 mRNA expression contrasting with lower levels of down-stream genes activated through the Bmp6/Smad signaling pathway: Bmp6 mRNA levels (a); hepcidin/Bmp6 ratio (b); Atoh8 (c) and Id1 (d) mRNA levels in the liver of Wt (blue circles) and MyD88^{-/-} (red squares) mice. Mice were fed a standard diet (SD – light colors) or carbonyl iron supplemented diet (CI, 2.5% wt/wt - dark colors) for 2 weeks. (e) Similar Smad1/5/8 phosphorylation levels (pSmad1/5/8) and (f) reduced levels of Smad4 protein in iron-loaded (CI-supplemented diet) MyD88^{-/-} compared to iron-loaded wild-type (Wt) mice. Liver nuclear extracts were analyzed by Western blotting with antibodies to phosphorylated Smad1/5/8, total Smad1 (e), and Smad4 (f). Blots were stripped and reprobbed with an antibody to β -actin as loading control. (g) Smad4 mRNA expression in mice fed a standard diet (SD – light colors) or carbonyl iron supplemented diet (CI, 2.5% wt/wt - dark colors) for 2 weeks. The results are representative of a minimum of three independent experiments using $n \geq 4$ mice per group. The animals were 10 weeks old at the end of the experiments.

Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance; n.s. – not significant.

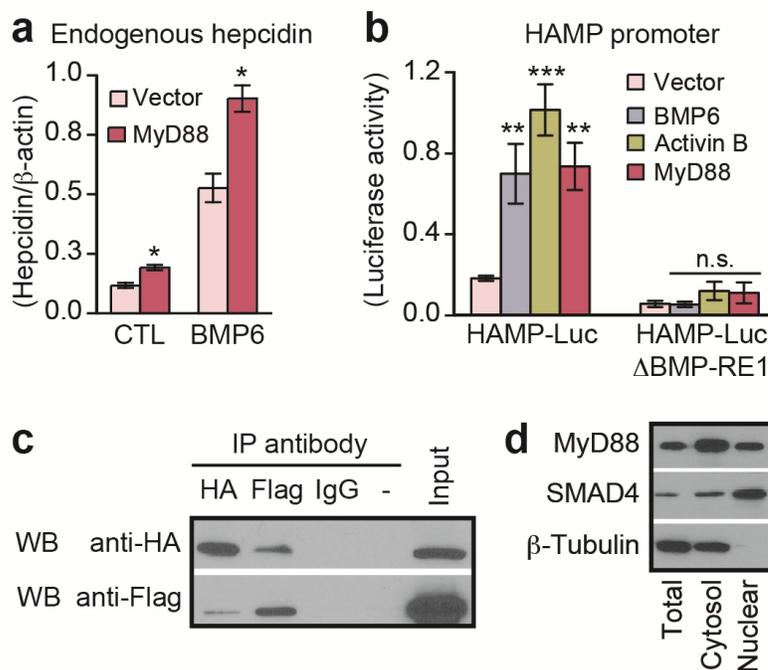
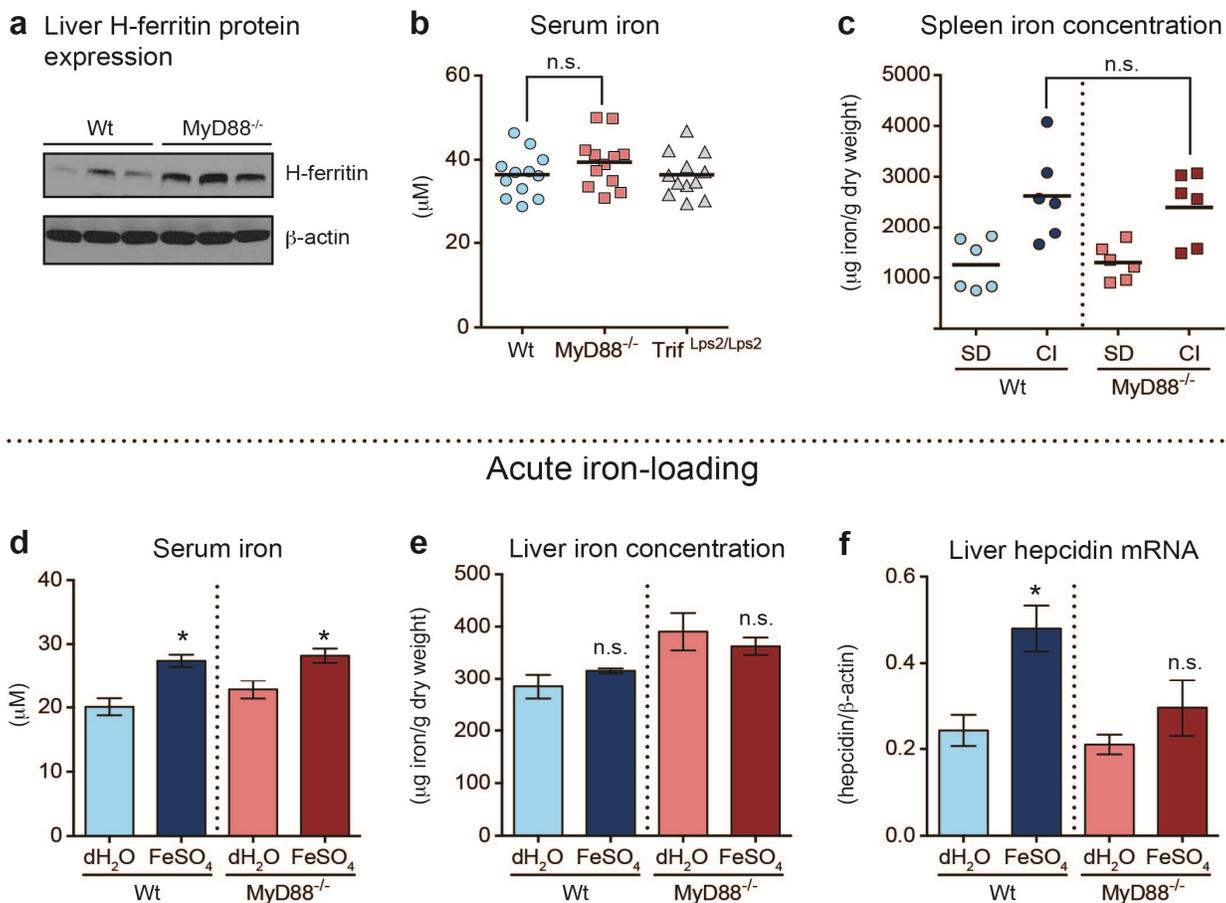


Figure 3m3. MyD88 enhances hepcidin expression and directly interacts with SMAD4. (a) MyD88 enhances endogenous hepcidin expression. Huh7 cells were transfected transiently with the full length MyD88 vector in the presence or absence of BMP6. * $P < 0.01$ compared with vector transfected cells (rose bars); (b) Mutation of the BMP-RE1 in the HAMP promoter abolishes HAMP-Luc induction by MyD88. Huh7 cells were cotransfected transiently with Hamp-Luc or Hamp-Luc \square BMP-R1 and MyD88 plasmids and luciferase activity was assessed 24h after transfection. BMP6 and Activin B treatments were used as controls. (a-b) ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$ and n.s.=not significant compared with vector transfected (pink bars) (c) Coimmunoprecipitation of MyD88 with SMAD4. HEK293T I3A cells were transfected transiently with HA-MyD88 together with SMAD4-Flag and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with the anti-Flag, anti-HA or anti-IgG antibody (as a control). SMAD4 was immunoblotted with an anti-Flag antibody and MyD88 was immunoblotted with an anti-HA antibody. (d) MyD88 and SMAD4 proteins co-expression in the nuclei. HEK293 I3A cells were cotransfected with SMAD4 and MyD88 plasmids and proteins levels were assessed in total, cytosolic and nuclear extracts by WB. The blot was reprobated with β -tubulin to assess the quality of the nuclear extracts.



Supplementary Figure 1m3.

(a) Representative western blot showing H-ferritin levels in the liver of Wt and MyD88^{-/-} mice. The blot was stripped and reprobed with an antibody to β -actin as loading control. (b) Serum iron in wild-type (Wt – blue circles), MyD88^{-/-} (MyD88^{-/-} – red squares) and Trif-deficient (Trif^{Lps2/Lps2} – grey triangles) mice. Results are presented as combined data from 2 independent experiments performed with $n = 6$ mice per group). (c) Spleen iron concentration measured by atomic absorption spectrometry in mice fed a standard diet (SD – light colors) or carbonyl iron supplemented diet (CI, 2.5% wt/wt - dark colors) for 2 weeks. (d-f) Acute iron loading. (d) Serum iron; (e) liver iron concentration; and (f) liver hepcidin mRNA in Wt (blue bars) and MyD88^{-/-} mice (red bars) 5 hours after receiving distilled water (dH₂O - light colors) or iron sulfate (FeSO₄ – dark colors) by oral gavage. The results are representative of two independent experiments using $n \geq 4$ mice per group. The animals were 10 weeks old at the end of the experiments. Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance; * $P < 0.01$, compared with respective controls receiving dH₂O; n.s. – not significant.

Section 5. DISCUSSION

Le fer est un oligoélément essentiel à la croissance microbienne. Au cours des infections, les microbes utilisent des mécanismes multiples et complexes pour acquérir le fer de leur hôte, alors que les hôtes résistent à l'infection par la séquestration du fer sous des formes et des endroits moins accessibles pour les microbes, ce qui va ralentir leur multiplication [238]. HAMP, l'hormone essentielle dans la régulation du métabolisme du fer, est considérée comme étant le chef d'orchestre de cette réponse inflammatoire. HAMP est sécrétée par une grande variété de cellules, mais de façon prédominante par les hépatocytes et les macrophages [187, 385].

L'infection et l'inflammation génèrent ensemble des signaux qui augmentent considérablement la synthèse et la libération de HAMP, ce qui va entraîner une restriction des flux de fer vers les microbes extracellulaires. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour augmenter l'expression de HAMP au cours de l'infection et de l'inflammation. Dans les hépatocytes, l'expression de HAMP est particulièrement stimulée par la cytokine inflammatoire IL-6 [231]. L'augmentation des concentrations circulantes d'IL-6, stimulent la transcription de HAMP à travers divers facteurs de transcription tels que STAT3 et « GATA binding protein 6 » (GATA 6) [231, 386, 387]. Les interférons de type I et d'autres cytokines, comme l'IL-1 et l'IL-22, stimulent également HAMP [230, 388, 389]. En revanche, la stimulation des macrophages avec des cytokines n'induit pas l'expression de HAMP [188, 295], suggérant que HAMP est régulée différemment au niveau des macrophages et des hépatocytes.

Il n'est pas encore clair quelles voies de signalisation contribuent à l'expression de HAMP dans les macrophages. Cependant, nous avons montré dans des études précédentes que l'expression de HAMP hépatique est dépendante de TLR4 [284], ce qui indique que la signalisation des TLRs peut être importante pour l'activation de la production de HAMP dans des macrophages.

Ainsi, dans cette étude, nous avons analysé la régulation moléculaire de l'expression de HAMP dans les macrophages Raw264.7 et les macrophages murins péritonéaux stimulés avec distincts ligands TLRs.

Nous avons constaté que Pam3CSK4 (ligand de TLR1/2) ; LPS (ligand de TLR4) et FSL1 (ligand de TLR6/2), mais pas Poly I:C (ligand de TLR3), induisent l'expression de HAMP macrophagique. En outre, en utilisant des souris TLR2^{-/-} et TLR4 déficientes, nous avons établi que cette expression est dépendante des voies TLRs. Enfin, nous avons constaté que cette régulation est abolie chez les souris MyD88^{-/-}, ce qui suggère que la molécule adaptatrice MyD88 est indispensable pour cette induction. D'autre part, des études récentes ont montré que les hépatocytes primaires humains augmentent leur expression en hepcidine après stimulation de différents TLRs et que cette induction des stimuli microbiens est dépendante d'IL-6 [390].

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du fer et cela par le recyclage de ce dernier à partir des globules rouges sénescents [391, 392]. En réponse à l'inflammation, la rétention de fer dans le système réticulo-endothélial est considérée comme une tentative de l'hôte pour retenir ce métal à partir des agents pathogènes envahisseurs [393]. La séquestration du fer dans les macrophages est principalement due à l'interaction entre HAMP et l'exportateur de fer, la FPN [391, 392]. L'augmentation de HAMP déclenchée par des cytokines inflammatoires, entraîne l'internalisation et la dégradation de la FPN [178], bloquant ainsi la libération du fer par les macrophages.

Des études antérieures ont montré que les macrophages activés sécrètent de nombreuses cytokines inflammatoires différentes, y compris IL-6 qui stimule l'expression de HAMP dans le foie [230]. A son tour, HAMP augmente la rétention de fer dans les macrophages en raison de l'augmentation de l'absorption de fer et une diminution de l'exportation du fer [284]. Toutefois, si l'augmentation des niveaux de fer dans les macrophages affecte IL-6 n'est pas encore étudiée. Ainsi, nous avons

cherché à savoir si l'augmentation des niveaux de fer dans les macrophages peut affecter la production ultérieure d'IL-6.

Après stimulation du TLR4 avec du LPS, nous avons confirmé que la production d'IL-6 par les macrophages était renforcée par la présence de concentration élevée en fer et par contre réduite en son absence. Ces résultats indiquent que durant les infections, le taux du fer macrophagique renforce l'expression d'IL-6 ce qui entraînera une expression de HAMP plus élevée nécessaire à la dégradation de la FPN et à la privation du fer des microbes. Nos résultats sont en accord avec des études précédentes montrant que la carence ferroportine dans les macrophages murines augmente de façon significative les niveaux de TNF- α et d'IL-6 [394]. D'autre part, des études récentes ont montré que le prétraitement des macrophages avec de HAMP atténue la réponse inflammatoire au LPS et cela par la suppression de l'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF- α [395].

LPS est considéré comme l'un des signaux inflammatoires les plus puissants déclenchés par les agents pathogènes. Chez l'hôte infecté, LPS induit une libération massive de cytokines et d'autres médiateurs d'inflammation. Cependant, une stimulation par du LPS est non seulement associée à une réponse pro-inflammatoire extrême mais elle est également accompagnée d'une hyposidérémie : un mécanisme de défense primitif qui contribue à la réduction du fer dans la circulation tout en minimisant sa disponibilité aux agents pathogènes. D'autre part, cette hyposidérémie peut aussi limiter la disponibilité du fer pour l'érythropoïèse et contribuer au développement des anémies inflammatoires.

En augmentant le stockage du fer dans les macrophages et en diminuant la capacité de son absorption intestinale, HAMP est devenu le médiateur possible des hyposidérémies inflammatoires. Cependant, alors que LPS induit l'expression de HAMP, l'impact de cette augmentation dans le cadre des hyposidérémies aiguës reste inconnu.

Dans nos études précédentes, on a montré qu'en réponse au LPS, les souris déficientes en TLR4 ne sont pas capables d'augmenter leur expression en hepcidine hépatique et cela dépend donc des voies de signalisation médiées par TLR4 [284].

Par contre, les souris déficientes en TLR4 ont conservé la capacité de développer une hyposidérémie, ce qui suggère que cette dernière peut se produire par des mécanismes à la fois dépendante et indépendante de TLR4 [236].

Ainsi, pour comprendre ces mécanismes, nous avons étudié durant la phase inflammatoire aiguë, le rôle des molécules adaptatrices MyD88 et TRIF des voies TLRs dans la régulation des gènes liés au métabolisme du fer.

Chez les souris sauvages, la stimulation de TLR2 (signal à travers MyD88), de TLR3 (signal à travers TRIF) et de TLR4 (signal à travers MyD88 et TRIF) avec diverses molécules associées aux agents pathogènes a donné lieu à une diminution significative du fer sérique. Mais il reste incertain si cette réponse est due à la signalisation à travers les TLRs. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des souris déficientes en MyD88 soit $MyD88^{-/-}$ ou en TRIF soit $Trif^{Lps2/Lps2}$. Après injection avec du LPS, les souris sauvages et les souris $Trif^{Lps2/Lps2}$ ont développé une réponse hyposidérémie similaire. Par contre, les souris $MyD88^{-/-}$ ont répondu avec une baisse initiale du fer sérique mais ils étaient incapables de maintenir cette réponse. Ainsi, l'absence de la signalisation MyD88 altère de manière significative la réponse hyposidérémique déclenchée par LPS.

Contrairement aux souris sauvages [222, 231], après stimulation avec du LPS, les souris $MyD88^{-/-}$ et $Trif^{Lps2/Lps2}$ présentaient à la fois une faible production d'IL-6. Ceci était associé à une incapacité d'induire la transcription de HAMP au niveau hépatique et splénique. Par conséquent, la signalisation à travers les deux molécules adaptatrices est indispensable à la production adéquate de cytokines afin d'induire HAMP. En outre, cela suggère qu'il existe des voies indépendantes de HAMP qui participent à cette hyposidérémie de phase aiguë.

Ensuite, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus, on a analysé l'expression des gènes impliqués dans la captation, la séquestration et la libération du fer cellulaire, au niveau de la rate qui est considéré comme un organe clé durant l'inflammation.

Le fer circulant dans le plasma est toujours lié à la Tf. Lorsque les cellules acquièrent le fer, l'holotransferrine se lie à son récepteur à la surface cellulaire et le complexe sera internalisé dans l'endosome. Les cellules captent ce métal en proportion avec le niveau d'expression du TfR1 qui varie en fonction des besoins physiologiques en fer. Par exemple, durant leur développement, les cellules érythroïdes de la moelle osseuse expriment des niveaux très élevés du TfR1 et compte pour 80% du holotransferrine de l'organisme [396].

D'autre part, HFE forme un complexe spécifique avec TfR1 pour diminuer son affinité au holotransferrine et par conséquent diminue la captation du fer par les cellules [397]. Par conséquent, nous avons envisagé que la protéine HFE peut jouer un rôle dans la réponse hyposidérémique. En effet, après stimulation du TLR4 et/ou du TLR3, le taux d'expression de HFE était significativement réduit chez les souris sauvages et déficientes indépendamment des voies MyD88 et TRIF. Ainsi, nos résultats suggèrent que la réduction de HFE au cours de la réponse inflammatoire peut permettre au Tf de mieux lier son récepteur, ce qui augmente la captation de fer par les cellules, contribuant ainsi à la diminution du fer sérique.

En outre, des études antérieures ont noté qu'après injection du LPS, les souris $Hfe^{-/-}$ présentaient une faible expression de HAMP et ne développaient pas une hyposidérémie [398]. En revanche, nous avons montré que ce type de souris, présentant une hémochromatose héréditaire, diminue considérablement le taux du fer sérique par rapport à leur groupe contrôle. Par rapport aux souris sauvages, cette réponse semble négligeable, mais elle était similaire à celles rencontrée chez les souris sauvages placées sur une diète riche en fer pour imiter l'hémochromatose observée chez les souris $Hfe^{-/-}$. Ainsi, nos résultats suggèrent que cette faible réponse est due directement aux taux élevés en fer et non pas à l'absence de HFE.

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement des hyposidérémies d'origines inflammatoires, on a analysé le stockage du fer au niveau de la rate qui représente un foyer riche en macrophages. Contrairement aux souris sauvages et aux souris $\text{Trif}^{\text{Lps2/Lps2}}$, les souris $\text{MyD88}^{-/-}$ étaient incapables d'accumuler le fer splénique. Ainsi, cela indique que la voie MyD88 est nécessaire pour la rétraction du fer sérique et sa séquestration dans les macrophages spléniques. De plus, cela est accompagné avec un taux faible en ferritine circulante (résultats non publiés). Cette dernière est un marqueur inflammatoire qui augmente considérablement durant la phase aigüe [399]. Les cytokines telles que $\text{Il-1}\beta$ et $\text{TNF-}\alpha$, induisent la production de ferritine par les macrophages et les hépatocytes [400, 401]. Ainsi, cela clarifie les taux inappropriés observés chez les souris $\text{MyD88}^{-/-}$. D'autre part, la ferritine extracellulaire peut délivrer le fer à une variété de cellules. La ferritine peut se lier à des récepteurs de surface cellulaire, subir une endocytose et transférer le fer en quantité suffisante pouvant altérer l'expression des gènes liés au métabolisme du fer [85]. Ce dernier fait, nous a conduit à interpréter que les faibles taux de ferritine peuvent être responsables du stockage inapproprié de fer chez les souris $\text{MyD88}^{-/-}$.

En outre, on a examiné d'autres mécanismes impliqués dans le transport du fer cellulaire, comme LCN2. Ce dernier est devenu le médiateur d'une voie alternative indépendante de la Tf pour livrer de fer aux cellules. De plus, LCN2 est un peptide impliqué dans la séquestration du fer bactérien et son rôle dans les hyposidérémies a été décrit récemment dans les septicémies induites par LPS [402]. Dans notre étude, on se demandait si LCN2 contribuerait à l'hyposidérémie induite par LPS. Nos résultats montrent que les souris $\text{MyD88}^{-/-}$ présentent une faible expression en LCN2. Ainsi, cette dernière dépend de la voie MyD88. Par contre, cette expression n'est pas essentielle pour diminuer le taux du fer sérique comme les souris déficientes en LCN2 répondent au LPS similairement aux souris sauvages. Enfin, cela exclut le rôle possible de LCN2 dans la réponse hyposidérémique.

Ainsi, d'autres recherches sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués dans la séquestration cellulaire de ce métal au cours de la réponse inflammatoire. Cependant, des études antérieures ont décrit l'acquisition du fer à travers la régulation de DMT1 chez les souris injectées avec du LPS [403] et dans les lignées cellulaires monocytaires stimulées par des cytokines [404]. De même, la phagocytose accrue des globules rouges observée chez les macrophages stimulés par TNF- α pourrait aussi augmenter l'acquisition du fer [405]. D'autre part, il est noté que l'expression de TfR1 augmente dans les macrophages stimulés avec du LPS et IFN γ suivant l'activation de NF- κ B et HIF-1, ce qui implique une augmentation rapide et transitoire du fer intracellulaire [406].

La dernière étape consistait à évaluer l'implication de la FPN. Contrairement à la HAMP, la suppression de la FPN lors de la phase aiguë de l'inflammation survient indépendamment de la voie MyD88 et TRIF. Cela peut également contribuer à la chute initiale des taux de fer sérique. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures démontrant l'inhibition de la FPN par LPS indépendamment de HAMP [407, 408]. En outre, ce transporteur de fer pourrait être réglé par d'autres facteurs comme le vieillissement et le stress thermique [409].

En résumé, nos résultats montrent que la molécule adaptatrice MyD88 est nécessaire pour l'induction de HAMP macrophagique à travers les signalisations des TLRs. En outre, nous avons fourni plus de preuves que le taux du fer séquestré dans les macrophages joue un rôle important dans la réponse immunitaire en stimulant la production de cytokines. D'autre part, nos données suggèrent que lors de l'inflammation, les premiers changements au niveau du fer sérique sont indépendants de HAMP, ce qui est cohérent avec des études récentes [403, 410]. En plus, on a confirmé que durant le choc endotoxique chez la souris, le signal utilisant à travers MyD88 est nécessaire pour maintenir une réponse hyposidérémique aiguë. Toutefois, la façon dont le stress intracellulaire et les réactions inflammatoires interagissent ensemble pour induire la phase aiguë de la diminution du fer sérique nécessite des investigations complémentaires.

Enfin, il est peut-être possible d'interférer avec la progression des hyposidérémies en ciblant les voies des TLRs. Des études récentes ont montré plusieurs candidats pouvant atténuer la réponse inflammatoire induite par le LPS. Par exemple, « monocyte chemotactic protein-induced protein 1 » (MCP-1) est induit de manière significative par « Monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1) et agit comme un corépresseur de NF- κ B qui réprime sélectivement la signalisation inflammatoire médiée par TLR4 [411]. De même, une supplémentation adéquate en acide folique atténue considérablement l'expression, induite par LPS, de NF- κ B, IL-1 β , TNF- α et IL-6 et cela au niveau du placenta des souris [412].

En même temps que nous étudions le rôle des TLRs et de la protéine adaptatrice MyD88 dans le développement des hyposidérémies de la phase inflammatoire aiguë, nous avons remarqué que le groupe contrôle des souris MyD88^{-/-} présentent un niveau plus élevé de la ferritine hépatique et sérique par rapport aux souris sauvages et aux souris déficientes en TRIF. La ferritine est la protéine majeure impliquée dans le stockage du fer. Dans la circulation, elle agit comme un mécanisme de livraison et les taux sériques reflètent généralement le total des réserves en fer de l'organisme [375]. La ferritine peut être anormalement élevée dans une large gamme d'états pathologiques y compris les tumeurs malignes, le diabète, l'infection, l'inflammation et les syndromes de surcharge en fer [376, 377, 378, 379].

Comme nos souris élevées dans des conditions stériles n'ont aucun signe d'infection et ne présentent pas des maladies liées à leur phénotype, nous avons étudié le rôle possible de l'implication de la protéine adaptatrice MyD88 dans le métabolisme du fer. Les valeurs élevées de la ferritine sérique sont considérées comme un bon indice de l'augmentation des réserves de fer. Par rapport aux souris sauvages et les souris déficientes en Trif, les souris MyD88^{-/-} présentaient un stockage du fer hépatique plus élevée. Ainsi, confirmant que la carence en MyD88 augmente de façon significative le stockage du fer hépatique.

Par conséquent, nous avons étudié les causes possibles derrière ce phénotype décrit chez les souris MyD88^{-/-} :

a) Évaluation de l'activité érythropoïétique : L'anémie hémolytique (HA) est un type d'anémie qui survient lorsque la moelle osseuse est incapable de remplacer les globules rouges prématurément détruites. HA est observée dans les maladies auto-immunes, les maladies génétiques comme la thalassémie et la drépanocytose, les infections, ainsi que l'exposition à certains médicaments ou aux toxines. Il est déjà établi que les sujets présentant une thalassémie ou bien une drépanocytose aient des niveaux hépatique et sérique élevés en fer [380]. Par conséquent, nous avons songé que le phénotype rencontré chez les souris MyD88^{-/-} est due à un défaut dans l'activité érythropoïétique. Toutefois, les paramètres érythroïdes et le taux du fer sérique étaient normaux, excluant ainsi ce fait.

b) Évaluation des signaux de réserve en fer : L'augmentation des réserves en fer de l'organisme se trouve dans différentes formes d'hémochromatose héréditaires (HH), où les taux de ferritine sérique sont globalement parallèles à l'entité des réserves de fer et les niveaux de HAMP sont remarquablement faibles [381]. Chez les souris MyD88^{-/-} la valeur de fer sérique est normale et la concentration du fer hépatique est moins importante que celle observée chez les souris HFE^{-/-} (résultats non publiés). Cependant, cela n'exclut pas un défaut dans les voies de détection de fer chez les souris MyD88^{-/-}. En effet, lorsque ces souris sont placées sur un régime riche en fer, elles présentaient par rapport aux souris sauvages une accumulation significative du fer hépatique. D'autre part, bien que les souris MyD88^{-/-} aient pu induire l'expression de HAMP en réponse au fer alimentaire, cette dernière était inconsistante et inappropriée pour maintenir une homéostasie normal du fer. Ainsi, pointant que l'absence de la protéine adaptatrice MyD88 entraîne un défaut dans les voies de détection du fer chez la souris.

Avant d'analyser les voies de signalisations impliquées dans la détection du fer, nous avons étudié le rôle possible des TLRs dans l'accumulation du fer observés chez les souris MyD88^{-/-}. En fait, des études récentes ont montré que les métaux comme le nickel, le palladium et le cobalt sont capables de lier directement le TLR4, pour déclencher ensuite la maturation des cellules dendritiques [382, 383]. Cependant, malgré ce fait, les souris déficientes en TLRs ne présentaient aucune surcharge en fer, mais par contre montrent des paramètres ferriques similaires à ceux des souris sauvages, excluant ainsi tous rôles liés aux TLRs.

Des mécanismes de détection du fer intracellulaires et extracellulaire se sont révélés induire l'expression de la protéine de morphogénèse osseuse 6 (BMP6), qui est le principal régulateur de HAMP [359]. Dans le foie, BMP6 va interagir avec HJV. Cette interaction va activer le système de transcription SMAD [360]. Par la suite, SMAD1/5/8 phosphorylés forment un complexe avec SMAD4. Ce dernier subit une translocation vers le noyau pour agir comme facteur de transcription au niveau des BMP-responsive elements (BMP-RE) localisés dans le promoteur de HAMP, induisant ainsi sa transcription [214, 361, 362]. Ainsi, une perturbation de la voie de signalisation BMP6/Smad4 se traduira par une expression réduite en hepcidine et une surcharge en fer [361].

Par conséquent, nous avons examiné si l'activation de BMP6 est affaiblie chez les souris MyD88^{-/-}. Cependant, en réponse à une diète riche en fer, cette expression était très élevée chez les souris MyD88^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Ainsi cela indique que l'absence de la protéine MyD88 n'affecte pas l'expression de BMP6. Malgré ceci, l'expression de HAMP ainsi que d'autres gènes réglementés par la voie BMP6 [384] étaient affaiblies, confirmant ainsi un défaut dans la voie de signalisation Bmp6/Smad4. D'autre part, aucune différence n'était observée par rapport à la phosphorylation de Smad1/5/8. En revanche, bien que l'ARNm hépatique de Smad4 était inchangé en réponse au fer, le taux de la protéine Smad4 était nettement plus faible chez les souris MyD88^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Ainsi, on montre pour la première fois que l'absence de la protéine MyD88, se traduit par une carence

protéique en Smad4 responsable d'une expression insuffisante de HAMP hépatique se traduisant par une surcharge en fer.

Ces résultats ont été confirmés par transfection cellulaires avec des vecteurs codant la protéine MyD88 conduisant à une augmentation significative de la transcription de HAMP.

En outre, nous avons examiné si MyD88 pourrait directement s'associer à Smad4. En effet, en utilisant le principe de co-immunoprécipitation, nous avons démontré pour la première fois une interaction possible entre Smad4 et la protéine MyD88. Par conséquent, ces résultats indiquent que l'association entre MyD88 et Smad4 entraîne la stabilité de cette dernière afin d'assurer sa translocation avec SMAD1/5/8 dans le noyau, pour ensuite induire l'expression de HAMP.

D'autre part, l'activation du promoteur de HAMP par des stimuli inflammatoires exige non seulement l'activation de STAT-3, mais également l'activation de la voie SMAD1/5/8-SMAD4 [361]. Ceci rentre en accord avec nos résultats, disant que la protéine MyD88 est nécessaire pour une activation optimale de STAT-3 et pour une signalisation adéquate à travers SMAD1/5/8-Smad4. Par conséquent, cela clarifie de plus les faibles niveaux de HAMP observés chez les souris MyD88^{-/-} au cours de la réaction inflammatoire.

Section 6. CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude a permis de montrer que TLR2 et TLR4 sont impliqués dans la régulation de HAMP au niveau des macrophages et que cette régulation nécessite la protéine adaptatrice MyD88. De plus, on a présenté des évidences supplémentaires montrant que la séquestration du fer intracellulaire renforce la réponse inflammatoire et par conséquent induit la production de cytokines.

D'autre part, notre travail a démontré pour la première fois le rôle des récepteurs Toll-like et de la protéine adaptatrice MyD88 dans le développement des hyposidérémies de la phase inflammatoire aiguë et cela indépendamment de HAMP. Par conséquent, le ciblage thérapeutique des voies de signalisations des TLRs, ouvre la porte devant le développement de nouvelles stratégies efficaces pour lutter contre la progression des hyposidérémies et le développement des anémies inflammatoires chroniques, ce qui va améliorer la qualité de vie et l'efficacité du traitement chez les sujets présentant des syndromes inflammatoires chroniques.

Enfin, notre ouvrage a décelé pour la première fois le rôle essentiel de la protéine adaptatrice MyD88 dans le maintien de l'homéostasie de fer. Précisément, on a montré l'implication de MyD88 dans la voie principale de régulation de HAMP en réponse au fer, la voie BMP6. Cette protéine adaptatrice s'avère utile pour assurer un taux adéquat de Smad4 qui par conséquent amène à une expression de HAMP convenable pour une régulation adaptée de l'absorption du fer alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Papanikolaou, G. and K. Pantopoulos, *Iron metabolism and toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **202**(2): p. 199-211.
2. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(5): p. a011668.
3. Theil, E.C., *Iron regulatory elements (IREs): a family of mRNA non-coding sequences*. Biochem J, 1994. **304 (Pt 1)**: p. 1-11.
4. Pantopoulos, K., et al., *Mechanisms of mammalian iron homeostasis*. Biochemistry, 2012. **51**(29): p. 5705-24.
5. Harrison, P.M., *Biochemistry of iron*. Clin Toxicol, 1971. **4**(4): p. 529-44.
6. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(10): p. 940-59.
7. Finch, C.A., *Iron Balance in Man*. Nutr Rev, 1965. **23**: p. 129-31.
8. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism*. N Engl J Med, 1999. **341**(26): p. 1986-95.
9. Loreal, O., et al., [*Iron metabolism and tools for the iron status assessment*]. Rev Med Interne, 2012. **33 Suppl 1**: p. S3-9.
10. Anderson, C.P., et al., *Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(9): p. 1468-83.
11. Paoli, M., J. Marles-Wright, and A. Smith, *Structure-function relationships in heme-proteins*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 271-80.
12. Wagener, F.A., et al., *The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing*. Blood, 2003. **102**(2): p. 521-8.
13. Tsiftoglou, A.S., A.I. Tsamadou, and L.C. Papadopoulou, *Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(2): p. 327-45.
14. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme*. Blood, 2002. **100**(3): p. 879-87.
15. Chan, M.K., *Recent advances in heme-protein sensors*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(2): p. 216-22.
16. Sher, E.A., M. Shaklai, and N. Shaklai, *Carbon monoxide promotes respiratory hemoproteins iron reduction using peroxides as electron donors*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33039.
17. Ponka, P., *Cell biology of heme*. Am J Med Sci, 1999. **318**(4): p. 241-56.
18. Galaris, D. and K. Pantopoulos, *Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2008. **45**(1): p. 1-23.
19. Beinert, H., R.H. Holm, and E. Munck, *Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures*. Science, 1997. **277**(5326): p. 653-9.
20. Brzoska, K., S. Meczynska, and M. Kruszewski, *Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond*. Acta Biochim Pol, 2006. **53**(4): p. 685-91.
21. Johnson, D.C., et al., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 247-81.

22. Vinella, D., et al., *Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers*. PLoS Genet, 2009. **5**(5): p. e1000497.
23. Crack, J.C., et al., *Iron-sulfur cluster sensor-regulators*. Curr Opin Chem Biol, 2012. **16**(1-2): p. 35-44.
24. Kiley, P.J. and H. Beinert, *Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster*. FEMS Microbiol Rev, 1998. **22**(5): p. 341-52.
25. Shan, Y., et al., *Covalently linking the Escherichia coli global anaerobic regulator FNR in tandem allows it to function as an oxygen stable dimer*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **419**(1): p. 43-8.
26. Outten, F.W., *Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(4): p. 206-7.
27. Schneider, C., et al., *Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis*. Chem Biol, 2007. **14**(5): p. 473-88.
28. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
29. Catalano, A. and A. Procopio, *New aspects on the role of lipoxygenases in cancer progression*. Histol Histopathol, 2005. **20**(3): p. 969-75.
30. Natarajan, R. and J.L. Nadler, *Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(9): p. 1542-8.
31. Shureiqi, I. and S.M. Lippman, *Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6307-12.
32. Rao, C.V., N.B. Janakiram, and A. Mohammed, *Lipoxygenase and Cyclooxygenase Pathways and Colorectal Cancer Prevention*. Curr Colorectal Cancer Rep, 2012. **8**(4): p. 316-324.
33. Catalano, A., et al., *5-lipoxygenase antagonizes genotoxic stress-induced apoptosis by altering p53 nuclear trafficking*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1740-2.
34. Christmas, P., et al., *Myeloid expression of cytochrome P450 4F3 is determined by a lineage-specific alternative promoter*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 25133-42.
35. Brock, J.H., *The physiology of lactoferrin*. Biochem Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 1-6.
36. Fischer, R., et al., *Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(3): p. 303-11.
37. Levay, P.F. and M. Viljoen, *Lactoferrin: a general review*. Haematologica, 1995. **80**(3): p. 252-67.
38. Weinberg, E.D., *Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential*. J Pharm Pharmacol, 2001. **53**(10): p. 1303-10.
39. Gifford, J.L., H.N. Hunter, and H.J. Vogel, *Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(22): p. 2588-98.
40. Ellison, R.T., 3rd, T.J. Giehl, and F.M. LaForce, *Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin*. Infect Immun, 1988. **56**(11): p. 2774-81.

41. Naidu, S.S., et al., *Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(2): p. 240-5.
42. Herrick, J. and B. Sclavi, *Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage*. Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 22-34.
43. Torrents, E., et al., *Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme*. J Mol Evol, 2002. **55**(2): p. 138-52.
44. Cerqueira, N.M., P.A. Fernandes, and M.J. Ramos, *Ribonucleotide reductase: a critical enzyme for cancer chemotherapy and antiviral agents*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2007. **2**(1): p. 11-29.
45. Nordlund, P. and P. Reichard, *Ribonucleotide reductases*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 681-706.
46. Li, H. and Z.M. Qian, *Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery*. Med Res Rev, 2002. **22**(3): p. 225-50.
47. Kohgo, Y., et al., *Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload*. Int J Hematol, 2008. **88**(1): p. 7-15.
48. Koorts, A.M. and M. Viljoen, *Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion*. Arch Physiol Biochem, 2007. **113**(1): p. 30-54.
49. Halliday, J.W. and L.W. Powell, *Serum ferritin and isoferritins in clinical medicine*. Prog Hematol, 1979. **11**: p. 229-66.
50. Goralska, M., et al., *Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells*. Exp Eye Res, 2003. **76**(2): p. 241-8.
51. Pham, C.G., et al., *Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species*. Cell, 2004. **119**(4): p. 529-42.
52. Harrison, P.M. and P. Arosio, *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
53. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10425-32.
54. Xu, S.Y., et al., *Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils*. Scand J Clin Lab Invest, 1994. **54**(5): p. 365-76.
55. Yan, L., et al., *The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37258-65.
56. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 917-21.
57. Chan, Y.R., et al., *Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against Klebsiella infection*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4947-56.
58. Grigoryev, D.N., et al., *The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(3): p. 547-58.

59. Huang, H., S. Akira, and M.M. Santos, *Is the iron donor lipocalin 2 implicated in the pathophysiology of hereditary hemochromatosis?* Hepatology, 2009. **49**(3): p. 1012-6.
60. Yang, J., et al., *An iron delivery pathway mediated by a lipocalin.* Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1045-56.
61. Devireddy, L.R., et al., *A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake.* Cell, 2005. **123**(7): p. 1293-305.
62. Waldron, K.J., et al., *Metalloproteins and metal sensing.* Nature, 2009. **460**(7257): p. 823-30.
63. Shi, H., et al., *A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin.* Science, 2008. **320**(5880): p. 1207-10.
64. Nandal, A., et al., *Activation of the HIF prolyl hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2.* Cell Metab, 2011. **14**(5): p. 647-57.
65. Shander, A., et al., *Iron overload and toxicity: implications for anesthesiologists.* J Clin Anesth, 2012. **24**(5): p. 419-25.
66. Piga, A., et al., *High nontransferrin bound iron levels and heart disease in thalassemia major.* Am J Hematol, 2009. **84**(1): p. 29-33.
67. Graf, E., et al., *Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site.* J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3620-4.
68. Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1634-58.
69. Kell, D.B., *Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases.* BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 2.
70. Salvador, G.A., *Iron in neuronal function and dysfunction.* Biofactors, 2010. **36**(2): p. 103-10.
71. Trinder, D. and E. Baker, *Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism.* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(3): p. 292-6.
72. Lambert, L.A., *Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 244-55.
73. McClelland, A., L.C. Kuhn, and F.H. Ruddle, *The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence.* Cell, 1984. **39**(2 Pt 1): p. 267-74.
74. Schneider, C., et al., *Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence.* Nature, 1984. **311**(5987): p. 675-8.
75. Ponka, P. and C.N. Lok, *The transferrin receptor: role in health and disease.* Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1111-37.
76. Young, S.P., A. Bomford, and R. Williams, *The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes.* Biochem J, 1984. **219**(2): p. 505-10.
77. Zerial, M., D. Huylebroeck, and H. Garoff, *Foreign transmembrane peptides replacing the internal signal sequence of transferrin receptor allow its translocation and membrane binding.* Cell, 1987. **48**(1): p. 147-55.
78. Williams, A.M. and C.A. Enns, *A mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycosylation sites shows reduced functionality and an*

- association with binding immunoglobulin protein.* J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17648-54.
79. Kawabata, H., et al., *Analyses for binding of the transferrin family of proteins to the transferrin receptor 2.* Br J Haematol, 2004. **127**(4): p. 464-73.
 80. Kawabata, H., et al., *Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family.* J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 20826-32.
 81. Beutler, E., *Commentary: mutations of transferrin receptor 2 (Trf-2) and iron storage disease.* Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(1): p. 294-5.
 82. Forejtnikova, H., et al., *Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis.* Blood, 2010. **116**(24): p. 5357-67.
 83. Lambert, L.A. and S.L. Mitchell, *Molecular evolution of the transferrin receptor/glutamate carboxypeptidase II family.* J Mol Evol, 2007. **64**(1): p. 113-28.
 84. Aisen, P., *Transferrin receptor 1.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
 85. Ponka, P., C. Beaumont, and D.R. Richardson, *Function and regulation of transferrin and ferritin.* Semin Hematol, 1998. **35**(1): p. 35-54.
 86. Cheng, Y., et al., *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex.* Cell, 2004. **116**(4): p. 565-76.
 87. Klausner, R.D., et al., *Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2263-6.
 88. Bali, P.K., O. Zak, and P. Aisen, *A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin.* Biochemistry, 1991. **30**(2): p. 324-8.
 89. Sipe, D.M. and R.F. Murphy, *Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH.* J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8002-7.
 90. Ohgami, R.S., et al., *Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells.* Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1264-9.
 91. Fleming, M.D., et al., *Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1148-53.
 92. Lim, J.E., et al., *A mutation in Sec15l1 causes anemia in hemoglobin deficit (hbd) mice.* Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1270-3.
 93. Roy, C.N. and C.A. Enns, *Iron homeostasis: new tales from the crypt.* Blood, 2000. **96**(13): p. 4020-7.
 94. Katz, J.H., *Iron and protein kinetics studied by means of doubly labeled human crystalline transferrin.* J Clin Invest, 1961. **40**: p. 2143-52.
 95. Baynes, R.D., Y.J. Shih, and J.D. Cook, *Mechanism of production of the serum transferrin receptor.* Adv Exp Med Biol, 1994. **356**: p. 61-8.
 96. Anderson, G.J. and C.D. Vulpe, *Mammalian iron transport.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(20): p. 3241-61.
 97. Hamill, R.L., J.C. Woods, and B.A. Cook, *Congenital atransferrinemia. A case report and review of the literature.* Am J Clin Pathol, 1991. **96**(2): p. 215-8.

98. Hayashi, A., et al., *Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology*. Am J Hum Genet, 1993. **53**(1): p. 201-13.
99. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 198-201.
100. Van Gorp, H., P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, *Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1650-60.
101. Tolosano, E., et al., *Heme scavenging and the other facets of hemopexin*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(2): p. 305-20.
102. Hentze, M.W., et al., *Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism*. Cell, 2010. **142**(1): p. 24-38.
103. Severance, S. and I. Hamza, *Trafficking of heme and porphyrins in metazoa*. Chem Rev, 2009. **109**(10): p. 4596-616.
104. Khan, A.A. and J.G. Quigley, *Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 668-82.
105. Breuer, W., C. Hershko, and Z.I. Cabantchik, *The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism*. Transfus Sci, 2000. **23**(3): p. 185-92.
106. Esposito, B.P., et al., *Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2670-7.
107. Brissot, P., et al., *Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 403-10.
108. Gunshin, H., et al., *Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1258-66.
109. Li, J.Y., et al., *Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery*. Dev Cell, 2009. **16**(1): p. 35-46.
110. Li, L., et al., *Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3505-10.
111. Gelvan, D., et al., *Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway*. Blood, 1996. **88**(8): p. 3200-7.
112. Gutierrez, J.A., et al., *Functional expression cloning and characterization of SFT, a stimulator of Fe transport*. J Cell Biol, 1997. **139**(4): p. 895-905.
113. Gehrke, S.G., et al., *UbcH5A, a member of human E2 ubiquitin-conjugating enzymes, is closely related to SFT, a stimulator of iron transport, and is up-regulated in hereditary hemochromatosis*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3288-93.
114. Liuzzi, J.P., et al., *Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13612-7.
115. Oudit, G.Y., et al., *L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1187-94.
116. Gaasch, J.A., et al., *Voltage-gated calcium channels provide an alternate route for iron uptake in neuronal cell cultures*. Neurochem Res, 2007. **32**(10): p. 1686-93.

117. Edison, E.S., A. Bajel, and M. Chandy, *Iron homeostasis: new players, newer insights*. Eur J Haematol, 2008. **81**(6): p. 411-24.
118. Comporti, M., *Introduction-serial review: iron and cellular redox status*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(7): p. 565-7.
119. Greenberg, G.R. and M.M. Wintrobe, *A labile iron pool*. J Biol Chem, 1946. **165**(1): p. 397.
120. Jacobs, A., *An intracellular transit iron pool*. Ciba Found Symp, 1976(51): p. 91-106.
121. Kakhlon, O. and Z.I. Cabantchik, *The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1)*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(8): p. 1037-46.
122. Petrat, F., et al., *The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 489-502.
123. Andrews, N.C., *Iron homeostasis: insights from genetics and animal models*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(3): p. 208-17.
124. Le, N.T. and D.R. Richardson, *Potent iron chelators increase the mRNA levels of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1/WAF1), but paradoxically inhibit its translation: a potential mechanism of cell cycle dysregulation*. Carcinogenesis, 2003. **24**(6): p. 1045-58.
125. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
126. Frazer, D.M., et al., *Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis*. Gut, 2004. **53**(10): p. 1509-15.
127. Garrick, M.D., et al., *DMT1: a mammalian transporter for multiple metals*. Biometals, 2003. **16**(1): p. 41-54.
128. Fleming, M.D., et al., *Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 383-6.
129. Donovan, A., et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 191-200.
130. Ke, Y., et al., *Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. Fine-tuning of mRNA regulation?* J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23637-40.
131. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**(3): p. 285-97.
132. Leipuviene, R. and E.C. Theil, *The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(22): p. 2945-55.
133. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1012**: p. 1-13.
134. Rouault, T.A., *Post-transcriptional regulation of human iron metabolism by iron regulatory proteins*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 309-14.
135. Kato, J., et al., *Iron/IRP-1-dependent regulation of mRNA expression for transferrin receptor, DMT1 and ferritin during human erythroid differentiation*. Exp Hematol, 2007. **35**(6): p. 879-87.

136. Zoller, H., et al., *Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 488-97.
137. Richardson, D.R., et al., *The effect of redox-related species of nitrogen monoxide on transferrin and iron uptake and cellular proliferation of erythroleukemia (K562) cells*. Blood, 1995. **86**(8): p. 3211-9.
138. Fillebeen, C. and K. Pantopoulos, *Redox control of iron regulatory proteins*. Redox Rep, 2002. **7**(1): p. 15-22.
139. Zheng, L., et al., *Binding of cytosolic aconitase to the iron responsive element of porcine mitochondrial aconitase mRNA*. Arch Biochem Biophys, 1992. **299**(2): p. 356-60.
140. Recalcati, S., et al., *Oxidative stress-mediated down-regulation of rat hydroxyacid oxidase 1, a liver-specific peroxisomal enzyme*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1159-66.
141. Wang, J. and K. Pantopoulos, *Regulation of cellular iron metabolism*. Biochem J, 2011. **434**(3): p. 365-81.
142. Brittenham, G.M., *New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload*. Curr Opin Hematol, 1994. **1**(2): p. 101-6.
143. Cambos, M. and T. Scorza, *Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(1): p. 159-71.
144. Sheftel, A.D., S.F. Kim, and P. Ponka, *Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10480-6.
145. Wang, S., et al., *AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress*. J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 19976-85.
146. Knutson, M.D., et al., *Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4191-7.
147. Bratosin, D., et al., *Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review*. Biochimie, 1998. **80**(2): p. 173-95.
148. Khandelwal, S., N. van Rooijen, and R.K. Saxena, *Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation*. Transfusion, 2007. **47**(9): p. 1725-32.
149. Kiefer, C.R. and L.M. Snyder, *Oxidation and erythrocyte senescence*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(2): p. 113-6.
150. Kovtunovych, G., et al., *Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution*. Blood, 2010. **116**(26): p. 6054-62.
151. Jabado, N., et al., *Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2617-22.
152. Levine, D.S. and J.W. Woods, *Immunolocalization of transferrin and transferrin receptor in mouse small intestinal absorptive cells*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(6): p. 851-8.

153. Parmley, R.T., J.C. Barton, and M.E. Conrad, *Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor, and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli*. Br J Haematol, 1985. **60**(1): p. 81-9.
154. McKie, A.T., et al., *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science, 2001. **291**(5509): p. 1755-9.
155. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
156. Galbraith, R.A., S. Sassa, and A. Kappas, *Heme binding to murine erythroleukemia cells. Evidence for a heme receptor*. J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 12198-202.
157. Light, W.R., 3rd and J.S. Olson, *Transmembrane movement of heme*. J Biol Chem, 1990. **265**(26): p. 15623-31.
158. Arredondo, M., et al., *Heme iron uptake by Caco-2 cells is a saturable, temperature sensitive and modulated by extracellular pH and potassium*. Biol Trace Elem Res, 2008. **125**(2): p. 109-19.
159. Shayeghi, M., et al., *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell, 2005. **122**(5): p. 789-801.
160. Inoue, K., et al., *Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(3): p. G660-8.
161. Oates, P.S. and A.R. West, *Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(27): p. 4281-95.
162. Schaer, C.A., et al., *Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(2): p. 325-33.
163. Conrad, M.E., et al., *Iron absorption via the mucin-integrin mobilferrin pathway*. Trans Assoc Am Physicians, 1992. **105**: p. 133-48.
164. Conrad, M.E. and J.N. Umbreit, *Pathways of iron absorption*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 336-55.
165. Cantrill, S. and R.J. Walsh, *Iron absorption from the gastro-intestinal tract. A reassessment of the "mucosal block" theory and the influence of the rate of erythropoiesis*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1962. **40**: p. 17-23.
166. Morgan, E.H. and P.S. Oates, *Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 384-99.
167. Finch, C., *Regulators of iron balance in humans*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1697-702.
168. Simpson, R.J., *Dietary iron levels and hypoxia independently affect iron absorption in mice*. J Nutr, 1996. **126**(7): p. 1858-64.
169. Weiss, G., *Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease*. Blood Rev, 2002. **16**(2): p. 87-96.
170. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron sequestration and anemia of inflammation*. Semin Hematol, 2009. **46**(4): p. 387-93.
171. Huang, H., et al., *Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3593-9.

172. Verga Falzacappa, M.V. and M.U. Muckenthaler, *Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide*. Gene, 2005. **364**: p. 37-44.
173. Cardarelli, G. and G.M. Anatra, [*Hepcidin: a key peptide in iron metabolism*]. Minerva Med, 2003. **94**(3): p. 135-9.
174. Roetto, A., et al., *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 21-2.
175. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
176. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
177. Pigeon, C., et al., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7811-9.
178. Nemeth, E. and T. Ganz, *Regulation of iron metabolism by hepcidin*. Annu Rev Nutr, 2006. **26**: p. 323-42.
179. Shi, J. and A.C. Camus, *Hepcidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?* Dev Comp Immunol, 2006. **30**(9): p. 746-55.
180. Lou, D.Q., et al., *Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2816-21.
181. Gagliardo, B., et al., *Production of biologically active forms of recombinant hepcidin, the iron-regulatory hormone*. FEBS J, 2008. **275**(15): p. 3793-803.
182. Kartikasari, A.E., et al., *Secretion of bioactive hepcidin-25 by liver cells correlates with its gene transcription and points towards synergism between iron and inflammation signaling pathways*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(12): p. 2029-37.
183. Hunter, H.N., et al., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37597-603.
184. Nemeth, E., et al., *The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study*. Blood, 2006. **107**(1): p. 328-33.
185. Zhang, A.S., et al., *Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1509-14.
186. Liu, X.B., et al., *Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(1): p. 47-56.
187. Peyssonnaud, C., et al., *TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3727-32.
188. Nguyen, N.B., et al., *Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(3): p. L417-25.
189. Bekri, S., et al., *Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 788-96.
190. Ganz, T., *Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages*. Best Pract Res Clin Haematol, 2005. **18**(2): p. 171-82.

191. Cadet, E., et al., [*Advances in iron metabolism: a transition state*]. Rev Med Interne, 2005. **26**(4): p. 315-24.
192. Nicolas, G., et al., *Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8780-5.
193. Nicolas, G., et al., *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4596-601.
194. Rivera, S., et al., *Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1797-802.
195. Roetto, A. and C. Camaschella, *New insights into iron homeostasis through the study of non-HFE hereditary haemochromatosis*. Best Pract Res Clin Haematol, 2005. **18**(2): p. 235-50.
196. Weinberg, E.D. and J. Miklossy, *Iron withholding: a defense against disease*. J Alzheimers Dis, 2008. **13**(4): p. 451-63.
197. Rivera, S., et al., *Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2196-9.
198. Delaby, C., et al., *Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3979-84.
199. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
200. Knutson, M.D., et al., *Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1324-8.
201. Delaby, C., et al., *A physiological model to study iron recycling in macrophages*. Exp Cell Res, 2005. **310**(1): p. 43-53.
202. Ganz, T., *Hepcidin and iron regulation, 10 years later*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4425-33.
203. Brasse-Lagnel, C., et al., *Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation*. Gastroenterology, 2011. **140**(4): p. 1261-1271 e1.
204. De Domenico, I., et al., *The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(7): p. 2569-78.
205. Collins, J.F., M. Wessling-Resnick, and M.D. Knutson, *Hepcidin regulation of iron transport*. J Nutr, 2008. **138**(11): p. 2284-8.
206. Frazer, D.M. and G.J. Anderson, *The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?* Blood Cells Mol Dis, 2003. **30**(3): p. 288-97.
207. Vyoral, D. and J. Petrak, *Hepcidin: a direct link between iron metabolism and immunity*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(9): p. 1768-73.
208. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.

209. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28494-8.
210. Gao, J., et al., *Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 217-27.
211. Schmidt, P.J., et al., *The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression*. Cell Metab, 2008. **7**(3): p. 205-14.
212. Ramey, G., J.C. Deschemin, and S. Vaulont, *Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes*. Haematologica, 2009. **94**(6): p. 765-72.
213. Papanikolaou, G., et al., *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2004. **36**(1): p. 77-82.
214. Babitt, J.L., et al., *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 531-9.
215. Lin, L., Y.P. Goldberg, and T. Ganz, *Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2884-9.
216. Camaschella, C., *BMP6 orchestrates iron metabolism*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 386-8.
217. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
218. Pak, M., et al., *Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3730-5.
219. Tanno, T., et al., *High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1096-101.
220. Lakhal, S., et al., *Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1555-63.
221. Nemeth, E. and T. Ganz, *The role of hepcidin in iron metabolism*. Acta Haematol, 2009. **122**(2-3): p. 78-86.
222. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
223. Pinto, J.P., et al., *Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5727-33.
224. Nicolas, G., et al., *Hepcidin, a new iron regulatory peptide*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 327-35.
225. Peyssonnaud, C., et al., *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1926-32.
226. Silvestri, L., A. Pagani, and C. Camaschella, *Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis*. Blood, 2008. **111**(2): p. 924-31.

227. Lakhal, S., et al., *Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signaling and iron homeostasis*. J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4090-7.
228. Mastrogiannaki, M., et al., *HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1159-66.
229. Nemeth, E., et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2461-3.
230. Lee, P., et al., *Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1906-10.
231. Wrighting, D.M. and N.C. Andrews, *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3204-9.
232. Verga Falzacappa, M.V., et al., *A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells*. J Mol Med, 2008. **86**(5): p. 531-40.
233. Jurado, R.L., *Iron, infections, and anemia of inflammation*. Clin Infect Dis, 1997. **25**(4): p. 888-95.
234. Viatte, L. and S. Vaulont, *Hepcidin, the iron watcher*. Biochimie, 2009. **91**(10): p. 1223-8.
235. Roy, C.N., et al., *Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4038-44.
236. Constante, M., et al., *Repression of repulsive guidance molecule C during inflammation is independent of Hfe and involves tumor necrosis factor-alpha*. Am J Pathol, 2007. **170**(2): p. 497-504.
237. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. Science, 1999. **285**(5428): p. 736-9.
238. D'Angelo, G., *Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia*. Blood Res, 2013. **48**(1): p. 10-5.
239. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
240. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. Int Immunol, 2009. **21**(4): p. 317-37.
241. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
242. O'Neill, L.A. and C.A. Dinarello, *The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense*. Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 206-9.
243. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
244. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
245. Pifer, R., et al., *UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to Toxoplasma gondii*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3307-14.
246. Kanzler, H., et al., *Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 552-9.

247. Kim, Y.M., et al., *UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 234-8.
248. Saitoh, S. and K. Miyake, *Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 32-43.
249. O'Neill, L.A., *Immunology. After the toll rush*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1481-2.
250. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(4): p. 621-5.
251. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition in the innate immune response*. Biochem J, 2009. **420**(1): p. 1-16.
252. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
253. Willment, J.A. and G.D. Brown, *C-type lectin receptors in antifungal immunity*. Trends Microbiol, 2008. **16**(1): p. 27-32.
254. Murawski, M.R., et al., *Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1492-500.
255. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
256. Chalifour, A., et al., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1778-83.
257. Banerjee, A. and S. Gerondakis, *Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 420-4.
258. Nagase, H., et al., *Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 3977-82.
259. Werling, D., et al., *Role of bovine chemokines produced by dendritic cells in respiratory syncytial virus-induced T cell proliferation*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **87**(3-4): p. 225-33.
260. Zaru, R., et al., *The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1227-35.
261. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
262. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
263. Xu, D., H. Liu, and M. Komai-Koma, *Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(4): p. 239-46.
264. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Control of B-cell responses by Toll-like receptors*. Nature, 2005. **438**(7066): p. 364-8.
265. Meyer-Bahlburg, A., S. Khim, and D.J. Rawlings, *B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3095-101.
266. Aapro, M., et al., *Prevalence and management of cancer-related anaemia, iron deficiency and the specific role of i.v. iron*. Ann Oncol, 2012. **23**(8): p. 1954-62.

267. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
268. Saitoh, S., et al., *Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization*. Int Immunol, 2004. **16**(7): p. 961-9.
269. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 196-200.
270. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
271. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
272. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 3-9.
273. Janssens, S. and R. Beyaert, *A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(9): p. 474-82.
274. Jones, B.W., et al., *Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages*. Ann Rheum Dis, 2001. **60 Suppl 3**: p. iii6-12.
275. Okada, M. and T. Shirakawa, [*Frontier of mycobacterium research--host vs. mycobacterium*]. Kekkaku, 2005. **80**(9): p. 613-29.
276. Romano Carratelli, C., et al., *Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human beta-defensin-2 (HBD-2) induction in response to Chlamydia pneumoniae in mononuclear cells*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. **57**(2): p. 116-24.
277. Funderburg, N., et al., *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18631-5.
278. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
279. Hoebe, K., et al., *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 743-8.
280. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
281. Oshiumi, H., et al., *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 161-7.
282. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
283. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5887-94.
284. Constante, M., et al., *Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(2): p. G229-37.

285. Layoun, A. and M.M. Santos, *Bacterial cell wall constituents induce hepcidin expression in macrophages through MyD88 signaling*. *Inflammation*, 2012. **35**(4): p. 1500-6.
286. Layoun, A., et al., *Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 is required for sustained endotoxin-induced acute hypoferrremic response in mice*. *Am J Pathol*, 2012. **180**(6): p. 2340-50.
287. Schaible, U.E. and S.H.E. Kaufmann, *Iron and microbial infection*. *Nat Rev Micro*, 2004. **2**(12): p. 946-953.
288. Nevitt, T., *War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity*. *Biometals*. **24**(3): p. 547-58.
289. Collins, H.L., *Withholding iron as a cellular defence mechanism - friend or foe?* *Eur J Immunol*, 2008. **38**(7): p. 1803-6.
290. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron sequestration and anemia of inflammation*. *Sem Hematol*, 2009. **46**(4): p. 387-393.
291. Ganz, T., *Hepcidin - a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005. **18**(2): p. 171-82.
292. Constante, M., et al., *Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **291**(2): p. G229-237.
293. Weiss, G. and L.T. Goodnough, *Anemia of chronic disease*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 1011-1023.
294. Nguyen, N.B., et al., *Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **291**(3): p. L417-L425.
295. Sow, F.B., et al., *Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(4): p. 934-45.
296. Theurl, I., et al., *Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes*. *Blood*, 2008. **111**(4): p. 2392-2399.
297. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. *Int Rev Immunol*, 2011. **30**(1): p. 16-34.
298. Akira, S., K. Hoshino, and T. Kaisho, *The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses*. *J Endotoxin Res*, 2000. **6**(5): p. 383-7.
299. Miranda, C.J., et al., *Contributions of beta2-microglobulin-dependent molecules and lymphocytes to iron regulation: insights from HfeRag1(-/-) and beta2mRag1(-/-) double knock-out mice*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2847-9.
300. Yu, Y. and D.R. Richardson, *Cellular iron depletion stimulates the JNK and p38 MAPK signaling transduction pathways, dissociation of ASK1-thioredoxin, and activation of ASK1*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(17): p. 15413-15427.
301. Coppola, G., et al., *Gene expression profiling in frataxin deficient mice: Microarray evidence for significant expression changes without detectable neurodegeneration*. *Neurobiol Dis*, 2006. **22**(2): p. 302-311.
302. Jiang, W., M. Constante, and M.M. Santos, *Anemia upregulates lipocalin 2 in the liver and serum*. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. **41**(2): p. 169-174.
303. Nhu, Q.M., N. Cuesta, and S.N. Vogel, *Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in*

- murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2).* J Endotoxin Res, 2006. **12**(5): p. 285-295.
304. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4).* J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-625.
305. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 Gene.* Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-2088.
306. Nemeth, E., et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein.* Blood, 2003. **101**(7): p. 2461-3.
307. Lee, P., et al., *The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes.* Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**(25): p. 9263-5.
308. !!! INVALID CITATION !!!
309. Chaston, T., et al., *Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells.* Gut, 2008. **57**(3): p. 374-382.
310. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity.* FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-150.
311. Barthe, C., A. Hocquellet, and B. Garbay, *Bacteriostatic activity of the proregion of human hepcidin.* Protein Pept Lett, 2011. **18**(1): p. 36-40.
312. Levy, J.E., L.K. Montross, and N.C. Andrews, *Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice.* J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1209-16.
313. Allen, K.J., et al., *Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis.* N Engl J Med, 2008. **358**(3): p. 221-230.
314. Wang, L., et al., *Selective modulation of TLR4-activated inflammatory responses by altered iron homeostasis in mice.* J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3322-8.
315. Wang, L., et al., *Attenuated inflammatory responses in hemochromatosis reveal a role for iron in the regulation of macrophage cytokine translation.* J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2723-2731.
316. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation.* Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-435.
317. Weiss, G., *Iron metabolism in the anemia of chronic disease.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(7): p. 682-693.
318. Byrd, T.F. and M.A. Horwitz, *Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma.* J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 969-76.
319. Tacchini, L., et al., *Role of HIF-1 and NF-kB transcription factors in the modulation of transferrin receptor by inflammatory and anti-inflammatory signals.* J Biol Chem, 2008. **283**(30): p. 20674-20686.
320. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter.* Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
321. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism.* J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
322. McKie, A.T., et al., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation.* Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 299-309.

323. Torti, S.V., et al., *The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene*. J Biol Chem, 1988. **263**(25): p. 12638-12644.
324. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
325. Pigeon, C., et al., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7811-9.
326. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.
327. Pietrangelo, A., *Molecular insights into the pathogenesis of hereditary haemochromatosis*. Gut, 2006. **55**(4): p. 564-568.
328. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 917-921.
329. Nairz, M., et al., *Absence of functional Hfe protects mice from invasive Salmonella enterica Serovar Typhimurium infection via induction of lipocalin-2*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3642-3651.
330. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-150.
331. Levy, J.E., et al., *The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele*. Blood, 1999. **94**(1): p. 9-11.
332. Gkouvatsos, K., et al., *Conditional disruption of mouse HFE2 gene: Maintenance of systemic iron homeostasis requires hepatic but not skeletal muscle hemojuvelin*. Hepatology. **54**(5): p. 1800-1807.
333. Makui, H., et al., *Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2189-95.
334. Yang, F., et al., *Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 2.
335. Theurl, I., et al., *Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications*. Blood, 2009. **113**(21): p. 5277-5286.
336. Roy, C.N., et al., *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 9022-8.
337. Drakesmith, H., et al., *The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15602-15607.
338. Giannetti, A.M. and P.J. Bjorkman, *HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25866-25875.
339. Ramos, P., et al., *Enhanced erythropoiesis in Hfe-KO mice indicates a role for Hfe in the modulation of erythroid iron homeostasis*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1379-1389.
340. Kim, S. and P. Ponka, *Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6220-6.

341. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-122.
342. Frazer, D.M., et al., *Increased hepcidin expression and hypoferraemia associated with an acute phase response are not affected by inactivation of HFE*. B J Haemat, 2004. **126**(3): p. 434-436.
343. Roy, C.N., et al., *An Hfe-dependent pathway mediates hyposideremia in response to lipopolysaccharide-induced inflammation in mice*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 481-485.
344. Fleming, R.E., et al., *Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in Hfe knockout model of hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**(5): p. 2707-2711.
345. Devireddy, L.R., et al., *A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production*. Cell, 2010. **141**(6): p. 1006-1017.
346. Bao, G., et al., *Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex*. Nat Chem Biol. **6**(8): p. 602-609.
347. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-643.
348. Chiou, P.P., et al., *Characterization of virus/double-stranded RNA-dependent induction of antimicrobial peptide hepcidin in trout macrophages*. Developmental & Comparative Immunology, 2007. **31**(12): p. 1297-1309.
349. Knutson, M.D., et al., *Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4191-4197.
350. Harada, N., et al., *Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages*. Archives of Biochemistry and Biophysics. **508**(1): p. 101-109.
351. Marro, S., et al., *Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter*. Haematologica. **95**(8): p. 1261-1268.
352. Lymboussaki, A., et al., *The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTPI gene expression*. Journal of Hepatology, 2003. **39**(5): p. 710-715.
353. Liu, X.-b., P. Hill, and D.J. Haile, *Role of the ferroportin iron-responsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 315-326.
354. Kim, S. and P. Ponka, *Nitrogen monoxide-mediated control of ferritin synthesis: Implications for macrophage iron homeostasis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. **99**(19): p. 12214-12219.
355. Brissot, P., et al., *Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 403-410.
356. Ganz, T. and E. Nemeth, *Hepcidin and iron homeostasis*. Biochim Biophys Acta 2012. **1823**(9): p. 1434-1443.
357. Robbins, E. and T. Pederson, *Iron: its intracellular localization and possible role in cell division*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(4): p. 1244-51.

358. Le, N.T. and D.R. Richardson, *The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1603**(1): p. 31-46.
359. Andriopoulos, B., Jr., et al., *BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism*. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 482-7.
360. Xia, Y., et al., *Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin*. *Blood*, 2008. **111**(10): p. 5195-204.
361. Wang, R.H., et al., *A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression*. *Cell Metab*, 2005. **2**(6): p. 399-409.
362. Babitt, J.L., et al., *Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(7): p. 1933-9.
363. Meynard, D., et al., *Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload*. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 478-81.
364. Kautz, L.o., et al., *Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1503-1509.
365. Makui, H., et al., *Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading*. *Blood*, 2005. **106**(6): p. 2189-2195.
366. Li, X., et al., *Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(7): p. 4643-4652.
367. Bagu, E.T. and M.M. Santos, *Friend of GATA suppresses the GATA-induced transcription of hepcidin in hepatocytes through a GATA-regulatory element in the HAMP promoter*. *J Mol Endocrinol*, 2011. **47**(3): p. 299-313.
368. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-820.
369. Corradini, E., et al., *Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice*. *Hepatology*, 2011. **54**(1): p. 273-84.
370. Ramos, E., et al., *Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice*. *Hepatology*, 2011. **53**(4): p. 1333-1341.
371. Meynard, D., et al., *Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload*. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 478-481.
372. Kersten, C., et al., *BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1*. *BMC Immunol*, 2005. **6**: p. 9.
373. Pantopoulos, K., et al., *Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis*. *Biochemistry*, 2012. **51**(29): p. 5705-5724.
374. Besson-Fournier, C., et al., *Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling*. *Blood*, 2012. **120**(2): p. 431-9.
375. Lee, M.H. and R.T. Means, Jr., *Extremely elevated serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance*. *Am J Med*, 1995. **98**(6): p. 566-71.

376. Turnbull, A.J., et al., *The prevalence of hereditary haemochromatosis in a diabetic population*. QJM, 1997. **90**(4): p. 271-5.
377. Torti, S.V. and F.M. Torti, *Iron and ferritin in inflammation and cancer*. Adv Inorg Biochem, 1994. **10**: p. 119-37.
378. Acton, R.T., et al., *Relationships of serum ferritin, transferrin saturation, and HFE mutations and self-reported diabetes in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) study*. Diabetes Care, 2006. **29**(9): p. 2084-9.
379. Jacobs, E.M., et al., *Severity of iron overload of proband determines serum ferritin levels in families with HFE-related hemochromatosis: the HEMochromatosis FAmily Study*. J Hepatol, 2009. **50**(1): p. 174-83.
380. Brittenham, G.M., et al., *Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major*. Am J Hematol, 1993. **42**(1): p. 81-5.
381. Camaschella, C., *Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3710-7.
382. Rachmawati, D., et al., *Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators*. Contact Dermatitis, 2013. **68**(6): p. 331-8.
383. Schmidt, M., et al., *Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 814-9.
384. Kautz, L., et al., *Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1503-9.
385. Theurl, I., et al., *Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2392-9.
386. Nemeth, E., *Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias*. Adv Hematol, 2010. **2010**: p. 750643.
387. Bagu, E.T., et al., *Friend of GATA and GATA-6 modulate the transcriptional up-regulation of hepcidin in hepatocytes during inflammation*. Biometals, 2013. **26**(6): p. 1051-65.
388. Armitage, A.E., et al., *Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli*. Blood, 2011. **118**(15): p. 4129-39.
389. Zhang, X. and B.H. Rovin, *Hepcidin expression by human monocytes in response to adhesion and pro-inflammatory cytokines*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1800**(12): p. 1262-7.
390. Rodriguez, R., et al., *Hepcidin Induction by Pathogens and Pathogen-Derived Molecules Is Strongly Dependent on Interleukin-6*. Infect Immun, 2013.
391. Andrews, N.C., *Forging a field: the golden age of iron biology*. Blood, 2008. **112**(2): p. 219-30.
392. Muckenthaler, M.U., B. Galy, and M.W. Hentze, *Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network*. Annu Rev Nutr, 2008. **28**: p. 197-213.
393. Cairo, G., F. Bernuzzi, and S. Recalcati, *A precious metal: Iron, an essential nutrient for all cells*. Genes Nutr, 2006. **1**(1): p. 25-39.
394. Zhang, Z., et al., *Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses*. Blood, 2011. **118**(7): p. 1912-22.

395. De Domenico, I., et al., *Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2395-405.
396. Knutson, M.D., *Steap proteins: implications for iron and copper metabolism*. Nutr Rev, 2007. **65**(7): p. 335-40.
397. Gross, C.N., et al., *Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22068-74.
398. Milward, E.A., et al., *Is HFE involved in increased hepcidin expression and hypoferremia in inflammation and anemia of chronic disease?* Hepatology, 2005. **41**(4): p. 936-8.
399. Baynes, R., et al., *The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein*. Scand J Clin Lab Invest, 1986. **46**(7): p. 695-704.
400. Rogers, J.T., *Ferritin translation by interleukin-1 and interleukin-6: the role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2525-37.
401. Torti, S.V., et al., *The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene*. J Biol Chem, 1988. **263**(25): p. 12638-44.
402. Srinivasan, G., et al., *Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin-induced sepsis*. J Immunol, 2012. **189**(4): p. 1911-9.
403. Deschemin, J.C. and S. Vaulont, *Role of hepcidin in the setting of hypoferremia during acute inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61050.
404. Weiss, G., *Iron metabolism in the anemia of chronic disease*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(7): p. 682-93.
405. Moldawer, L.L., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo*. FASEB J, 1989. **3**(5): p. 1637-43.
406. Xiong, S., et al., *Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 17646-54.
407. Yang, F., et al., *Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39786-91.
408. Yeh, K.Y., M. Yeh, and J. Glass, *Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G385-94.
409. Bloomer, S.A., et al., *Altered expression of iron regulatory proteins with aging is associated with transient hepatic iron accumulation after environmental heat stress*. Blood Cells Mol Dis, 2014. **52**(1): p. 19-26.
410. Bloomer, S.A., K.C. Kregel, and K.E. Brown, *Heat stress stimulates hepcidin mRNA expression and C/EBPalpha protein expression in aged rodent liver*. Arch Gerontol Geriatr, 2014. **58**(1): p. 145-52.
411. Huang, S., et al., *MCPIP1 negatively regulates toll-like receptor 4 signaling and protects mice from LPS-induced septic shock*. Cell Signal, 2013. **25**(5): p. 1228-34.

412. Zhao, M., et al., *Folic acid supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced neural tube defects in mice*. *Toxicol Lett*, 2014. **224**(2): p. 201-8.