



HAL
open science

Rôle de PAR2 et des macrophages dans la régulation de l'hepcidine

Mathieu Berger

► **To cite this version:**

Mathieu Berger. Rôle de PAR2 et des macrophages dans la régulation de l'hepcidine. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Toulouse, 2024. Français. ⟨NNT : 2024TLSES402⟩. ⟨tel-05024611v2⟩

HAL Id: tel-05024611

<https://hal.science/tel-05024611v2>

Submitted on 16 Mar 2026

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

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



HAL Authorization

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Rôle de PAR2 et des macrophages dans la régulation de
l'hepcidine

Thèse présentée et soutenue, le 23 octobre 2024 par

Mathieu BERGER

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

Physiopathologie

Unité de recherche

IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive

Thèse dirigée par

Delphine MEYNARD

Composition du jury

M. Claude KNAUF, Président, Université de Toulouse III - Paul Sabatier

Mme Florence APPARAILLY, Rapporteuse, INSERM Occitanie Méditerranée

M. Gérald LE GAC, Rapporteur, Université de Bretagne Occidentale

M. Edouard BARDOU-JACQUET, Rapporteur, Université de Rennes

Mme Céline DERAISON, Examinatrice, INSERM Occitanie Pyrénées

Mme Delphine MEYNARD, Directrice de thèse, INSERM Occitanie Pyrénées

REMERCIEMENTS

L'aboutissement d'un projet aussi exigeant qu'une thèse ne peut être le fruit d'un travail solitaire. Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance d'être encadré, épaulé, conseillé, et motivé par de nombreuses personnes, chacune ayant apporté une contribution unique à ce parcours. Certaines, sans même s'en apercevoir, ont joué un rôle essentiel, par leur simple présence, leur soutien discret ou simplement en me permettant de penser à tous sauf à ce travail. Par ces quelques lignes (pages..), je tiens à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont fait partie de cette aventure et m'ont permis de franchir chaque étape de ce projet exigeant.

Chronologiquement, cette aventure a débuté lors de mes deux premiers stages de master avec le **Dr. Claire Racaud Sultan**. C'est ainsi que j'ai découvert le monde de la recherche et commencé à prendre mes marques au 5^{ème} étage du laboratoire. **Claire**, je te remercie pour m'avoir transmis une partie de cette passion qui te résume tant, j'espère avoir sérieusement porté le sac à dos.

Puis, après deux années de master et de stages à l'IRSD, un nouveau chapitre s'est écrit, lorsque le **Dr. Delphine Meynard** m'a proposé un sujet de thèse. Sans réelle attente au départ, elle a su me convaincre et c'est ainsi que j'ai migré de quelques dizaines de mètres dans ce couloir du 5^{ème}, pour rejoindre son équipe et le monde du fer. Je te remercie **Delphine** pour m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet, pour m'avoir formé et permis de décrocher mon propre financement en obtenant le concours de l'école doctorale. Et surtout, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris tout au long de ce projet. Grâce à cela, j'ai pu aiguïser mon esprit critique, acquérir une méthodologie et développer des qualités de présentation à l'oral, ce qui m'a notamment permis de pouvoir, à plusieurs reprises, parler de mes travaux lors de congrès. J'aimerais également ajouter que certains étudiants auraient pu trouver inconfortable de se retrouver dans le même bureau que son encadrant(e), cela n'a pas été le cas pour moi et je garderai un excellent souvenir de notre relation ainsi que de tous nos échanges. Je sors grandi de cette expérience et tu as grandement contribué à cela, je te remercie encore et te souhaite le meilleur dans ton nouveau projet professionnel.

Si cette histoire a un début, elle a aussi une fin, ou plutôt un aboutissement, symbolisé par la validation de mon doctorat par l'ensemble des membres de mon jury de thèse. Ainsi j'aimerais remercier les **Dr. Apparilly Florence, Dr. Bardou-Jacquet Edouard, Dr. Le Gac Gerald, Dr. Deraison Céline et Dr. Knauf Claude** pour le temps précieux qu'ils ont investi dans la lecture de ce manuscrit, l'évaluation de ces travaux et pour la discussion enrichissante qui en a découlé et par la même occasion fait couler quelques gouttes de sueur sur mon front.

J'aimerais avoir une attention particulière pour le **Dr. Claude Knauf**, qui après un échange furtif par téléphone pendant la période de candidature aux masters à l'été 2019, avait accepté de m'intégrer au sien, malgré ma 17ème place sur liste d'attente. Ce choix m'a mené jusqu'à écrire aujourd'hui ces remerciements de thèse, confirmant qu'il était le bon. Ce détail aurait dû rester entre nous, mais après tout, qui lira réellement ce manuscrit ? À part, peut-être, quelques étudiants qui viendront me piquer un paragraphe ou deux, pour avancer plus vite dans l'écriture de leur thèse.

Par ces mots, je voudrais ensuite remercier chaleureusement tous les membres de mon équipe pour leur accueil bienveillant et leur soutien tout au long de cette aventure. Leur disponibilité, leurs précieux conseils et l'esprit de collaboration dont ils ont fait preuve ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Chloé, ma fidèle acolyte, que j'ai parfois aimé autant que détesté (est-ce cela, la vraie passion ?). Merci infiniment Chlo, pour tout l'investissement que tu as mis du début à la fin de ma thèse. Ton aide précieuse lors des manip et tes brillantes suggestions ont considérablement enrichi ce projet. Au-delà de la science, merci pour tous ces moments de partage que l'on a pu avoir pendant 3 ans (en face ou à travers le mur qui séparait nos bureaux), à parler cuisine, sport de montagne et autres Saint-Jacques de Compostelle.

Céline, merci pour ta bonne humeur permanente et l'ambiance explosive que tu sais mettre dans le labo, tes jeux de mots pourris me manqueront certainement. J'en profite pour te préciser que tu recevras la facture de mon sonotone d'ici 15 à 20 ans. Un grand merci pour ton aide dans mes manip, ton expertise d'ingénieure m'aura été d'une grande aide.

Anaïs, tu as été un vrai soutien pendant deux ans et j'ai beaucoup apprécié tous les moments que l'on a partagés, dans le labo, nos bureaux ou encore en congrès. Au moment où j'écris ces mots je sais que tu vas sûrement rejoindre l'équipe que j'ai récemment intégré, sache que j'en suis très heureux.

Merci à **Mégane** pour m'avoir formé sur toutes les techniques lorsque je suis arrivé mais surtout pour avoir réussi à me supporter à mes débuts. Cela a été un plaisir de te côtoyer pendant la première année de ma thèse.

A **Francesco**, la personne que j'ai le plus entendu prononcer/marteler le mot « intégrité ». Merci François pour tes suggestions sur mes expériences de culture de macrophages. Je garderai précieusement les protocoles et autres bouquins que tu m'as laissés. Merci également pour les nombreux échanges que l'on a pu avoir et à un de ces quatre peut être sur ton île de l'océan Indien !

Merci également **Hélène** et **Marie-Paule** de m'avoir autant challengé lors de ma préparation à l'école doctorale et merci pour vos questions et conseils tous les lundis après-midi en réunion pour faire avancer ce projet.

Enfin, merci à la team Bio info, **Jean, Sarah et Mathis**, votre calme et votre gentillesse font de votre bureau un véritable petit havre de paix. Merci d'avoir pris le temps d'essayer de comprendre mon sujet en me posant tout un tas de questions souvent très pertinentes les lundis en réunion d'équipe. Je suis heureux d'avoir fait votre connaissance et de vous avoir côtoyé ces 3 années.

J'aimerais ensuite porter une attention particulière aux cheffes de l'équipe 1 dans laquelle j'ai réalisé mes premières classes : les **Dr. Nathalie Vergnolle et Céline Deraison**. Je voudrais vous remercier pour votre accueil lorsque je suis arrivé à l'institut pour y effectuer mes stages de master. Vous avez dès lors toujours été disponibles pour discuter, que cela concerne mes différents projets scientifiques mais aussi mon parcours professionnel. Vos conseils ont notamment pu aiguiller certaines de mes décisions concernant mon projet de thèse. Merci pour vos critiques, souvent très justes et vos encouragements, toujours très motivants. J'ai beaucoup de respect envers vous et je tiens encore une fois à vous exprimer ma profonde gratitude.

Un grand merci aux **autres membres de l'équipe 1** présents à mes débuts de stage et que j'ai continué à côtoyer au 5^{ème} durant ma thèse. Je pense aux ingés : **Anissa, Coco, Laura**, qui m'ont aperçu maintes et maintes fois venir piquer de la nourriture dans leur bureau. Merci de m'avoir accordé du temps lorsque j'en avais besoin pour être formé ou conseillé sur diverses manips. Merci aux chercheurs : **Chrystelle, Agnès** ou encore **Jean-Paul** avec qui j'ai pu avoir de beaux échanges et dont l'expertise a toujours été la bienvenue. Merci également à **Alexia, Guillaume** et **Romain** pour votre bonne humeur et votre sympathie !

Et enfin **Simon**, merci mon pote pour tous tes conseils de doctorant expérimenté, tu as souvent été disponible tant pour m'aider que pour me faire marrer, ce qui est tout aussi important à mes yeux. J'ai soutenu un 23 octobre, le même jour que toi, en essayant le plus possible de marcher dans tes pas. Je te souhaite le meilleur chez les ricains.

Pour continuer, il est impossible d'écrire des remerciements de thèse sans citer un par un les membres de la team Zozos qui ont largement participé à mon bien être et ma plénitude durant ces trois années de thèse.

MD, érudite à plein temps et reine de la bioch, ce fut un privilège de te côtoyer au 5^{ème} étage de l'institut ! (Bien que notre rencontre ait été trop tardive à mon goût). Sache que nos discussions alliant subtilement savoir et beaufitude me manqueront beaucoup. Petite mention spéciale au temps que tu as consacré dans la révision de mon manuscrit où tel un radar tu as su venir à bout des centaines de fautes d'orthographe que j'avais glissées un peu partout, et cela avec la rigueur qui te définit tant. Un bel avenir t'attend au pays de la biochimie dans lequel je suis sûr que tu t'épanouiras. Tout simplement.

MP, tu es sans nul doute la normande la plus drôle de France. Merci pour tout ce que tu m'as apporté depuis ton arrivée au lab. Je crois ne pas trop me tromper en affirmant que tu es rapidement devenue un élément essentiel pour beaucoup de gens ici et avoir une MP dans mon quotidien a été un véritable bonheur bien que de temps en temps j'ai pu recevoir quelques coups, avec ton caractère de démon. Je te remercie tout particulièrement pour ce super diapo de thèse et je te souhaite un bel et brillant avenir avec tes petites bactéries que tu connais par cœur.

Julie, je suis heureux que nos chemins aient pris des directions assez proches ces 5 dernières années, avec ce master SDN, nos stages et enfin par nos travaux respectifs en tant qu'ingénieure et doctorant au sein de l'IRSD. J'ai ainsi pu tisser des liens avec toi et découvrir une personnalité forte et attachante. Merci beaucoup Ju pour tous ces moments de joie que l'on a partagés, tu fais partie de ces gens qu'on est content de retrouver le matin quand on arrive au travail. Je suis particulièrement heureux pour toi et l'obtention de ce poste, tu le mérites beaucoup.

Romain, tu es quelqu'un qu'on a envie de côtoyer de part ton côté jovial et ton rire communicatif. Tu as activement participé à mon bien être au labo et je te remercie beaucoup pour cela. N'oublie jamais que tu fais partie du clan de ceux qui portent le sac à dos et cela, ça n'a pas de prix. Je te remercie également pour m'avoir formé au bench, aux black-bass et aux jagger-bombs (avec l'aide précieuse de David).

David, « ohlolololo », il s'en est passé du chemin entre le moment où tu m'as formé pour la première fois à la biomol lors de mon stage de M1 et aujourd'hui où tu es responsable d'une plateforme organoïde. Je ne suis pas surpris de ce beau parcours car au-delà d'être un humain au top (et un véritable beauf), tu es également un scientifique de qualité. Merci le Dave pour tous ces beaux moments passés avec toi et probablement pas les derniers !

Astrid, tu clos mes remerciements concernant la team de la plateforme dont tu es la dernière arrivante. Merci pour ces moments sympas, partagés autour d'un café ou d'un mojito. Merci également d'avoir encaissé toutes ces petites piques sans jamais te vexer et toujours avec une belle répartie.

Ivana, un petit mot pour my favorite Italian girl. C'était court mais c'était un plaisir de faire ta connaissance et te côtoyer pendant quelques mois au labo. Spero di avere l'opportunità di venire ad assistere alla tua discussione della tesi a Napoli (si c'est mal traduit il faudra s'en prendre à chatgpt).

Une dédiCAS (elle est pour toi Céline) à **Alexia, Céline, Nadège, Louise, Déborah, Jean, David, Augustin, François, Lionel et Melvin**. Je garderai en souvenir nos réunions mensuelles et tous les moments où nous avons dû organiser/planifier les événements de l'institut. Ces moments conviviaux, toujours agrémentés de rires et de partages ont embelli mes années de thèse et ont souvent contrasté avec la frustration et le stress d'un tel projet. Je vous remercie pour cela.

Un grand merci aux autres membres de l'institut, avec lesquels j'ai beaucoup échangé pendant toute ma thèse, je pense notamment à **Léon, Gilles** et **Nicolas**. J'aimerais aussi remercier **Jean, Thanina** et **Manon**, ainsi que **Sarah, Louise** et **Léa**. Pour certains, la géographie de l'institut fait que nous nous sommes moins croisés mais j'ai beaucoup apprécié nos interactions.

Enfin je remercie **Laurence, Augustin** et **Lydia** pour avoir souvent été très réactifs dans la gestion administrative de mes différentes demandes et pour avoir apporté des solutions à mes divers problèmes.

Pour clore ces remerciements, j'aimerais dédier cette thèse à tous mes proches en dehors du laboratoire qui m'accompagnent depuis tant d'années : **Mes parents, mes frères et sœurs, le reste de ma famille**, ainsi que **tous mes amis**, je sais que vous vous reconnaitrez en lisant ces mots. Il me faudrait sans doute ajouter une bonne dizaine de pages à ces remerciements si je devais prendre le temps d'écrire sur chacun d'entre vous. Alors à défaut de développer ici, je me contenterai de vous dire merci, du fond du cœur. Merci pour votre soutien indéfectible, vos encouragements dans les moments de doute, votre patience lorsque j'étais moins présent et surtout, merci d'avoir toujours cru en moi, parfois plus que moi-même. Votre amour a été un moteur, et sans vous, cette période de ma vie n'aurait pas été la même. Je suis extrêmement chanceux et reconnaissant d'être entouré par vous.

Cette thèse, en quelque sorte, c'est aussi la vôtre.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES.....	11
LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES TABLEAUX.....	22
INDEX DES ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	25
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION AU METABOLISME DU FER.....	25
I. Importance du fer chez les mammifères.....	25
II. Processus d'absorption duodénale du fer	27
III. Transport et acquisition du fer dans les cellules.....	29
1. Transport du fer dans la circulation sanguine	29
2. Acquisition du fer par les cellules de l'organisme	30
IV. Mécanisme de recyclage du fer par les macrophages	33
CHAPITRE 2 : L'HEPCIDINE, CHEF D'ORCHESTRE DE L'HOMEOSTASIE MARTIALE	36
I. Introduction autour de l'hepcidine.....	37
1. Découverte et lien avec l'homéostasie du fer.....	37
2. Synthèse et localisation.....	38
3. Mode d'action de l'hepcidine : l'axe hepcidine-ferroportine	38
4. Action locale de l'hepcidine	41
5. Régulation de l'expression de l'hepcidine	42
II. Régulation positive de l'hepcidine	44

1.	Régulation par le fer plasmatique et hépatique.....	44
2.	Régulation par l'inflammation	48
III.	Régulation négative de l'hepcidine par l'érythropoïèse	50
1.	L'érythropoïèse.....	50
2.	Régulation négative de l'hepcidine par l'érythropoïèse.....	53
IV.	Fonction de la matriptase-2 dans la régulation négative de l'hepcidine	60
1.	Description : structure, localisation et fonction principale	60
2.	Mécanisme de régulation de l'hepcidine par la matriptase-2 dans le foie	61
3.	Régulation de la matriptase-2 hépatique.....	63
4.	Expression de la matriptase-2 dans les autres tissus	63
V.	Pathologies liées à une dérégulation du métabolisme du fer	64

CHAPITRE 3 : PAR₂, RECEPTEUR ACTIVE PAR LES PROTEASES..... 66

I.	Introduction générale sur les PAR	67
1.	Qu'est-ce que les PAR ?	68
2.	Structure génique et protéique des PAR	68
3.	Mécanismes d'activation principaux des PAR	70
II.	Introduction générale sur le récepteur PAR ₂	72
1.	Description générale, structure et localisation du récepteur PAR ₂	72
2.	Activation/Inhibition de PAR ₂	73
3.	Signalisation en aval de PAR ₂	74
III.	Le récepteur PAR ₂ régule diverses fonctions physiologiques	76
1.	Introduction au rôle de PAR ₂ dans l'organisme.....	76
2.	Rôle physiopathologique de PAR ₂ dans les macrophages	78

CHAPITRE 4 : LES MACROPHAGES DANS LA REGULATION DU METABOLISME DU FER..... 80

I.	Les macrophages, cellules myéloïdes de l'immunité innée, résidentes des tissus.....	81
1.	Fonctions, hétérogénéité et développement des macrophages tissulaires	81
2.	Description des autres cellules de la lignée myéloïde	85
II.	Fonctions des macrophages dans la régulation de l'homéostasie martiale	89
1.	Les cellules de Kupffer : macrophages résidents du foie aux fonctions spécialisées dans la régulation du métabolisme du fer.....	90

2.	Recyclage des globules rouges par les macrophages de la pulpe rouge dans la rate.....	103
3.	Rôle trophique des macrophages de la moelle osseuse dans l'érythropoïèse.....	104
III.	Démonstration des liens entre macrophages et hepcidine	105
1.	Expression de l'hepcidine par les macrophages	105
2.	Les KC inhibent-ils l'hepcidine ?	106
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS		108
MATERIELS ET METHODES		110
I. MODELES <i>IN VIVO</i>.....		110
1.	Animaux.....	110
2.	Modèle d'induction d'un stress érythropoïétique	112
1.	Anémie induite par la phlébotomie	112
2.	Stimulation de l'érythropoïèse par injection d'EPO recombinante	112
3.	Modèle d'inflammation induite par injection de LPS.....	113
4.	Modèle de déplétion des macrophages par injection de toxine diphtérique	113
5.	Mise à mort des animaux et prélèvement d'échantillons biologiques	113
II. MODELES <i>IN VITRO</i>		115
1.	Production de milieu conditionné par la lignée cellulaire L929.....	115
2.	Culture de macrophages dérivés des cellules souches de moelle osseuse	115
3.	Culture d'hépatocytes primaires	116
1.	Isolément et ensemencement des hépatocytes primaires	116
2.	Traitement des cellules.....	117
4.	Isolément <i>ex vivo</i> des cellules non-parenchymateuses du foie	117
III. TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....		119
1.	Analyse de la transcription des gènes.....	119
1.	Extraction des ARN tissulaires/cellulaires	119
2.	Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires	120

3.	PCR quantitative.....	120
2.	Cytométrie en flux.....	123
1.	Principe général et anticorps utilisés pour l'ensemble des expériences de cytométrie	123
2.	Analyse de la différenciation érythroïde dans la moelle osseuse et la rate	125
3.	Etude quantitative des cellules non-parenchymateuses du foie	128
3.	Quantification protéique par Western Blot.....	129
4.	Dosage de fer	130
1.	Dosage du contenu en fer sérique	130
2.	Dosage du contenu en fer hépatique	131
IV.	ANALYSES STATISTIQUES	132
	RESULTATS	133
	PARTIE I : EXPLORATION DU ROLE DU RECEPTEUR PAR₂ DANS LA REGULATION DE L'HEPCIDINE	133
I.	Introduction, enjeux et hypothèses de recherche.....	133
II.	Résultats : Effet d'une délétion totale du gène du récepteur PAR ₂ sur la régulation de l'hepcidine 134	
1.	Les embryons PAR ₂ déficients sont anémiques et surexpriment l'hepcidine	134
2.	En condition physiologique, les souris PAR ₂ KO adultes ne présentent pas d'anomalie de l'expression de l'hepcidine par rapport aux WT.....	136
3.	La délétion de PAR ₂ chez l'adulte réduit la suppression de l'hepcidine en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie.....	138
4.	La délétion de PAR ₂ n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie 140	
III.	Résultats : Effet d'une délétion spécifique de PAR ₂ dans les macrophages sur la régulation de l'hepcidine.....	143
1.	Le récepteur PAR ₂ n'est pas exprimé dans les hépatocytes mais plutôt dans les cellules non parenchymateuses.....	143
2.	En condition physiologique, la délétion de PAR ₂ dans les macrophages n'a aucun impact sur le phénotype des souris adultes.....	145
3.	Les souris <i>F2r1^{LysM}</i> récapitulent le phénotype du KO total en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie.....	147

4. La délétion de PAR ₂ dans les macrophages n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie	149
IV. Conclusion	151

PARTIE 2 : ETUDE DE L'IMPACT DE L'ANEMIE INDUITE PAR LA PHLEBOTOMIE SUR LES POPULATIONS DE MACROPHAGES HEPATIQUES **152**

I. Introduction, hypothèses et axes de recherche	152
II. Résultats : Identification des populations myéloïdes hépatiques par cytométrie en flux	154
1. Développement d'un panel d'anticorps et d'une méthode d'analyse pour étudier les populations myéloïdes LysM ⁺ du foie par cytométrie en flux	154
2. Différentes populations de cellules myéloïdes cohabitent dans le foie	157
III. Résultats : Effet de l'anémie induite par la phlébotomie sur les populations de macrophages dans le foie	160
1. L'anémie induite par la phlébotomie induit une légère infiltration de monocytes dans le foie des souris C57Bl/6J	160
2. L'anémie induite par la phlébotomie n'entraîne pas d'augmentation de macrophages transitoires dans le foie	163
3. Les niveaux de neutrophiles hépatiques témoignent d'un statut sanitaire altéré qui a constitué un biais pour l'analyse des populations hépatiques.....	168
4. Effet d'une délétion de PAR ₂ dans les macrophages sur les populations myéloïdes hépatiques en réponse à la phlébotomie.....	171
IV. Conclusion	174

PARTIE 3 : CARACTERISATION DU ROLE DES MACROPHAGES DANS LA REGULATION DE L'HEPCIDINE **175**

I. Introduction et hypothèses de recherche	175
II. Résultats : Effets et conséquences de la déplétion des macrophages sur la régulation de l'expression de l'hepcidine.....	176
1. L'injection de la DTX aux souris <i>LysM^{DTR}</i> supprime efficacement les cellules de Kupffer dans le foie.....	176
2. La déplétion des macrophages par la toxine diphtérique induit une forte augmentation de l'hepcidine	179

III. Résultats : Effet de la déplétion des macrophages sur la régulation de l'hepcidine hépatique en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie	182
1. La combinaison des injections de DTX avec les phlébotomies n'altère pas la suppression des macrophages ni l'anémie induite aux souris <i>LysM^{DTR}</i>	182
2. La suppression de l'hepcidine par les hépatocytes en réponse à la phlébotomie est totalement abolie en l'absence de macrophages	184
IV. Résultats : Etude d'un biais inflammatoire associé à la déplétion des macrophages dans le modèle <i>LysM^{DTR}</i>	186
1. La déplétion des macrophages hépatiques par la DTX induit le recrutement de monocytes pouvant produire des signaux inflammatoires dans le tissu hépatique	186
2. L'inflammation associée à la déplétion des macrophages ne peut expliquer une augmentation aussi importante de l'expression de l'hepcidine hépatique	189
V. Résultats préliminaires : Effet des macrophages sur la régulation de l'hepcidine hépatocytaire : mise en évidence <i>in vitro</i> de la sécrétion de signaux inhibiteurs	192
1. Stratégie <i>in vitro</i> pour étudier la sécrétion d'une molécule inhibitrice par les macrophages .	192
2. Les macrophages produisent une molécule qui inhibe l'expression de l'hepcidine	194
VI. Conclusion	197

PARTIE 4 (PROJET SECONDAIRE) : EXPLORATION DU ROLE DE LA MATRIPTASE-2 HEPATOCYTAIRE DANS LA REGULATION DE L'HEPCIDINE

I. Introduction, hypothèse et axes de recherches	198
II. Résultats : Effet d'une délétion spécifique du gène <i>Tmprss6</i> dans les hépatocytes	200
1. La délétion spécifique de <i>Tmprss6</i> dans les hépatocytes induit une surexpression de l'hepcidine à des niveaux identiques aux souris KO total	200
2. La délétion spécifique de <i>Tmprss6</i> dans les hépatocytes récapitule en totalité le phénotype d'anémie ferriprive, décrit chez les KO total	202
3. La déficience en MT2 hépatocytaire des souris <i>Tmprss6^{Alb}</i> abolit la suppression de l'hepcidine médiée par l'EPO	204
III. Conclusion	207

DISCUSSION GENERALE 208

I. EVALUATION DU ROLE DE PAR₂ DANS LA REGULATION DE L'HEPCIDINE 209

1. Quel est l'effet de PAR₂ dans la régulation négative de l'hepcidine ? 209
2. Quel est le mécanisme activateur de PAR₂ lors de l'anémie induite par la phlébotomie, permettant l'inhibition de l'hepcidine ? 211
3. Cibler PAR₂ pour traiter des pathologies associées à une dérégulation du métabolisme du fer ? 214

II. DETERMINATION DE L'IMPLICATION DES MACROPHAGES DANS LA REGULATION DE L'HEPCIDINE 215

1. Quel est le mécanisme par lequel les macrophages participent à la régulation négative de l'hepcidine en réponse à la phlébotomie ?..... 215
2. Quelle est l'importance des macrophages dans la régulation négative de l'hepcidine ?..... 217
3. Quel est donc le mécanisme inhibiteur de l'hepcidine hépatocytaire par les macrophages ?220
4. PAR₂ est-il impliqué de la production d'une molécule inhibitrice provenant des macrophages ? 222

III. CARACTERISATION DE L'IMPLICATION DE LA MATRIPTASE-2 HEPATOCYTAIRE DANS LA REGULATION DE L'HEPCIDINE..... 223

ANNEXES 227

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 229

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Absorption du fer issu de l'alimentation par les entérocytes du duodénum	28
Figure 2 : Acquisition du fer par les cellules	32
Figure 3 : Erythrophagocytose des globules rouges sénescents et recyclage du fer par les macrophages	34
Figure 4 : Régulation systémique du fer sérique par l'hepcidine	40
Figure 5 : Principaux régulateurs de l'expression de l'hepcidine	43
Figure 6 : L'érythropoïèse.....	52
Figure 7 : Mécanisme de réponse à l'anémie aiguë via la suppression de l'hepcidine par des signaux érythropoïétiques.....	55
Figure 8 : Schéma récapitulatif des différents acteurs des voies de signalisation de l'hepcidine.....	59
Figure 9 : Caractéristiques structurales des PAR	69
Figure 10 : Mécanismes d'activation et d'inhibition des PAR.....	71
Figure 11 : Signalisations principales en aval de PAR ₂	75
Figure 12 : Représentation des différents types de macrophages résidents et spécifiques de différents tissus.....	84
Figure 13 : Architecture d'un lobule hépatique	92
Figure 14 : Schématisation des différentes cellules présentes dans le microenvironnement des sinusoides hépatiques.....	94
Figure 15 : Développement des cellules de Kupffer	96

Figure 16 : Recyclage de globules rouges sénescents par des macrophages transitoires issus de monocytes Ly6C ⁺ /CCR2 ⁺	100
Figure 17 : Modèle hypothétique d'une inhibition de l'expression de l'hepcidine hépatocytaire par les KC en réponse à des signaux de leur environnement	107
Figure 18 : Représentation graphique d'une courbe d'amplification en PCRq.....	122
Figure 19 : Illustration de la stratégie de gating pour mesurer la différenciation des cellules érythroïdes.....	127
Figure 20 : Les embryons F2r1 ^{-/-} sont pâles et surexpriment le gène Hamp1 dans le foie.....	135
Figure 21 : Les souris F2r1 ^{-/-} ne sont pas anémiques et présentent des taux normaux d'hepcidine	137
Figure 22 : Les souris PAR ₂ KO ne suppriment que partiellement l'hepcidine en réponse à la phlébotomie par rapport aux souris WT	140
Figure 23 : La délétion de PAR ₂ n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie	142
Figure 24 : Expression de PAR ₂ dans le foie et développement d'un modèle de délétion dans les macrophages	144
Figure 25 : La délétion de PAR ₂ dans les macrophages n'a aucun impact sur le phénotype des souris adultes	146
Figure 26 : Les souris F2r1 ^{LysM} récapitulent le phénotype du KO total en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie	148
Figure 27 : La délétion de PAR ₂ dans les macrophages n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie	150
Figure 28 : Méthode d'analyse informatique des populations myéloïdes hépatiques étudiées par cytométrie en flux.....	157

Figure 29 : Mesure par cytométrie en flux des différentes populations de cellules myéloïdes dans le foie de souris C57Bl/6J WT	159
Figure 30 : La phlébotomie induit une légère infiltration de monocytes dans le foie des souris C57Bl/6J	162
Figure 31 : La phlébotomie n'induit pas d'infiltration de macrophages transitoires dans le foie.....	165
Figure 32 : Une diminution du pourcentage de KC est observée dans le foie en réponse à la phlébotomie	167
Figure 33 : Quantification de l'infiltration de neutrophiles et mesure de marqueurs inflammatoires dans le foie en réponse à la phlébotomie.....	170
Figure 34 : Effet d'une délétion de PAR ₂ dans les macrophages sur les populations myéloïdes hépatiques en réponse à la phlébotomie.....	173
Figure 35 : Développement d'un modèle de suppression inductible des macrophages	179
Figure 36 : La déplétion des macrophages par la DTX a induit une très forte surexpression du gène de l'hepcidine dans le foie des souris LysM ^{iDTR}	181
Figure 37 : La déplétion des macrophages n'a pas d'incidence sur les paramètres hématologiques après phlébotomie.....	183
Figure 38 : La déplétion des macrophages par la DTX abolit totalement la suppression de l'hepcidine en réponse à la phlébotomie	185
Figure 39 : La suppression des KC par la DTX induit le recrutement de monocytes dans le foie et une légère inflammation locale dans le tissu.....	188
Figure 40 : L'inflammation associée à la suppression des cellules de Kupffer ne peut expliquer une augmentation aussi importante de l'expression de l'hepcidine hépatique	191

Figure 41 : Modèle in vitro permettant d'étudier la production d'un inhibiteur de l'hepcidine des hépatocytes par les macrophages (BMDM)	193
Figure 42 : La stimulation des hépatocytes par du surnageant de culture de BMDM inhibe l'expression de l'hepcidine par une voie qui semble dépendante de la signalisation BMP-SMAD.....	196
Figure 43 : Les souris <i>Tmprss6^{Alb}</i> surexpriment l'hepcidine à des niveaux identiques au KO total.....	201
Figure 44 : La délétion de la MT2 dans les hépatocytes récapitule entièrement l'anémie ferriprive microcytaire du KO ubiquitaire.....	203
Figure 45 : Les souris <i>Tmprss6^{Alb}</i> expriment <i>Erfe</i> en réponse à l'anémie mais ne répondent pas à l'EPO	206

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux marqueurs protéiques pour identifier les KC	98
Tableau 2 : listes des séquences d'amorces utilisées pour la PCRq.....	123
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux	124

INDEX DES ABREVIATIONS

ADN – Acide Désoxyribonucléique	ERFE – Erythroferrone
AGM – Aorte Gonade et mésonéphros	ERK - Extracellular signal-Regulated Kinase
ARN – Acide ribonucléique	FGL1 – Fibrinogen like 1
ATP – Adénosine Triphosphate	FPN – Ferroportine
BFU-E – Burst Forming Unit Element	FSC – Forward Scatter
BMP – Bone Morphogenic Protein	GDF – Growth Differentiation Factor
BMPR – Bone Morphogenic Protein Receptor	GDF – Gain de fonction
BMDM – Bone Marrow Derived Macrophages	GM-CSF – Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
CDK – Cyclin-Dependant Kinase	GR – Globule rouge
CE – Céruléoplasmine	Hb –Hémoglobine
CFU-E – Colony Forming Unit Element	HCP₁ – Heme Carrier Protein 1
CSF –Coloning stimulating factor	HGF – Hepatocyte Growth Factor
CSH –Cellule souche hématopoïétique	HIF – Hypoxia-inducible Factor
CTL – Contrôle	HO-1 – Heme Oxygenase 1
CXCL – CXC motif Ligand	HRE – HIF-response Element
DAMP – Danger Associated Molecular Pattern	HRG₁ – Heme-responsive Gene 1
DcytB – Duodéal Cytochrome B	ICAM – Intercellular adhesion molecule
DMT₁ – Divalent Metal Transporter 1	IFNγ – Interféron gamma
dNTP – désoxyNucléotide Triphosphate	IL – Interleukine
EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor	ILGF – Facteur de croissance analogue à l'insuline
EPO – Erythropoïétine	IRIDA – Iron Refractory Iron Deficiency Anemia
EPOR – Récepteur à l'érythropoïétine	

JAK – Janus Kinase

LAM – Lipid-associated macrophages

LCM – Liver Capsular Macrophages

LIP – Labile Iron Pool

LPS – Lipopolysaccharide

LSEC – Liver Sinusoidal Endothelial Cells

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

MO – Moelle osseuse

MT2 – Matriptase-2

NADH – Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydroxylée

NCOA₄ – Nuclear Receptor Co-Activator 4

NI – Non injecté

NTBI – Non-Transferrin Bound Iron

PAR – Protease-activated receptor

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCBP – Poly(rC) Binding Protein

PCRq – quantitative Polymerase Chain Reaction

PDGF – Platelet-Derived Growth Factor

PE – Phycoerythrin

PEM – Précurseur érythro-méloïde

PHD – Prolyl-hydroxylases

PS – Phosphatidylsérine

RCPG – Récepteur couplé aux protéines G

ROS – Reactive Oxygen Species

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RT – Reverse-Transcription

SMAD – Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic

SSC – Side Scatter

STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription

STEAP₃ – Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3

TA – Température ambiante

TL – Tethered ligand

TF – Transferrine

TF – Tissular factor

TFR – Récepteur à la Transferrine

TGF – Transforming Growth Factor

TLR – Toll-Like Receptor

Tm – Melting Temperature

TMPRSS6 – Transmembrane Protease Serine 6

TNF – Tumor Necrosis Factor

VCAM – Vascular cell adhesion molecule

VHL – Von Hippel-Lindau

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Introduction au métabolisme du fer

Il est impossible de débiter un chapitre introductif sur le métabolisme du fer sans souligner tout le caractère vital de cet oligoélément. De numéro atomique 26, ce dernier remplit un rôle essentiel pour presque tous les organismes vivants, constituant le fondement de nombreuses fonctions biologiques cruciales. Dans cette thèse, nous explorons de nouveaux acteurs de l'homéostasie du fer à travers l'étude de la régulation de l'hepcidine.

La perspective de ces travaux est d'élargir notre compréhension des mécanismes de régulation de cette hormone et ainsi ouvrir la voie à des avancées significatives dans la recherche biomédicale. Ainsi, pour comprendre tous les enjeux de ce projet, il apparaît important de poser un cadre et d'introduire ce qui est connu à ce jour sur le métabolisme du fer et ses régulateurs.

I. Importance du fer chez les mammifères

On estime qu'il est retrouvé entre 3 et 4 grammes de fer dans chaque individu adulte, présent sous la forme d'ions ferriques (Fe^{3+}) ou ferreux (Fe^{2+}). La forme ferreuse du fer est celle principalement utilisée dans les processus biologiques. Cependant, en milieu aérobie, ce fer ferreux est rapidement oxydé en fer ferrique, devenant alors peu soluble à pH neutre et réduisant ainsi sa biodisponibilité. Dans ce contexte, les organismes ont développé des mécanismes qui conservent le fer, ne perdant quotidiennement qu'une faible quantité d'environ 1 à 2mg¹. Comme expliqué précédemment, le fer est impliqué dans divers processus physiologiques importants, notamment en raison de ses propriétés redox particulières.

Tout d'abord, un des rôles majeurs du fer réside dans le transport de l'oxygène dans le sang². En effet, chez les êtres humains, le fer est principalement présent dans l'hème de l'hémoglobine (Hb) et de la myoglobine, des protéines qui assurent respectivement le transport de l'oxygène dans le système circulatoire et le stockage dans les muscles squelettiques et le myocarde. L'hème constitue un groupement prosthétique contenant un atome de fer en son centre. La biosynthèse de l'hème se déroule principalement dans deux sites, le foie et la moelle osseuse (environ 75% de l'hème est produit au sein des érythroblastes de la moelle osseuse). Dans le foie, l'hème est principalement utilisé pour la biosynthèse des cytochromes P450, des enzymes cruciales pour la métabolisation de diverses substances endogènes telles que les composés stéroïdes, les vitamines, ou encore des xénobiotiques tels que les médicaments et les toxines³.

Le rôle du fer n'est cependant pas réduit à l'oxygénation des tissus. En effet, outre son association avec l'hème, on le retrouve également complexé au soufre pour former un groupement Fe/S ou cluster Fe/S⁴. Ce complexe agit comme cofacteur dans de nombreuses réactions enzymatiques impliquées dans les fonctions fondamentales de synthèse et de réparation de l'ADN. Au sein de ces réactions, on peut citer les enzymes ADN polymérase et primase répliquatives, les ADN hélicases, les nucléases, les glycosylases et les déméthylases, ainsi que les ribonucléotides réductases. Par ailleurs, le fer joue un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire. Une déficience intracellulaire en fer conduit à l'inhibition des complexes Cdk/Cyclines, entraînant ainsi un arrêt du cycle cellulaire aux phases G1 et S⁵.

De plus, le fer est également un élément clé du métabolisme énergétique. En effet, c'est à l'intérieur des mitochondries que survient la biogénèse des clusters Fe/S. C'est par ailleurs au sein même de ces organites que ces clusters remplissent un rôle important comme cofacteur de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, comme par exemple la NADH déshydrogénase, enzyme permettant *in fine*, la production d'ATP⁶.

Pour résumer, le fer est un élément vital pour la croissance, le développement et la survie à long terme de la plupart des organismes aérobies. Cependant, bien qu'indispensable, un excès de fer peut être préjudiciable en provoquant la synthèse

de radicaux libres par le biais de la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$). Celle-ci, premièrement décrite en 1934⁷, peut engendrer de graves dommages aux cellules via la production de radicaux libres à l'origine d'un stress oxydatif². Une trop forte quantité de fer est donc délétère et pour cette raison, sa quantité doit être finement régulée dans les organismes.

II. Processus d'absorption duodénale du fer

Les mammifères sont incapables d'excréter physiologiquement le fer. La quantité journalière perdue, d'environ 1 à 2mg (moyenne des individus car cette valeur est plus élevée chez les femmes en raison des pertes sanguines menstruelles¹), doit donc être finement compensée par l'absorption intestinale, sans générer d'excès.

Dans la lumière intestinale, le fer alimentaire, présent sous forme de fer inorganique et d'hème, est capté par les entérocytes au niveau du duodénum. Le Fe^{3+} inorganique non héminique est rendu soluble en raison du faible pH de la lumière duodénale, puis il est réduit en Fe^{2+} par la ferriréductase cytochrome b duodénale (DCytB) présente sur la membrane apicale des entérocytes⁸. Enfin, il est absorbé par le transporteur de métaux divalents 1 (DMT1)⁹. Le fer lié à l'hème peut également être absorbé par les cellules intestinales, notamment par le transporteur « Heme Carrier Protein 1 » (HCP1) puis dégradé dans l'entérocyte par l'hème oxygénase (HO-1)¹⁰. Une fois à l'intérieur du cytosol, le fer sous forme Fe^{2+} peut être soit utilisé à des fins cellulaires spécifiques, soit exporté vers la circulation sanguine par le seul transporteur de fer connu à ce jour, la ferroportine (FPN)¹¹. Cette protéine est présente au pôle basal des entérocytes ainsi qu'à la surface des macrophages et des hépatocytes. Dans les entérocytes, la ferroportine est couplée à une ferrioxidase appelée héphaestine (synthétisée par le foie) qui le transforme sous sa forme ferrique Fe^{3+} avant sa libération dans la circulation sanguine.

Il est important de noter que le fer intracellulaire en excès, qui n'est ni exporté ni utilisé, forme ce qu'on appelle le « pool de fer labile » (LIP). Ce surplus est stocké dans une protéine appelée ferritine qui, de par ses propriétés, permet de maintenir le

fer dans une « cage » physique, sous une forme chimique Fe^{3+} insoluble, empêchant ainsi tout stress oxydant¹². Le transport du fer vers les ferritines est médié par des protéines chaperonnes (PCBP1 et 2)⁹. À l'inverse, le fer stocké dans la ferritine est libéré dans le cytosol par le biais du coactivateur du récepteur nucléaire cargo 4 (NCOA4), dans un processus de dégradation connu sous le nom de ferritinophagie¹³.

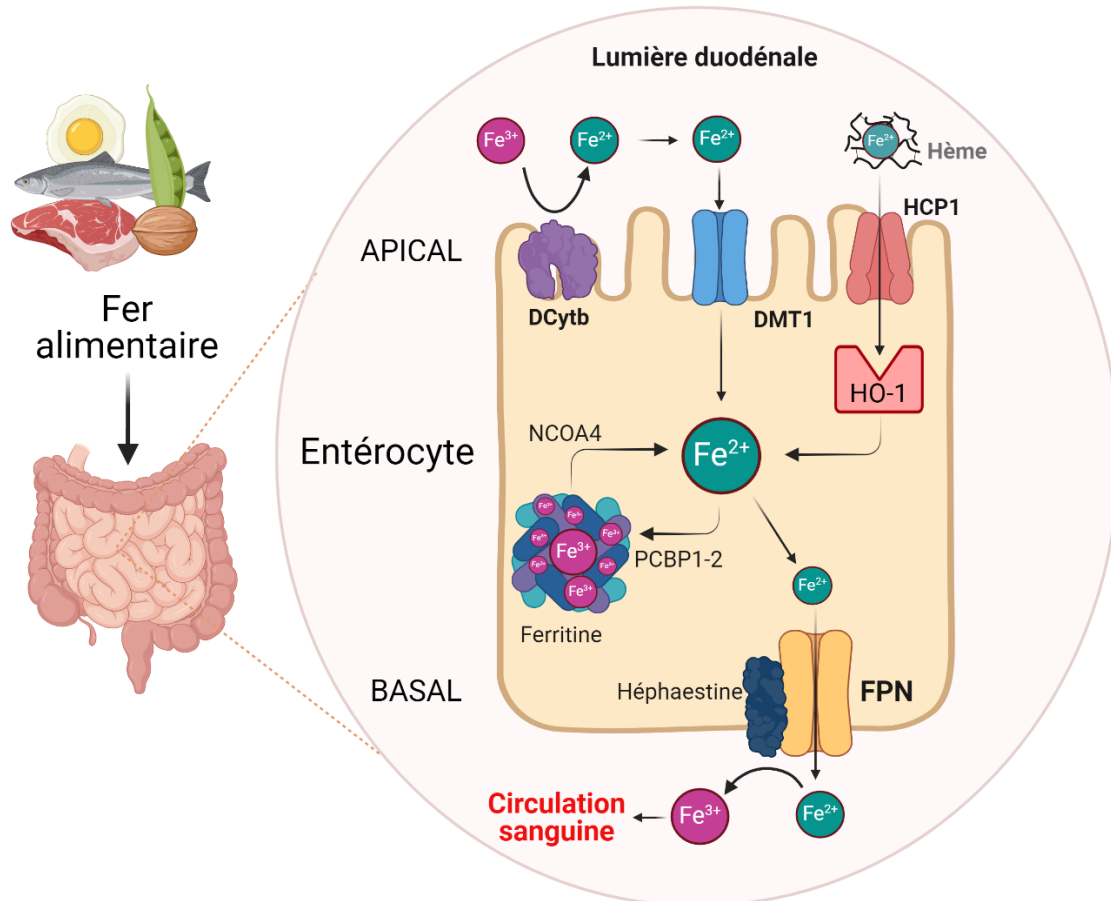


Figure 1 : Absorption du fer issu de l'alimentation par les entérocytes du duodénum

Au pôle apical des entérocytes du duodénum, le fer alimentaire Fe^{3+} est absorbé par DMT1 après avoir été réduit en fer ferreux Fe^{2+} par l'enzyme DcytB. En excès, il peut être stocké dans la ferritine, le rendant chimiquement inerte. Au besoin, le fer est exporté vers la circulation sanguine via la ferroportine, unique exportateur connu à ce jour. Au pôle basal, il est immédiatement oxydé en Fe^{3+} , avant d'être pris en charge dans le sang par la transferrine.

III. Transport et acquisition du fer dans les cellules

1. Transport du fer dans la circulation sanguine

Le fer qui franchit la barrière épithéliale intestinale se retrouve donc dans la circulation sanguine sous sa forme Fe^{3+} . Ce fer représente environ 5% du fer plasmatique puisque les 95% restants proviennent du recyclage par les macrophages de la rate et du foie¹⁴. Comme expliqué en amont, le mécanisme par lequel cet élément se retrouve dans la circulation est dépendant de la FPN. Cette protéine multi-transmembranaire est exprimée au pôle basolatéral des entérocytes et à la surface des hépatocytes et macrophages¹⁵. Notons que cette dernière est également impliquée dans la régulation du fer durant la gestation puisqu'elle est exprimée au niveau placentaire et permet l'export du fer maternel vers le fœtus¹⁶. La déplétion de la FPN dans un modèle murin est létale pour l'embryon, démontrant son caractère essentiel pour l'apport en fer au fœtus. D'un point de vue fonctionnel, le mécanisme d'export vers la circulation plasmatique par la FPN est sous le contrôle de l'hépcidine, chef d'orchestre de l'homéostasie martiale, qui fait l'objet du chapitre 2.

Une fois retrouvé dans le compartiment sanguin, le fer est alors fixé par la transferrine (TF), une protéine synthétisée par le foie qui peut théoriquement lier deux ions ferriques. Lorsqu'elle ne lie aucun atome de fer, la transferrine est appelée apo-transferrine. Chez la souris, dans des conditions physiologiques, environ un tiers de la TF circulante est saturé de fer¹⁷. Le complexe diférique de la transferrine qui est appelé holo-transferrine, est la forme de fer essentiellement utilisée par la plupart des cellules de l'organisme. Un pH de 7,4 est optimal pour permettre une affinité maximale entre le fer et la TF. Les principaux utilisateurs de ce fer sont les cellules érythroïdes, qui l'incorporent lors du processus de synthèse de l'hémoglobine durant l'érythropoïèse.

2. Acquisition du fer par les cellules de l'organisme

Pour acquérir le fer lié à la transferrine, les cellules expriment des récepteurs spécifiques dont le principal est le récepteur de la transferrine 1 (TFR1) codé chez la souris par le gène *Tfrc* et présent de façon ubiquitaire à la membrane de toutes les cellules. Une fois lié à TFR1, le complexe holo-TF-TFR1 est internalisé par endocytose médiée par la clathrine¹⁸. Cela permet au fer de pénétrer dans la cellule sous forme de mono ou diferric-transferrine. A l'intérieur de la cellule, l'acidification de l'endosome par des pompes à proton diminue l'affinité du complexe Fe-TF et favorise la libération du fer¹⁹. Ce fer ferrique (Fe^{3+}) libéré est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par des protéines réductases spécifiques, telles que la protéine STEAP3 (« six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 ») puis exporté dans le cytosol par le transporteur DMT1²⁰. Le fer ferreux ainsi acquis peut être utilisé pour une variété de fonctions cellulaires. Lorsque la concentration intracellulaire en fer augmente, les cellules réduisent l'expression de TFR1 pour limiter les entrées de l'élément²¹.

Il convient de souligner que l'holo-transferrine peut également se lier au deuxième récepteur à la transferrine connu à ce jour (TFR2) codé par le gène *Tfr2*²². Il existe une forte homologie entre les récepteurs TFR1 et TFR2. Néanmoins, l'affinité de TFR2 pour la transferrine est 25 fois moins importante que pour TFR1²³. De plus, bien que le rôle de TFR2 soit encore assez flou, il assure des fonctions différentes de TFR1. En effet, TFR1, retrouvé dans toutes les cellules est principalement impliqué dans l'acquisition cellulaire du fer, alors que TFR2 est surtout présent dans les hépatocytes, les cellules érythroïdes et les ostéoblastes^{22,24,25}. Il est stabilisé à la surface cellulaire par l'holo-transferrine, où il exerce des fonctions régulatrices de l'homéostasie du fer²⁶.

Il existe des mécanismes d'acquisition du fer indépendants de TFR1. En effet, bien que ce dernier soit la principale source de fer dans les organes, elle n'en est pas le seul moyen. Nous avons vu précédemment qu'en condition d'équilibre homéostatique, environ un tiers de la transferrine circulante est chargé de fer. Cependant, dans les situations de surcharge en fer pathologiques, la saturation de la transferrine augmente, ce qui conduit à la présence de fer non lié à la transferrine dans le sang. Ce fer non lié est appelé NTBI (« Non transferrin bounded iron ») et n'est pas

utilisable par les cellules²⁷. Cette forme de fer est considérée comme non physiologique car elle n'est pas présente chez les individus en bonne santé. Le NTBI est une conséquence de la surcharge en fer et engendre une toxicité dans les tissus²⁸. Il est principalement retiré de la circulation sanguine par le foie, qui stocke jusqu'à 80% du NTBI. Le cœur, les reins et le pancréas stockent le reste.

Il a été montré que le NTBI est capté par les cellules via un transporteur appelé ZIP14 (protéine 14 similaire à ZRT/IRT)²⁸. Bien que cette protéine soit exprimée de manière ubiquitaire, son niveau d'expression est plus élevé dans le foie, le pancréas et le cœur. En conditions normales, ZIP14 transporte le manganèse de la circulation portale vers le foie.

Enfin, Müller *et al.* ont récemment décrit dans des lignées tumorales une acquisition alternative du fer, dépendante de la glycoprotéine transmembranaire CD44²⁹. Les auteurs ont démontré que cette protéine, régulée à la hausse durant la transition épithélio-mésenchymateuse, permettait l'acquisition du fer couplé au hyaluronane, nécessaire à l'activité de certaines déméthylases. Ces travaux soulignent le rôle du fer dans la plasticité épigénétique des cellules cancéreuses et mettent en lumière une toute nouvelle voie d'acquisition du fer qui pourrait être intéressante d'étudier dans un contexte indépendant de celui du cancer.

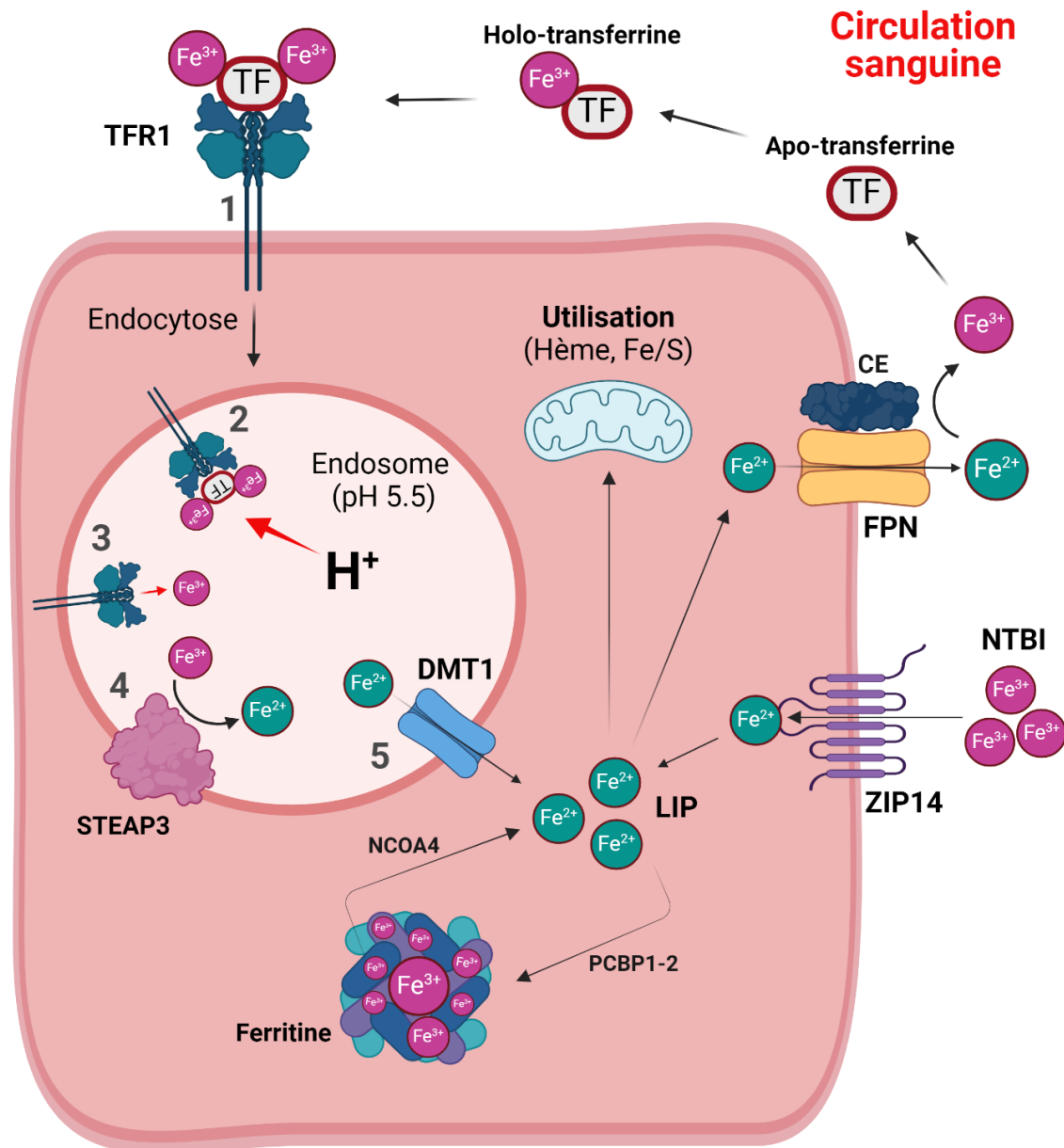


Figure 2 : Acquisition du fer par les cellules

Le fer lié à la TF est acquis via la liaison avec TFR1. La TF se lie au récepteur ce qui induit l'endocytose du complexe 2Fe-TF/TFR1. L'acidification de l'endosome permet alors de séparer le fer du récepteur ainsi que de la TF. Dans l'endosome, le fer ferreux est ensuite réduit par STEAP3 en fer ferrique puis ce dernier quitte l'endosome via DMT1. Dans le cytoplasme le LIP en excès est stocké dans la ferritine. Il peut aussi être utilisé par les mitochondries notamment pour la biosynthèse de l'hème et des clusters Fe/S. Enfin, il peut également être exporté par la FPN puis oxydé par la céruléoplasmine. Notons que l'export du fer est uniquement possible dans les cellules qui expriment la FPN. Par ailleurs, dans certaines conditions dans lesquelles le fer est en excès, le NTBI peut être acquis par les cellules via ZIP14.

IV. Mécanisme de recyclage du fer par les macrophages

Comme expliqué en amont, en conditions physiologiques, 95% du fer de l'organisme est fourni par le recyclage des macrophages du système réticuloendothélial. Ce fer est extrait de l'hème présent dans les globules rouges (GR) sénescents qui ont été phagocytés par les macrophages lors d'un mécanisme appelé érythrophagocytose³⁰. Les macrophages tissulaires spécialisés dans le recyclage du fer comprennent les macrophages spléniques de la pulpe rouge (RPM) et les cellules de Kupffer (KC), macrophages résidant dans le foie.

L'initiation de ce mécanisme est déclenchée par des marqueurs de sénescence présents à la surface des GR induisant un signal « eat me » pour les macrophages. Ces signaux sont par exemple le regroupement en « cluster » de la protéine Band3³¹ ou encore l'augmentation du nombre de phosphatidylsérines (PS) sur le versant externe de leur membrane plasmique³². Il existe également des signaux « don't eat me » correspondant à des antigènes exprimés à la surface des globules rouges jeunes/intacts, comme par exemple la protéine de surface CD47. La baisse de cet antigène favorise la reconnaissance du globule rouge par les macrophages pour son érythrophagocytose³³. Ces différents marqueurs sont reconnus par des récepteurs du macrophage dits « scavengers » tels que SIRP α , G6P, TIMD4, CR3, l'intégrine CD51, une famille de récepteurs tyrosine kinase « TAM » (AXL et MERTK), des récepteurs FC ou encore CD36, déclenchant ainsi l'érythrophagocytose³⁴. Une fois internalisés dans les macrophages, les phagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des phagolysosomes, à l'intérieur desquels les globules rouges sont dégradés. L'hème issu de l'hémoglobine est transporté dans le cytoplasme par HRG1 et HCP1, tandis que le fer ferreux est libéré lors du catabolisme de l'hème par l'enzyme hème oxygénase HO-1, codée chez la souris par le gène *Hmox*³⁵. Le fer cytosolique peut alors être utilisé dans divers processus cellulaires, stocké au sein de la ferritine ou être exporté par la ferroportine en fonction de la demande. Lors de son export, ce dernier sous sa forme Fe²⁺ est oxydé en fer Fe³⁺ par la céruléoplasmine (CE)³⁶. Comme vu en amont dans les entérocytes, ce mécanisme d'export est contrôlé par l'hepcidine (**chapitre 2**).

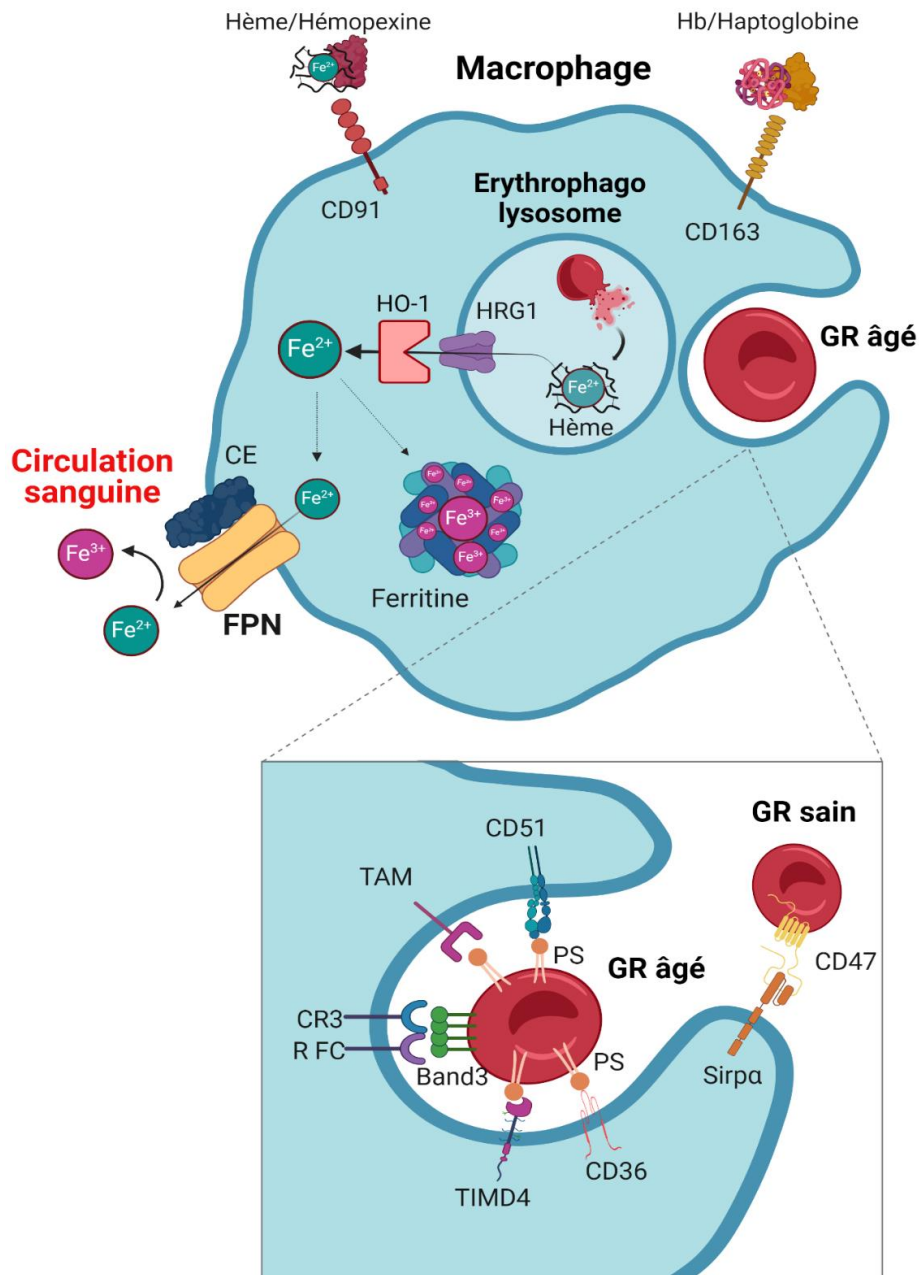


Figure 3 : Erythrophagocytose des globules rouges sénescents et recyclage du fer par les macrophages

Les globules rouges âgés expriment différents antigènes à leur surface (PS, Band3, CD47, etc..) qui sont reconnus par des récepteurs présents à la membrane des macrophages (TAM, TIMD4, CD36, etc..) induisant un mécanisme d'érythrophagocytose. Les GR endocytés sont lysés dans le phagosome puis l'hème est exporté vers le cytoplasme via HRG1. Une fois catabolisé par l'HO-1, le fer sous sa forme Fe^{2+} peut être stocké au sein de la ferritine ou exporté via la FPN. Il est immédiatement oxydé en Fe^{3+} par la céruléoplasmine, avant d'être pris en charge dans le sang par la transferrine.

Il existe également une voie alternative de recyclage du fer. En effet, des études ont montré qu'en condition physiologique chez l'Homme, un peu plus de 10 % des globules rouges peuvent subir une hémolyse intravasculaire, libérant ainsi de l'hémoglobine libre³⁷. Dans ce contexte, les hépatocytes produisent des protéines tampons telles que l'haptoglobine et l'hémopexine qui vont respectivement se lier à l'hémoglobine et l'hème^{38,39}. Le récepteur CD163, exprimé par les RPM et les KC, permet ensuite de piéger le complexe Hb-haptoglobine⁴⁰ tandis que CD91, principalement retrouvé dans les hépatocytes mais tout de même présent dans les macrophages, capte l'hème-hémopexine³⁹. Les deux complexes sont ensuite éliminés par l'HO-1.

Dans des conditions d'équilibre homéostasique, le processus de recyclage des érythrocytes prédomine dans la rate, où les RPM sont spécialisés dans le recyclage des globules rouges âgés. Cependant, dans des situations pathologiques comme l'anémie hémolytique ou inflammatoire, des monocytes peuvent migrer vers le foie et se différencier en macrophages spécialisés dans le recyclage du fer⁴¹. Ces éléments mentionnés sont développés plus en détails dans le dernier chapitre, consacré aux macrophages (**chapitre 4**). En effet, les cellules de Kupffer que nous venons d'introduire, ont été au cœur des problématiques abordées dans ce projet de recherche dans lequel nous avons testé leur implication directe dans la régulation de l'hepcidine.

En résumé, le métabolisme du fer constitue un cycle qui comprend des étapes d'absorption, de transport, d'utilisation et enfin de recyclage. Au centre de ce cycle se trouve une hormone clé : l'hepcidine, qui régule la quantité de fer sérique dans l'organisme. Cette dernière fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2 : L'hepcidine, chef d'orchestre de l'homéostasie martiale

Comme il n'existe pas de mécanisme actif d'élimination du fer dans l'organisme, son homéostasie est soigneusement régulée. Les flux de fer sont contrôlés à différents niveaux, tant à l'échelle systémique qu'au niveau cellulaire².

Ces régulations ont pour but de maintenir un équilibre entre les besoins spécifiques des cellules et les demandes globales de l'organisme, tout en prévenant l'accumulation nocive de fer. Pour limiter l'absorption ou le stockage excessif de fer, des protéines régulatrices ont été identifiées. Les protéines qui interviennent dans ces processus doivent également subir une régulation précise.

Dans cette partie, nous nous concentrons principalement sur la régulation systémique du fer par l'hepcidine. Cette hormone, sécrétée par les hépatocytes, constitue l'élément central de la régulation de l'homéostasie martiale et l'ensemble de ce projet s'est articulé autour de la régulation de cette dernière.

Ainsi, nous détaillons ici ce qui est connu à ce jour sur l'hepcidine et ses principaux régulateurs et décrivons les différents contextes physiopathologiques dans lesquels celle-ci peut être stimulée ou inhibée.

I. Introduction autour de l'hepcidine

1. Découverte et lien avec l'homéostasie du fer

L'histoire de l'hepcidine commence au tout début du 21^{ème} siècle lorsque Krause *et al.* isolent et caractérisent un peptide humain doté d'une activité antimicrobienne. Ce peptide qu'ils nomment alors « LEAP-1 » (liver-expressed antimicrobial peptide 1) est principalement exprimé dans le foie et circule dans le plasma humain. Dans leurs travaux, les auteurs caractérisent LEAP-1 par spectrométrie de masse et le décrivent comme un molécule contenant 25 résidus repliés par 4 ponts disulfures⁴².

En 2001, ce peptide est isolé des urines humaines par une équipe de chercheurs américains. Le peptide, retrouvé sous deux formes de 20 et 25 acides aminés, est alors appelé « hepcidine », « Hep » en raison de son origine dans le foie et « cidine » pour ses propriétés antimicrobiennes⁴³.

Quelques mois plus tard, deux équipes françaises indépendantes dirigées respectivement par les Dr Olivier Loreal et Sophie Vaulont, établissent un lien entre fer et hepcidine. Il est ainsi montré que le gène de l'hepcidine est surexprimé dans un modèle murin de surcharge en fer⁴⁴. Les auteurs suggèrent que le gène de l'hepcidine pourrait jouer un rôle spécifique lors d'une accumulation de fer dans l'organisme et donc présenter des fonctions distinctes de son activité antimicrobienne premièrement décrite. De plus, Gaël Nicolas *et al.* décrivent que des souris déficientes en hepcidine (souris *Usf2*^{-/-} : un gène très proche du locus de l'hepcidine) présentent une surcharge en fer mimant un phénotype d'hémochromatose, une maladie héréditaire causée par une mutation du gène *Hfe* entraînant une surcharge en fer⁴⁵. Lui et son équipe proposent alors que cette hormone régule négativement l'absorption du fer intestinal ainsi que son export par les macrophages.

L'année suivante, la même équipe démontre qu'une surexpression de l'hepcidine dans un modèle murin, induit une forte carence en fer à l'origine d'une sévère anémie⁴⁶. Cette découverte confirme alors le rôle central de cette hormone dans l'homéostasie du fer.

2. Synthèse et localisation

Chez l'Homme, l'hepcidine est codée par le gène *HAMP*, situé sur le chromosome 19 en position q13.1 et composé de trois exons. Chez la souris, deux gènes homologues, *Hamp1* et *Hamp2*, se trouvent dans la même région du chromosome 7. Ces deux gènes sont la résultante d'une duplication du gène ancestral de l'hepcidine et du gène adjacent *Usf2* localisés sur le chromosome 7⁴⁷. *Hamp1*, partageant 90 % de similarité avec la séquence humaine, régule de manière similaire le métabolisme du fer⁴⁴.

L'hepcidine est initialement synthétisée sous forme d'un pré-propeptide de 84 acides aminés, nécessitant deux clivages pour atteindre sa forme mature de 25 acides aminés⁴⁸. Cette forme mature, fortement cationique, possède huit cystéines formant quatre ponts disulfures, ainsi qu'un segment en N-terminal conservé au cours de l'évolution. Ce segment est crucial pour son interaction avec la FPN, principal exportateur du fer dans l'organisme dont le mécanisme est détaillé dans la partie suivante⁴⁹. Bien que principalement sécrétée sous forme de 25 acides aminés, des formes tronquées de 22 et 20 acides aminés sont également présentes chez l'Homme, mais à des concentrations plus faibles⁵⁰. L'hepcidine-20, retrouvée dans le plasma et les urines, présente une activité antimicrobienne et antifongique plus importante que l'hepcidine-25 à pH acide, mais sans capacité de liaison à la FPN.

3. Mode d'action de l'hepcidine : l'axe hepcidine-ferroportine

L'équilibre des mouvements de fer dans l'organisme dépend d'un contrôle rigoureux de divers paramètres. Cela inclut l'absorption intestinale du fer, la gestion adéquate des réserves de fer par les hépatocytes et le recyclage par les macrophages. Cet équilibre est en majeure partie régulé par l'axe hepcidine-ferroportine.

La ferroportine est une protéine composée de 12 domaines transmembranaires et est présente principalement au pôle basal des entérocytes de l'intestin, à la surface des macrophages du système réticulo-endothélial et à la membrane apicale des

cellules hépatiques⁵¹. On la retrouve toutefois dans d'autres types de cellules comme les cardiomyocytes⁵², dans l'épiderme⁵³, ou encore dans les cellules endothéliales⁵⁴. Cependant son expression depuis ces cellules ne régule pas le fer systémique.

Le rôle principal de la ferroportine est de permettre l'exportation du fer stocké à l'intérieur des cellules vers le milieu extracellulaire⁵⁵. Ainsi, dans les entérocytes, elle est responsable du transport du fer absorbé par les cellules intestinales dans la circulation sanguine, tandis que dans les macrophages, elle permet la libération du fer récupéré à partir des globules rouges phagocytés. Depuis les hépatocytes, elle permet l'approvisionnement dans le sang du fer stocké dans le foie. Dans ce contexte, le rôle de l'hepcidine est de bloquer ce mécanisme.

Des travaux pionniers ont décrit que lorsque les niveaux d'hepcidine augmentent, la protéine se lie par son domaine N-terminal à une boucle extracellulaire de la ferroportine. Cette liaison déclenche un changement conformationnel induisant son internalisation et sa dégradation par le protéasome, ce qui réduit l'exportation du fer^{49,56}. À l'inverse, lorsque les niveaux d'hepcidine diminuent, la ferroportine est stabilisée à la surface cellulaire, favorisant ainsi l'augmentation du fer sérique.

Cependant, une étude plus récente datant de 2018 a montré que l'hepcidine peut également inhiber l'export du fer par un mécanisme d'occlusion du transporteur⁵⁷.

Enfin, il a également été montré que la liaison de l'hepcidine à la ferroportine est couplée à la liaison du fer, avec une augmentation de l'affinité de l'hepcidine multiplié par 80 en présence du fer. Ces résultats suggèrent un modèle de régulation de la ferroportine par l'hepcidine, où seules les molécules de ferroportine dans des cellules chargées en fer sont ciblées pour la dégradation⁵⁸.

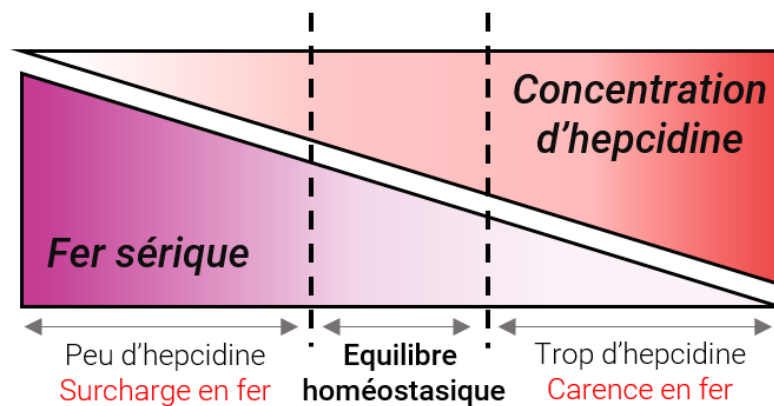
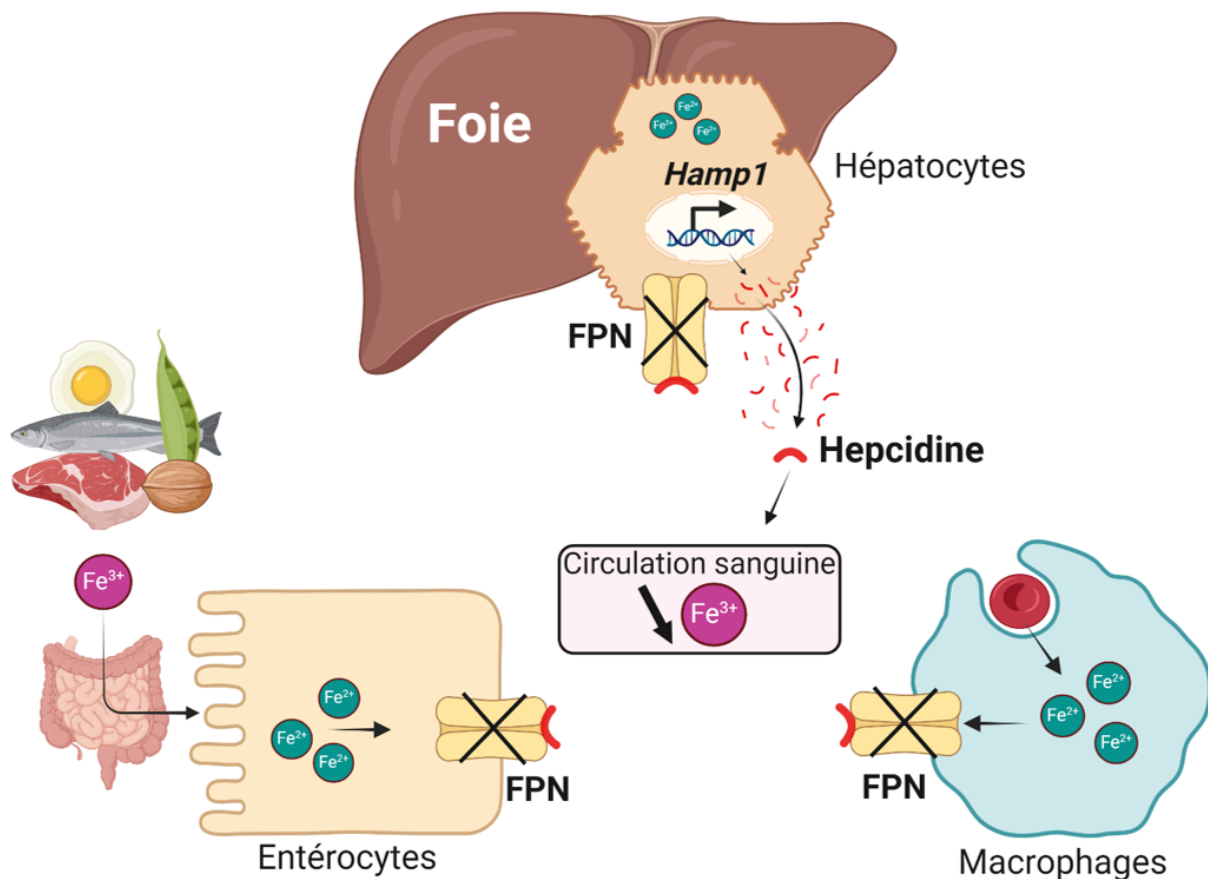


Figure 4 : Régulation systémique du fer sérique par l'hepcidine

L'hepcidine produite par les hépatocytes du foie induit l'occlusion et la dégradation de la ferroportine exprimée à la surface des hépatocytes, des entérocytes et des macrophages. L'absorption du fer alimentaire et l'export de l'élément issu du recyclage des GR par les macrophages sont alors inhibés, diminuant ainsi la concentration de fer dans la circulation sanguine. En résumé, la quantité de fer sérique est inversement proportionnelle à la production d'hepcidine. Une diminution trop forte de la concentration en hepcidine mène à la surcharge en fer tandis qu'une trop forte production induit une carence.

En résumé, la ferroportine est un composant essentiel du système de régulation du fer systémique dans l'organisme, assurant les mouvements appropriés du fer entre les compartiments cellulaires et le milieu extracellulaire. L'axe hepcidine-ferroportine empêche ainsi la formation de NTBI, qui se produit lorsque le fer entrant dans la circulation sanguine dépasse la capacité de liaison du TF.

4. Action locale de l'hepcidine

Nous venons de voir que l'hepcidine joue donc un rôle central dans le contrôle du métabolisme du fer et est exprimée principalement par les hépatocytes. Toutefois, la littérature scientifique décrit un rôle local de l'hepcidine dans divers tissus et organes du corps humain, manifestant ainsi ses multiples fonctions physiologiques.

Au niveau rénal, elle est produite dans le segment large ascendant cortical et les tubes connecteurs, agissant de manière paracrine pour réguler le métabolisme du fer spécifique aux cellules rénales. Dans l'estomac, les cellules pariétales expriment l'hepcidine en réponse à une infection bactérienne, notamment lors d'une infection par *Helicobacter pylori*, soulignant son rôle dans la réponse immunitaire premièrement décrit à sa découverte⁵⁹. Dans le cœur, l'hepcidine est régulée par l'hypoxie et l'inflammation dans les cardiomyocytes, jouant un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du fer prévenant ainsi l'insuffisance cardiaque⁶⁰. L'hepcidine présente également des propriétés antimicrobiennes dans la peau et dans l'intestin, où elle agit respectivement en recrutant des neutrophiles lors d'infections bactériennes et en séquestrant le fer pour réduire la survie bactérienne⁵³. Un rôle dans la physiopathologie du psoriasis a également été décrit pour l'hepcidine. En outre, dans la prostate, elle est exprimée par les cellules normales et tumorales, favorisant la survie des cellules cancéreuses par la séquestration du fer, et est régulée par des voies de signalisation telles que BMP4, BMP7 et Wnt⁵⁹. Dans le placenta, l'hepcidine produite par les cellules trophoblastiques est susceptible de jouer un rôle antimicrobien, bien que les interactions avec la ferroportine restent encore à élucider. De plus, certaines cellules immunitaires sont également impliquées dans la production d'hepcidine. En effet, il a été décrit que les cellules dendritiques conventionnelles produisent l'hormone dans l'intestin en réponse aux signaux du microbiote. En conséquence, cela limite l'export de fer par les phagocytes intestinaux, protégeant

ainsi les tissus contre l'infiltration microbienne et favorisant la cicatrisation des muqueuses⁶¹. Enfin, l'expression de l'hepcidine peut-être induite dans divers autres cellules immunitaires notamment des cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes ou encore les neutrophiles⁶²⁻⁶⁴. Nous verrons dans le dernier chapitre de cette introduction que les macrophages sont également impliqués dans la production de l'hepcidine.

Pour conclure, l'hepcidine est sécrétée localement au sein de divers tissus et agit dans de nombreux processus physiopathologiques. Toutefois, l'hepcidine hépatique semble être le principal régulateur de l'homéostasie martiale systémique. Cela a été démontré par des travaux de l'équipe du Dr Carole Peyssonnaud qui décrivent que le modèle murin de délétion spécifique de l'hepcidine dans le foie (*Hamp1^{Alb}*) récapitule entièrement le phénotype sévère de surcharge en fer, observé chez les souris *Hamp1* KO total⁶⁵. Ces données indiquent que la production extra-hépatique d'hepcidine n'est pas suffisante pour réguler le métabolisme du fer systémique.

5. Régulation de l'expression de l'hepcidine

Comme mentionné précédemment, l'hepcidine est le principal régulateur de l'homéostasie du fer. Cela signifie que cette dernière est soumise à un contrôle strict de son expression en fonction des besoins en fer de l'organisme. Il convient de noter que l'hepcidine est principalement régulée au niveau transcriptionnel. Ainsi, plusieurs signaux contrôlent les niveaux de transcrits de l'hepcidine produits par les hépatocytes. Les principaux sont le statut en fer, les signaux associés à un processus inflammatoire, ou encore le stress du réticulum endoplasmique qui augmentent la production d'hepcidine, tandis que l'érythropoïèse et l'hypoxie l'inhibent⁶⁶. Au niveau protéique, la matriptase-2 (MT2), une sérine protéase transmembranaire codée par le gène *TMPRSS6*, joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression de l'hepcidine⁶⁷. Nous reviendrons sur le fonctionnement de cette dernière à la fin de ce chapitre.

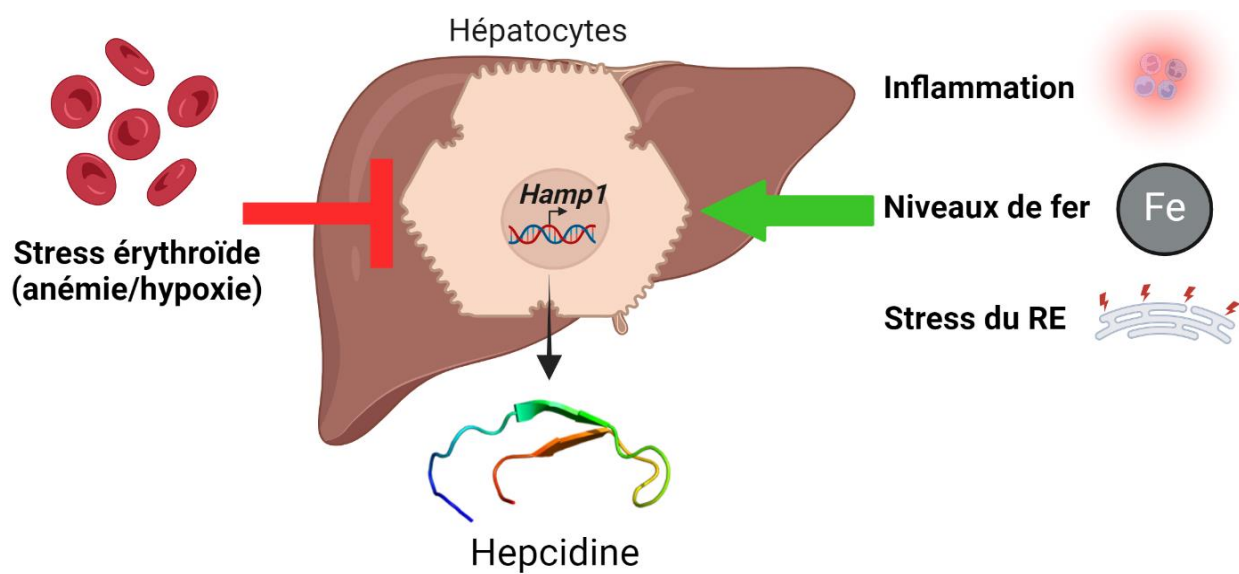


Figure 5 : Principaux régulateurs de l'expression de l'hepcidine

Dans les hépatocytes, l'expression de l'hepcidine est régulée dans différents contextes physiopathologiques. Ainsi le statut en fer dans l'organisme, l'inflammation ou encore le stress du réticulum endoplasmique stimule la transcription du gène *Hamp1* tandis qu'un stress érythropoïétique c'est-à-dire une condition d'hypoxie/d'anémie qui requiert la production de nouveaux GR, l'inhibe.

La section suivante est consacrée à l'illustration des différents contextes physiologiques ou pathologiques qui induisent des mécanismes de régulation (positive ou négative) de l'expression de l'hepcidine. Dans ce contexte, nous décrivons l'implication de divers organes ainsi que la participation de différentes voies de signalisations et intermédiaires protéiques qui favorisent la stimulation ou l'inhibition de l'expression de l'hepcidine.

II. Régulation positive de l'hepcidine

1. Régulation par le fer plasmatique et hépatique

En condition de carence en fer, l'hepcidine est exprimée à des niveaux réduits, ce qui entraîne une diminution de la dégradation de la FPN. Par conséquent, celle-ci reste fonctionnelle, permettant ainsi une absorption accrue du fer par les entérocytes du duodénum, ainsi qu'une libération plus élevée du fer stocké dans les macrophages et hépatocytes. Cela conduit à une augmentation des niveaux de fer dans le plasma sanguin, contribuant à rétablir l'équilibre du fer dans l'organisme⁹.

A l'inverse, en cas de surcharge en fer, la production d'hepcidine est augmentée. Cette augmentation conduit à une dégradation accrue de la FPN. En conséquence, la FPN n'est plus disponible pour permettre la sortie du fer des cellules qui l'expriment, telles que les hépatocytes, les macrophages et les entérocytes. Cela entraîne une rétention accrue du fer dans ces cellules, contribuant ainsi à réduire les niveaux de fer dans le plasma sanguin et à prévenir une accumulation excessive de fer dans l'organisme⁹.

L'expression de l'hepcidine est régulée par la concentration du fer circulant lié à la TF ainsi que par les réserves intracellulaires en fer. Cette régulation complexe implique plusieurs protéines membranaires au niveau des hépatocytes, notamment l'hémojuvéline (HJV), HFE et TFR2⁶⁸. Bien que les mécanismes de détection du fer extracellulaire diffèrent de ceux des réserves intracellulaires, ils semblent tous les deux activer la voie de signalisation majeure de régulation de l'hepcidine dans les hépatocytes : la voie BMP-SMAD⁶⁹.

a. Signalisation BMP-SMAD

La voie de signalisation des BMP (Bone Morphogenetic Proteins) est une voie de signalisation cellulaire importante impliquée dans de nombreux processus biologiques, y compris le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire, et la régulation de l'homéostasie du fer. Les BMP sont des cytokines de la famille du TGF- β (Transforming Growth Factor- β) qui agissent comme des ligands extracellulaires. Il en existe plus de 20, pouvant former des homo- ou hétérodimères. Lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs membranaires spécifiques, ils déclenchent une cascade de signalisation intracellulaire.

Dans le contexte de régulation de l'hepcidine, la voie de signalisation des BMP commence par la liaison de l'hétérodimère BMP2/BMP6 aux récepteurs de type I et de type II (BMPRII)⁷⁰. Les ligands BMP6 et BMP2 sont produits par les LSEC (Liver Sinusoidal Endothelial Cells) et agissent de manière paracrine sur les hépatocytes, qui expriment les récepteurs des BMP^{71,72}. La suppression de *Bmp6* entraîne une accumulation de fer massive engendrée par une forte diminution de l'expression de l'hepcidine dans le foie⁷³. De même, la suppression de *Bmp2* conduit à une forte baisse de l'hepcidine, associée à une surcharge de fer⁷⁴. En conditions physiologiques, BMP2 est le ligand dominant car 12 fois plus exprimé que BMP6⁷². Cependant, l'expression de BMP6 est stimulée par les niveaux de fer hépatique, ce qui favorise une augmentation de l'expression de l'hepcidine en cas de surcharge en fer⁷⁵. Il est important de préciser que le mécanisme précis par lequel les cellules endothéliales hépatiques régulent l'expression de BMP6 en fonction des niveaux de fer reste encore peu compris. Une étude de 2022 suggère que les LSEC ne régulent pas la sécrétion de BMP6 de manière autonome mais que cette régulation, en fonction du statut en fer, dépend des hépatocytes qui sécrèteraient une ou plusieurs protéines qui fonctionneraient comme activateurs de BMP6 en présence de fer⁷⁶.

Il a été décrit quatre BMPRII impliqués dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine à la surface des hépatocytes, soit ALK2 et ALK3 faisant partie des BMPRII de type I et ACTRIIA et BMPRII associées au BMPRII⁷⁰. Ces récepteurs forment un complexe que l'on retrouve associé à une protéine : HJV. L'hémojuvéline est une protéine membranaire de 50 kDa qui a été nommée ainsi en raison de son implication

dans l'hémochromatose juvénile, une pathologie associée à des mutations de cette dernière, qui induit chez l'Homme une surcharge en fer avant l'âge de 30 ans⁷⁷. Dans cette pathologie, les taux d'hepcidine sont anormalement bas au regard de la surcharge en fer, démontrant toute l'importance de HJV dans cette voie de régulation.

La régulation de l'hepcidine est donc médiée par la voie canonique des BMP. La stimulation des BMPR par les ligands déclenche une cascade de phosphorylations de protéines effectrices de la famille des SMAD (« Suppressor of Mothers against Decapentaplegic »). D'abord, le BMPRI est phosphorylé par le BMPRII, puis le complexe de protéines cytosoliques SMAD1/5/8 est phosphorylé par BMPRI. Les complexes SMAD1/5/8 phosphorylés se lient ensuite à la protéine SMAD4 pour transloquer vers le noyau cellulaire où ils se fixent à une séquence spécifique sur le promoteur des gènes cibles, connue sous le nom de BMP-RE (BMP Response Element)⁷⁰. Parmi les gènes ciblés qui témoignent de l'activation de la voie BMP-SMAD figure le gène de l'hepcidine *hamp1*, ainsi que d'autres gènes tels que *Id1*, *Smad7* ou encore *Atoh8*⁷⁸.

b. Signalisation par HFE-TFR2

L'expression de l'hepcidine dans le foie est régulée en réponse aux niveaux de fer circulant, principalement par le biais de la saturation de la transferrine¹⁵. Cette régulation implique des protéines telles que le deuxième récepteur de la transferrine, TFR2, ainsi que le régulateur homéostatique du fer HFE, qui modulent positivement la voie BMP-SMAD.

TFR2, qui partage une forte similarité avec TFR1, est principalement exprimé dans les hépatocytes et les cellules érythroïdes. Bien qu'il puisse être activé par la transferrine liée au fer de la même façon que TFR1, sa capacité de liaison est significativement réduite (inférieure de 25 fois), et son effet fonctionnel est en opposition à celui de TFR1⁷⁹. En effet, contrairement à TFR1, qui, en se liant à la transferrine ferrique, induit l'internalisation du récepteur et la fourniture de fer à la cellule, la liaison de TFR2 stabilise le récepteur à la surface cellulaire⁸⁰. Ce mécanisme

favorise la régulation transcriptionnelle positive de l'hepcidine dans les hépatocytes. Ainsi, TFR2 est considéré comme un "senseur du fer" régulant l'expression de l'hepcidine, et des mutations au niveau de TFR2, tant chez l'Homme que chez la souris, entraînant des profils de surcharge en fer similaires. Le fait qu'une absence de TFR1 entraîne la mort embryonnaire⁸¹ suggère que TFR2 est incapable de compenser la perte de TFR1, mettant en évidence des rôles distincts dans la régulation de l'hepcidine.

HFE agit comme un régulateur positif de l'expression de l'hepcidine, probablement en raison de son interaction avec les composants de la voie de signalisation BMP, tels que TFR2 et ALK3. Cette protéine est étroitement associée à l'hémochromatose héréditaire. Chez l'Homme, des mutations d'HFE entraînent un défaut d'expression de l'hepcidine, ce qui conduit à une hyper absorption intestinale de fer et à une accumulation excessive de l'élément dans les tissus⁸².

Le modèle d'action HFE-TFR suggère que dans des conditions physiologiques normales, HFE s'associe à TFR1, entrant en compétition directe avec la transferrine et réduisant ainsi l'affinité apparente de TFR1 pour la transferrine. L'augmentation des taux plasmatiques de transferrine entraîne la dissociation du complexe HFE-TFR1. Le HFE libre peut alors interagir avec TFR2, formant le complexe HFE-TFR2, ce qui induit une cascade de signalisation conduisant à la transcription de l'hepcidine^{83,84}. Cependant d'autres études vont à l'encontre de ce mécanisme et suggèrent que l'interaction entre HFE et TFR2 n'est pas nécessaire pour l'induction de l'expression de l'hepcidine médiée par HFE^{85,86}.

Enfin, une récente étude basée sur un modèle *Tfrc* KO hépato-spécifique décrit que la principale fonction de TFR1 dans l'homéostasie du fer est d'interagir avec HFE pour réguler l'hepcidine en réponse aux niveaux de fer sérique⁸⁷.

2. Régulation par l'inflammation

Le fer est un élément essentiel à la vie. Ce postulat s'applique aussi aux micro-organismes, y compris ceux qui peuvent infecter l'Homme et provoquer des réponses inflammatoires dans diverses maladies. L'hepcidine a été initialement identifiée comme un nouveau peptide antimicrobien hépatique⁸⁸. Le principal effet anti microbien de l'hepcidine est indirect avec une action médiée par la ferroportine pour induire une hypoferrémie. En effet, en tant que mécanisme de défense, notre corps tente de restreindre la biodisponibilité du fer et donc la croissance de l'organisme infectieux. Il a ainsi été montré que le traitement des hépatocytes avec le lipopolysaccharide (LPS), une molécule présente à la membrane des bactéries à Gram négatif, augmente les niveaux d'hepcidine, fournissant ainsi le premier aperçu de la façon dont notre corps pourrait restreindre la disponibilité du fer aux agents pathogènes⁴⁴.

Par la suite, de nombreuses études ont montré que l'hepcidine est principalement augmentée en phase aigüe d'infection en réponse à des cytokines inflammatoires telles que l'IL6 et l'IL1b et cela via la voie de signalisation JAK2-STAT3^{89,90}

Cette voie de signalisation est la deuxième voie la plus étudiée en relation avec l'hepcidine et l'homéostasie du fer. De manière similaire à la signalisation BMP-SMAD, lorsque des stimuli appropriés sont présents (par exemple, une infection), l'organisme produit des cytokines inflammatoires qui se lient ensuite à ces récepteurs, entraînant une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de la protéine STAT3⁹¹. La régulation de l'hepcidine médiée par l'IL6 est spécifique aux hépatocytes, car les souris transgéniques avec une suppression spécifique du gène *Stat3* dans les hépatocytes ne présentent pas d'augmentation de l'expression de l'hepcidine après un traitement à l'IL6. En plus de l'IL6, d'autres cytokines inflammatoires, y compris l'IL1, l'IL22 ou encore l'INF α ont également été décrites comme influençant la synthèse de l'hepcidine par STAT3^{92,93}.

Des données provenant d'études sur modèles murins suggèrent également qu'une certaine communication est possible entre la régulation de l'hepcidine médiée par BMP et STAT. La régulation de l'hepcidine par l'IL6 nécessite également SMAD4

et cette induction semble être médiée par un élément de réponse BMP dans le promoteur de l'hepcidine^{94,95}. Il a également été observé que le LPS peut induire la phosphorylation de Smad1/5/8 en l'absence de BMP6⁹⁶. L'augmentation induite par le LPS des niveaux de P-SMAD1/5/8 a été attribuée à une signalisation non canonique par un autre ligand de la superfamille TGF β , l'activine B^{96,97}. De plus, il a été constaté que cette communication nécessite le BMPR : Alk3 où une injection d'IL6 n'a pas augmenté la synthèse d'hepcidine dans le foie de souris Alk3 KO⁹⁸.

Par ailleurs, il convient d'ajouter que lors de l'inflammation, une diminution de l'expression de *Tmprss6* est observée. Cela a notamment été montré lors d'expériences de traitement de souris avec du LPS ou en stimulant des hépatocytes avec de l'IL-6. Cette diminution est indépendante de la voie des BMP/SMAD, mais associée à une diminution de la phosphorylation de STAT5⁹⁹. En conséquence, la diminution de TMPRSS6 permet une augmentation de l'expression de l'hepcidine en réponse à l'inflammation.

Pour conclure, la compréhension des mécanismes de régulation de l'hepcidine lors de l'inflammation demeure un enjeu majeur. En effet, en cas d'infection chronique et donc de persistance d'une inflammation, l'hypoferémie résultant d'une activation chronique de l'hepcidine entraîne une réduction de la synthèse de l'hémoglobine et en conséquence une anémie. Ces troubles sont connus sous le nom d'anémie de l'inflammation¹⁰⁰. L'étude fondamentale de nouveaux mécanismes inhibiteurs de l'hepcidine dans laquelle cette thèse s'intègre est donc intéressante pour la recherche clinique ciblant ce type de maladies.

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

1. L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus de formation des érythrocytes, ou globules rouges, dans l'organisme. Chez l'Homme, ces cellules sanguines, au nombre de $2.5 \cdot 10^{13}$, sont essentielles au transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et au transport du dioxyde de carbone dans le sens inverse pour élimination¹⁰¹. La durée de vie d'un globule rouge est de 120 jours (et environ 40 chez la souris). Pour assurer un renouvellement efficace, le corps produit environ 2.5 millions de GR chaque seconde¹⁰¹. Au sein de chaque globule rouge se trouve une grosse quantité d'hémoglobine (270 Millions/GR), une protéine qui de par ses propriétés physico-chimiques, permet de lier l'oxygène du sang grâce aux atomes de fer contenus en son centre, sous forme d'hème. La production d'hémoglobine est un processus coordonné qui nécessite un apport parallèle de fer. Environ 80 % du fer circulant est utilisé par les cellules érythroïdes pour ce processus, où il est principalement consommé sous forme de 2Fe^{2+} -TF. Cependant, les quantités de fer absorbées quotidiennement (environ 1 à 2 mg) ne suffisent pas à répondre aux besoins élevés des cellules sanguines, qui nécessitent environ 25 mg de fer par jour pour la synthèse de l'hémoglobine¹⁰². Cela signifie que l'organisme doit réguler la distribution, le stockage et le recyclage du fer pour garantir son adéquation aux besoins de l'érythropoïèse.

L'érythropoïèse se déroule principalement dans la moelle osseuse, où des cellules souches multipotentes se différencient progressivement en érythrocytes matures sous l'influence de l'hormone érythropoïétine (EPO), produite principalement par les reins en réponse à des signaux de faible taux d'oxygène dans le sang. C'est un processus complexe impliquant une série de différenciations cellulaires. Voici les étapes principales de l'érythropoïèse : tout d'abord, des cellules souches hématopoïétiques (CSH) se trouvent dans la moelle osseuse et ont la capacité de s'auto renouveler et se différencier en différents types de cellules sanguines, y compris les érythrocytes. Ces CSH se différencient en BFU-E (« Burst Forming Unit – Erythroid ») qui sont des précurseurs immatures des érythrocytes. Ces cellules sont

capables de former des colonies de cellules érythroïdes. Les BFU-E se différencient ensuite en CFU-E (« Colony Forming Unit – Erythroid »), qui sont des précurseurs plus avancés. Ces cellules sont capables de former des colonies de cellules érythroïdes plus spécifiques. Puis, les CFU-E se différencient en proérythroblastes, qui sont des cellules encore immatures mais plus spécialisées dans la voie de l'érythropoïèse. Les proérythroblastes deviennent des érythroblastes, qui sont les premières cellules reconnaissables dans la voie de l'érythropoïèse. Les érythroblastes subissent plusieurs étapes de maturation, devenant successivement des basophiles, des polychromatiques, et enfin des orthochromatiques. Les érythroblastes orthochromatiques sont des cellules avancées dans la maturation, caractérisées par leur noyau qui commence à se condenser. Ces cellules se divisent en deux voies pour donner d'une part le pyrénocyte : c'est une cellule nucléée avec un noyau très condensé qui a une courte durée de vie et est destinée à être éliminée. Et d'autre part une cellule énucléée appelée réticulocyte qui est encore immature mais qui est prête à être libérée dans la circulation sanguine. Les réticulocytes subissent une dernière maturation dans la moelle osseuse avant de devenir des érythrocytes matures qui sont les globules rouges fonctionnels circulant dans le sang¹⁰¹. Notons qu'au fur et à mesure de l'avancement de la différenciation, la taille des progéniteurs diminue et la concentration totale en hémoglobine dans ces derniers, augmente¹⁰³.

Il est intéressant de préciser que dans certaines conditions d'anémie aiguë survient un phénomène d'érythropoïèse extra médullaire. Ce processus se produit notamment dans la rate¹⁰⁴. À ce moment-là, l'érythropoïèse est augmentée pour générer rapidement de nouveaux érythrocytes et répondre aux besoins accrus. Dans certaines conditions, il a également été montré que l'érythropoïèse pouvait avoir lieu dans le foie¹⁰⁵. Il est suggéré que l'érythropoïèse hépatique fœtale et l'érythropoïèse de stress peuvent être régulées par des mécanismes similaires, notamment par une voie dépendante de BMP4/SMAD5¹⁰⁶.

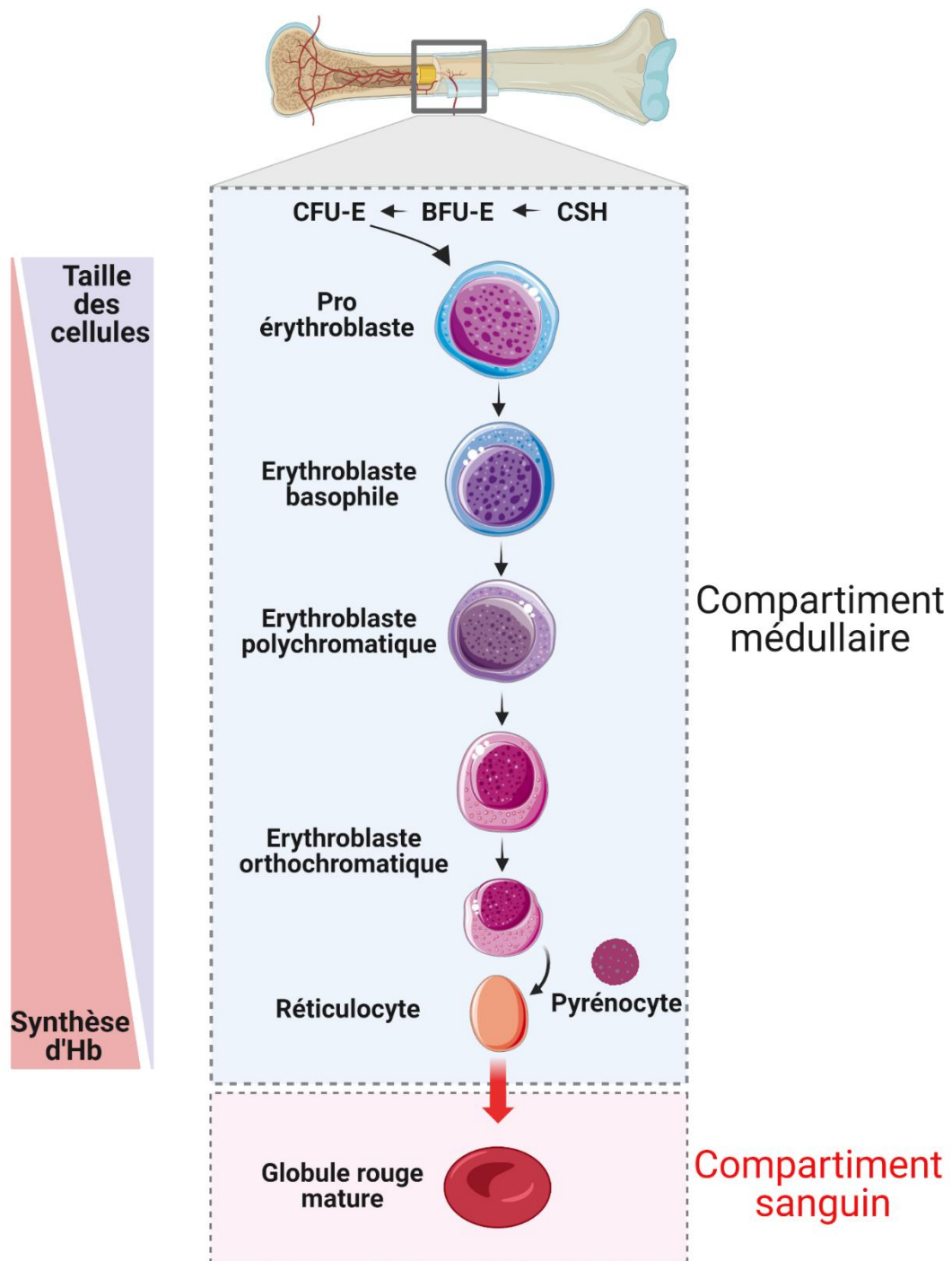


Figure 6 : L'érythropoïèse

Chez l'adulte, l'érythropoïèse a lieu dans la MO et permet la fabrication de GR à partir d'une CSH. Des précurseurs immatures de la lignée érythroïde (BFU-E puis CFU-E) se différencient en progéniteurs érythroblastiques. Ce proérythroblaste va alors subir différentes étapes successives de différenciation dans lesquelles la synthèse d'Hb permet son accumulation dans ces cellules. Une étape de maturation par expulsion du noyau (pyréno-cyte) permet alors de générer un réticulocyte qui en terminant sa maturation est libéré dans la circulation sanguine pour donner un nouveau GR.

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

Comme indiqué précédemment, une grande quantité de fer biodisponible est utilisée pour la production de nouveaux GR. Il est donc assez logique que l'érythropoïèse, en augmentant la production de GR, puisse influencer d'une quelconque manière les niveaux de fer dans le corps pour répondre à une demande accrue. Cette régulation se produit en grande partie par la modulation de l'expression de *hamp1* pour laquelle l'érythropoïèse entraîne la suppression de son expression¹⁰⁷.

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses équipes de recherche ont tenté d'identifier des facteurs potentiellement impliqués dans cette régulation. Une voie a particulièrement été étudiée, celle de l'EPO.

a. Régulation par l'érythropoïèse : l'axe EPO/ERFE/Hepcidine

L'érythropoïèse dépend de plusieurs cytokines et facteurs de croissance pour se dérouler correctement. L'une de ces cytokines est l'érythropoïétine, essentielle à divers stades du développement des globules rouges. Des études ont montré qu'une injection exogène d'EPO chez l'Homme entraînait une diminution des niveaux circulants d'hepcidine, suggérant que l'EPO pourrait être la molécule responsable de la régulation érythroïde de l'hepcidine¹⁰⁸. Cependant, des études antérieures chez la souris contredisent cette hypothèse, en indiquant que la suppression de l'érythropoïèse par des inhibiteurs a entraîné une augmentation des niveaux d'EPO sans pour autant supprimer l'hepcidine, suggérant que l'EPO pourrait ne pas être le régulateur érythroïde de l'hepcidine tant recherché¹⁰⁹.

En 1994, le Dr Clement Finch avait déjà postulé l'existence d'un "régulateur érythroïde", une molécule soluble libérée par les érythroblastes capable d'augmenter l'absorption intestinale du fer.¹¹⁰. Ce n'est que plus tard, qu'il sera décrit que cette protéine devrait être produite par des érythroblastes en prolifération, car le blocage de la prolifération cellulaire par des agents cytostatiques a atténué la régulation négative de l'hepcidine après la stimulation de l'érythropoïèse¹⁰⁹.

Par la suite, plusieurs molécules ont été proposées comme "régulateurs érythroïdes", telles que le facteur de différenciation de croissance 15 (GDF15), un membre de la famille des TGF β , produit et libéré par les érythroblastes en réponse à la stimulation de l'EPO¹¹¹, et la protéine TWSG1 (Twisted gastrulation protein homolog 1), un antagoniste de la voie BMP fortement exprimé dans les érythroblastes précoces et les souris thalassémiques¹¹². Cependant, leur rôle en tant qu'inhibiteurs *in vivo* de l'hepcidine reste flou, car des études sur un modèle murin *Gdf15*^{-/-} ont montré que l'absence de cette cytokine n'abolit pas la suppression de l'hepcidine, en réponse à un stimulus érythropoïétique¹¹³.

C'est n'est qu'en 2014 que le Dr Léon Kautz et ses collègues identifient le régulateur érythroïde tant recherché, il répond au nom d'érythroferrone (ERFE)¹¹⁴. Cette protéine a été identifiée en recherchant des ARNm codant pour des protéines sécrétées spécifiques des cellules érythroïdes et dont l'expression était augmentée après stimulation de l'érythropoïèse, par injection d'EPO ou par phlébotomie. Ainsi, lorsque les niveaux d'EPO sont augmentés, en raison d'une anémie ou d'une hypoxie, l'expression d'ERFE est positivement régulée dans les progéniteurs érythroïdes et la protéine est libérée dans la circulation. Ce mécanisme, dépendant de la voie de signalisation JAK2-STAT5 entraîne une libération d'ERFE qui inhibe l'expression de l'hepcidine en se liant et en séquestrant plusieurs BMP, telles que BMP5, BMP7 et la BMP6 régulée par le fer^{115,116}. En conséquence, la baisse de l'expression de l'hepcidine entraîne la stabilisation de la FPN à la surface des entérocytes, des macrophages et hépatocytes, augmentant ainsi la biodisponibilité du fer dans la circulation pour soutenir la synthèse de l'hémoglobine dans les érythroblastes en développement.

À un état basal, les souris *Fam132*^{-/-} (déficientes pour le gène codant pour ERFE) ne présentent pas de phénotype particulier, car leurs niveaux d'hepcidine sont comparables à ceux des souris sauvages. Cependant, lorsque les niveaux d'EPO sont élevés, ces souris ne parviennent pas à réguler correctement l'hepcidine comme le font leurs homologues sauvages. Elles sont ainsi retardées dans la récupération liée à une baisse de la production de l'hémoglobine, ne pouvant pas augmenter les entrées de fer dans la circulation. ERFE est régulée de manière positive dans les tissus érythroïdes dans diverses conditions caractérisées par une augmentation des niveaux

d'EPO sérique et une érythropoïèse accrue. Cela inclut des situations telles que l'anémie ferriprive, l'hypoxie et les maladies associées à une érythropoïèse inefficace, comme la bêta-thalassémie. Dans ces conditions, une surproduction d'ERFE peut entraîner une accumulation excessive de fer, délétère pour les organismes¹¹⁷.

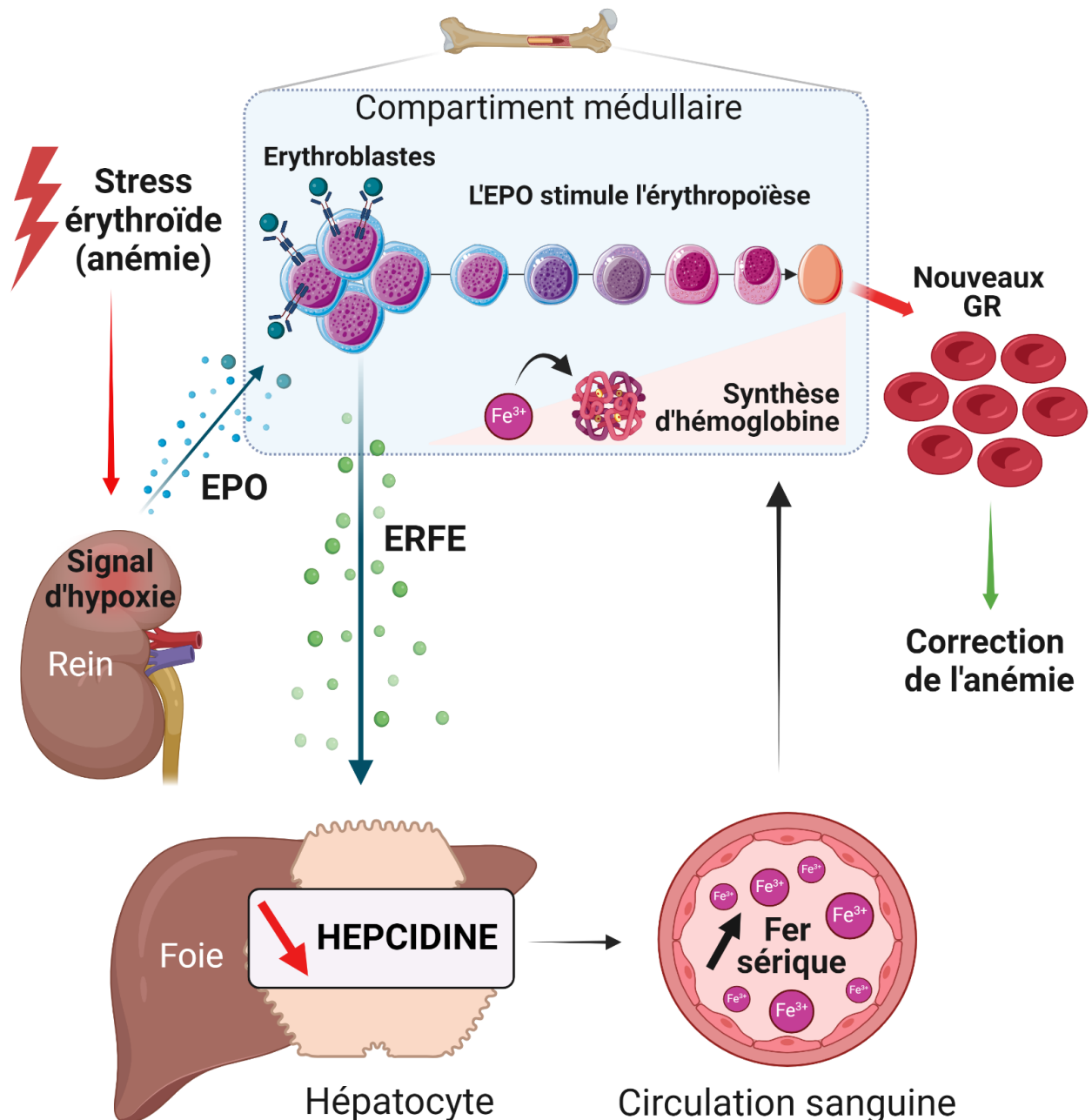


Figure 7 : Mécanisme de réponse à l'anémie aiguë via la suppression de l'hepcidine par des signaux érythropoïétiques

Lors d'un stress anémique, l'EPO produit par les reins stimule l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. En réponse à l'EPO, les érythroblastes produisent ERFE ce qui permet d'inhiber la production d'hepcidine par les hépatocytes le foie. La diminution des niveaux d'hepcidine favorise l'absorption intestinale du fer et son relargage par les macrophages, ce qui entraîne une augmentation de la biodisponibilité du fer pour l'érythropoïèse, corrigeant ainsi l'anémie.

En résumé, les données à ce jour suggèrent qu'ERFE joue un rôle crucial dans la régulation négative de l'hepcidine lors de situations d'érythropoïèse de stress aiguë. Cependant, ce mécanisme semble moins pertinent dans des conditions chroniques, dans lesquelles d'autres voies de régulation sont probablement impliquées.

b. Régulation par un signal hypoxique : Les HIF

L'augmentation de l'érythropoïèse est la résultante des mécanismes de réponse à l'hypoxie induits par des perturbations physiologiques, pour répondre à une demande accrue en oxygène. Les compartiments érythroïdes retrouvés principalement dans la MO ainsi que dans la rate (et dans certaines conditions dans le foie) dépendent d'un apport constant en fer pour répondre à cette demande, liant ainsi les conditions d'hypoxie à l'homéostasie du fer.

Lors de l'hypoxie, une famille de protéines sensibles à la disponibilité de l'oxygène est générée par l'organisme pour établir des solutions face au manque d'oxygène¹¹⁸. Ces protéines sont des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie ou HIF (hypoxia inducible factor) et modulent l'expression de certains gènes cibles en se fixant sur leurs régions promotrices dans des zones très précises appelées « élément de réponse à l'hypoxie » ou HRE. Ces gènes cibles sont notamment impliqués dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse ainsi que le métabolisme du fer¹¹⁹.

Pour résumer leur fonctionnement global, les HIF sont des facteurs de transcription composés de deux sous-unités principales : HIF- α et HIF- β . La sous-unité HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) est sensible à l'oxygène et joue un rôle central dans la régulation de la réponse hypoxique. La sous-unité HIF- β (appelée également ARNT pour "aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator") est constitutivement exprimée.

En condition normale ou normoxique, les protéines HIF- α sont hydroxylées par des enzymes prolyl-hydroxylases (PHD) au niveau de résidus prolines spécifiques. Cette hydroxylation dépend de la présence d'oxygène et de fer. Les protéines hydroxylées sont reconnues par le complexe de protéines VHL (Von Hippel-Lindau) qui les marque pour dégradation par le protéasome. Ainsi, en présence d'oxygène, les protéines HIF- α sont rapidement dégradées et leur activité transcriptionnelle est inhibée¹²⁰.

Lorsque les cellules sont exposées à des niveaux réduits d'oxygène, c'est à dire l'hypoxie, l'hydroxylation des protéines HIF- α par les PHD est inhibée en raison du manque du substrat oxygène. En conséquence, les protéines HIF- α ne sont pas marquées pour dégradation par le complexe VHL et s'accumulent dans le cytoplasme. Les protéines HIF- α stabilisées transloquent alors vers le noyau, où elles forment un complexe avec la sous-unité HIF- β . Ce complexe HIF est alors capable de se lier aux HRE présents dans les promoteurs de gènes cibles.

Plusieurs études ont mis en évidence une régulation directe de l'hepcidine par les HIF. Il a été démontré que la liaison de HIF-1 α et HIF-2 α aux motifs HRE présents dans le promoteur de l'hepcidine conduit à une diminution de sa production^{121,122}.

Par ailleurs, les conditions hypoxiques induisent la modulation de certaines protéines de l'épithélium intestinal dans le but d'augmenter l'absorption du fer au niveau intestinal. Le duodénum entraîne la stabilisation de HIF2a pour activer des gènes cibles tels que *Slc11a2* (codant pour le transporteur DMT1, décrit en chapitre 1), *DcytB* ou encore *Fpn1* afin de favoriser leur synthèse. Ces surexpressions ont pour but de d'augmenter l'absorption du fer au pôle apical des entérocytes mais aussi l'export au pôle basal, indépendamment de l'hepcidine¹²³

L'hypoxie peut également augmenter les niveaux d'ARNm de la protéase transmembranaire Tmprss6, entraînant une diminution de la transcription du gène de l'hepcidine. Un élément de réponse à l'hypoxie a ensuite été trouvé dans le promoteur du gène *Tmprss6*, confirmant qu'il pourrait être directement affecté par une augmentation des HIF¹²⁴.

c. Le fibrinogen-like 1, un nouvel acteur de la régulation négative de l'hepcidine

Les données de la littérature laissent sous-entendre l'existence d'un possible autre régulateur négatif de l'hepcidine qui pourrait être impliqué lors de l'anémie. En effet, bien que les souris ERFE KO soient incapables de supprimer l'hepcidine dans les premières heures suivant un stress érythroïde, ces dernières finissent par réguler négativement l'hepcidine à des niveaux identiques aux souris sauvages¹¹⁴. Ces données suggèrent qu'un autre régulateur existe et permet la suppression de l'hepcidine dans des phases plus tardives de l'anémie.

Très récemment, l'équipe du Dr Léon Kautz a identifié un nouveau candidat. Il s'agit de la protéine fibrinogène-like 1 (FGL1). FGL1 est une hépatokine de type glycoprotéine appartenant à la famille des fibrinogènes. Son implication a déjà été décrite dans des contextes d'immunité, de cancer ou encore de métabolisme glucidique. Dans leurs travaux, les auteurs décrivent un rôle suppresseur de l'hepcidine dans des conditions d'anémie induite par hémorragie¹²⁵. Ces derniers font état d'une protéine sécrétée par le foie en réponse à l'anémie de manière indépendante de l'EPO qui agirait comme un piègeur de BMP6 pour inactiver la voie canonique BMP-SMAD de l'expression de l'hepcidine. Cependant, les données proposées par les auteurs ne permettent pas de déterminer si FGL1 permet de maintenir une inhibition à plus long terme.

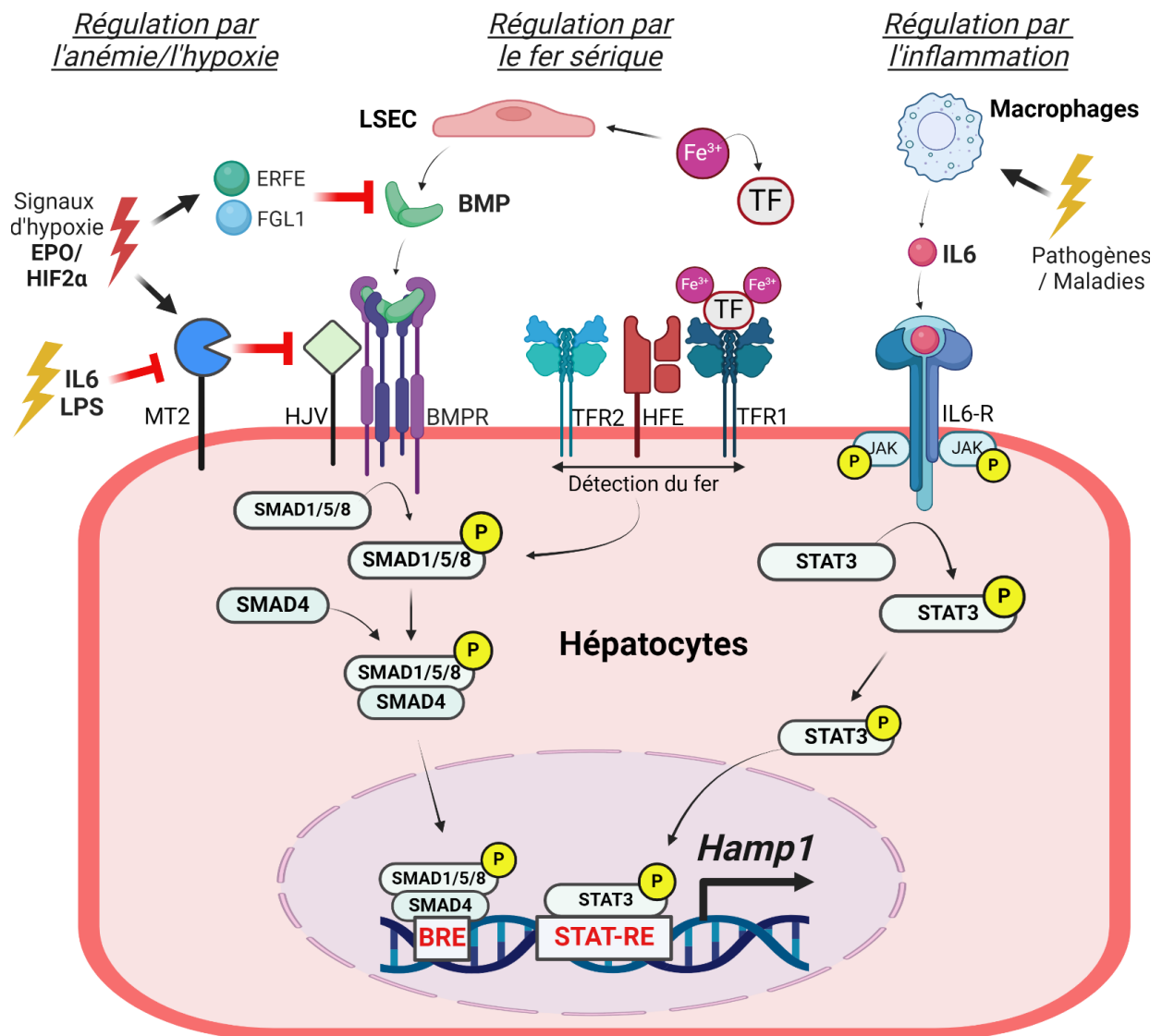


Figure 8 : Schéma récapitulatif des différents acteurs des voies de signalisation de l'hépcidine

L'expression de l'hépcidine est régulée principalement par deux voies. La voie BMP-SMAD, qui est activée par les protéines BMP2 et BMP6. Ces dernières se lient aux BMPR présents à la surface des hépatocytes, activant la phosphorylation des protéines SMAD1/5/8 qui vont alors former un complexe avec SMAD4 et transloquer dans le noyau pour stimuler la transcription de l'hépcidine en se fixant sur le BRE. La deuxième voie d'induction de l'hépcidine est la voie IL-6/JAK-STAT3 qui est activée lors de l'inflammation où l'IL6 se lie à son récepteur, activant la kinase JAK. Celle-ci phosphoryle la protéine STAT3 qui transloque dans le noyau pour induire la transcription de l'hépcidine via le STAT-RE. Ces voies permettent une régulation fine de l'hépcidine en réponse aux niveaux de fer et à l'inflammation. Les protéines ERFE et FGL1, induites en cas d'hypoxie, inhibent la voie BMP-SMAD en piégeant les ligands BMP. La matriptase-2 permet également d'inhiber l'hépcidine pour établir des niveaux basaux d'hépcidine, en agissant sur les BMPR. Les protéines TFR2/HFE et TFR1 sont également indirectement impliquées dans l'expression de l'hépcidine en modulant la voie BMP-SMAD, en fonction des niveaux de fer sanguins.

IV. Fonction de la matriptase-2 dans la régulation négative de l'hepcidine

Les divers régulateurs de l'hepcidine précédemment décrits dans ce chapitre partagent tous comme point commun un mécanisme d'action endocrine. En effet, qu'ils induisent une régulation positive ou négative de l'hepcidine, tous ces facteurs sont sécrétés dans le sang par différents types cellulaires, agissant sur différentes voies de signalisation dans les hépatocytes pour contrôler l'homéostasie du fer. Toutefois, un autre régulateur existe, ce dernier est présent à la surface même des hépatocytes et fonctionne de manière autocrine pour inhiber la synthèse de l'hepcidine. Il s'agit d'une protéase transmembranaire largement exprimée par les hépatocytes : la matriptase-2.

1. Description : structure, localisation et fonction principale

La matriptase-2 (MT2), est une enzyme protéolytique transmembranaire appartenant à la famille des protéases à serine. Cela signifie que son site catalytique contient en son centre un résidu serine nécessaire au fonctionnement de l'enzyme. Elle est codée chez l'Homme comme chez la souris par le gène *Tmprss6*. D'un point de vue biochimique cette enzyme est structurée avec une courte partie cytoplasmique à son extrémité N-terminale, une région transmembranaire, un assemblage complexe de domaines extracellulaires (une région SEA, 2 domaines CUB ; 3 régions LDLRA) et à l'extrémité C-terminale un domaine de protéase sérine de type trypsine.

La MT2 est synthétisée sous la forme d'une pro enzyme composée d'une simple chaîne. Pour s'auto activer, celle-ci va cliver un résidu arginine au niveau d'une région RIVGG entre le prodomaine et le domaine catalytique¹²⁶. Après l'auto activation, il reste lié à la membrane via une seule liaison disulfure reliant les domaines pro- et catalytique¹²⁷.

La matriptase-2 est exprimée principalement à la surface des hépatocytes du foie. Elle est également présente dans d'autres tissus et organes, bien que sa

concentration puisse varier en fonction du type cellulaire et des conditions physiologiques. On retrouve son expression dans les reins, la rate, les poumons, les glandes mammaires, les testicules et l'utérus¹²⁷. La matriptase-2 est principalement impliquée dans la régulation de l'homéostasie du fer dans l'organisme. Dans ce contexte elle agit en tant que suppresseur de l'hépcidine¹²⁸. Ainsi, en inhibant l'expression de l'hépcidine, la matriptase-2 favorise l'absorption du fer dans l'intestin grêle et sa libération par les macrophages, contribuant ainsi à maintenir des niveaux appropriés de fer dans le corps.

Le lien entre l'activité de la MT2 et la régulation du fer dans l'organisme a été mis en évidence pour la première fois en 2008 lorsqu'une équipe de chercheurs a étudié le phénotype d'un modèle murin exprimant de façon inductible une version tronquée de TMPRSS6 et dépourvue de son domaine catalytique : les souris « mask »¹²⁹. Ces souris mask, appelées ainsi en raison de leur alopecie (perte des poils sur pratiquement tout le corps à l'exception de la tête), développent une anémie microcytaire hypochrome. C'est-à-dire une anémie caractérisée par des globules rouges de taille réduite et moins concentrés en hémoglobine. Ce phénotype est la résultante de niveaux d'hépcidine anormalement élevés en comparaison à des souris sauvages. On dit que ces souris souffrent d'une anémie ferriprive, c'est-à-dire une anémie liée à une carence en fer.

Chez l'Homme, des mutations de la matriptase-2 sont à l'origine d'une maladie rare appelée IRIDA pour « iron refractory iron deficiency anemia »¹³⁰.

2. Mécanisme de régulation de l'hépcidine par la matriptase-2 dans le foie

A ce jour, le mécanisme *in vivo* exact par lequel la MT2 inhibe l'hépcidine demeure assez mal caractérisé. Toutefois, des preuves tirées de la littérature indiquent que ce mécanisme dépend de la voie de signalisation BMP-SMAD. Par exemple, dans des études *in vitro*, il a été démontré que la matriptase-2 peut cliver le récepteur HJV, réduisant ainsi la signalisation BMP-SMAD et entraînant une diminution de l'expression de l'hépcidine¹²⁸. De plus, des observations *in vivo* sur des souris

déficientes en *Tmprss6* ont montré une hyperactivation de la voie de signalisation BMP-SMAD, caractérisée par une augmentation de l'expression de l'ARNm *Id1* et de la protéine SMAD phosphorylée, dans le foie¹³¹.

Par ailleurs, des études ont également révélé que l'inactivation génétique de *Tmprss6* préserve la surcharge en fer chez les souris déficientes en *Hjv*, renforçant l'idée que HJV est probablement un substrat de la matriptase-2. Cependant, des recherches *in vivo* plus récentes ont remis en question cette hypothèse en montrant que le récepteur HJV n'est pas augmenté dans le foie des souris déficientes en *TMPRSS6*, comme on pourrait s'y attendre s'il était clivé par la protéase^{132,133}. Ainsi, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer de manière concluante que HJV est une cible *in vivo* de la matriptase-2 et pour éventuellement identifier d'autres substrats impliqués dans ce mécanisme.

Un peu plus tard, de nouvelles observations ont été faites sur le fonctionnement physiologique de la MT2. Il a été décrit que l'administration d'EPO à des souris *Tmprss6*^{-/-} n'a pas permis de corriger l'anémie microcytaire de ces dernières¹³⁴. En effet, à l'inverse des souris WT chez lesquelles l'injection d'EPO a permis l'augmentation de l'érythropoïèse tout en inhibant l'hepcidine, aucune modification des paramètres hématologiques ni de l'expression de l'hepcidine n'a été observée chez les souris mutantes pour la MT2, en réponse à l'EPO¹³⁵. Ces constatations ont conduit à la conclusion que la MT2 fonctionnelle est indispensable à la régulation négative de l'hepcidine lors d'une érythropoïèse de stress. Cependant, le rôle exact de la MT2 dans cette régulation n'a pas encore été défini.

Par la suite, la découverte de l'érythroferrone en tant que régulateur de l'expression de l'hepcidine par les érythroblastes lors de l'érythropoïèse a soulevé l'hypothèse selon laquelle la MT2 pourrait être nécessaire au bon fonctionnement de ERFE. Il a alors été envisagé que la MT2 pourrait être impliquée dans le traitement protéolytique de ERFE ou d'un potentiel récepteur hépatocytaire¹³⁶. Cependant, à ce jour, un tel mécanisme semble improbable car ERFE n'a pas besoin d'un récepteur hépatocytaire pour exercer sa fonction puisque la protéine agit comme piègeur des ligands BMP pour atténuer la signalisation BMP-SMAD de l'hepcidine.

Pour résumer, à ce jour le mode d'action précis de la matriptase-2 dans la régulation de l'hepcidine demeure flou, et des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider ce mécanisme.

3. Régulation de la matriptase-2 hépatique

Des recherches ont démontré que l'expression de la matriptase-2 peut être influencée par les niveaux de fer dans l'organisme. En effet, une régulation positive de la MT2 en cas de privation en fer chez le rat a été observée pour inhiber la production d'hepcidine¹³⁷. De plus, chez la souris, les taux de MT2 augmentent en réponse à un apport chronique en fer et à l'administration de BMP6, probablement pour prévenir une surproduction d'hepcidine, suggérant un double rôle de la matriptase-2 dans le maintien de l'équilibre du fer en réponse à sa disponibilité¹³⁸.

Par ailleurs, l'expression de l'ARNm de *Tmprss6* est réprimée en cas d'inflammation. En effet, des études sur des cellules hépatiques humaines traitées à l'IL6, ainsi que des souris traitées au LPS ont montré une régulation négative de *TMPRSS6*. Cette régulation est indépendante de la voie BMP/SMAD, et se fait par le biais de la diminution de la phosphorylation de STAT5⁹⁹. Enfin, la matriptase-2 est également positivement régulée en cas d'hypoxie et sous l'influence de l'érythropoïétine^{137,138}.

4. Expression de la matriptase-2 dans les autres tissus

Bien que majoritaire dans le foie, l'expression de la MT2 est retrouvée dans différents organes chez l'Homme et chez la souris¹²⁷. Il n'est donc pas complètement défini que la régulation de l'hepcidine, qui demeure encore aujourd'hui assez floue, ne soit pas sous l'influence d'une expression de la MT2 extérieure aux hépatocytes. En effet, la littérature est fournie de données sur la régulation de l'hepcidine par la MT2 mais la preuve exacte de sa régulation directe par les hépatocytes n'a toujours pas été faite.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont inclus un projet secondaire portant sur le rôle de la MT2 hépatocytaire dans la régulation de l'hepcidine. Pour répondre à cette problématique, nous avons notamment développé un modèle murin de délétion spécifique de la MT2 dans les hépatocytes (*Tmprss6*^{Alb/Alb}). Nous nous sommes alors demandé si le phénotype de ces souris, en condition basale et en réponse à un stress de l'érythropoïèse, récapitulait totalement ou seulement en partie le modèle *Tmprss6*^{-/-} ubiquitaire.

V. Pathologies liées à une dérégulation du métabolisme du fer

Les maladies liées à une dérégulation du métabolisme du fer sont diverses, allant de la carence à la surcharge en fer. De nombreuses pathologies génétiques entraînent des défauts dans la production d'hepcidine. Les mutations conduisant à une diminution de l'expression de l'hepcidine provoquent une accumulation de fer, à l'origine de pathologies connues sous le nom d'hémochromatose¹⁴¹.

À l'inverse, une augmentation de l'expression de l'hepcidine due à une mutation peut causer une carence en fer, comme dans les anémies inflammatoires¹⁰⁰ ou dans le syndrome IRIDA¹³⁰.

Mon sujet de thèse s'est initialement articulé autour de la régulation négative de l'hepcidine dans des conditions de stress érythroïde. L'objectif était de caractériser de nouveaux régulateurs négatifs de l'hepcidine, notamment le récepteur PAR₂, développé en suivant (**chapitre 3**) et ainsi déterminer si ces derniers pourraient être utilisés comme levier dans le traitement de certaines maladies liées à des dérégulation de l'hepcidine, notamment des pathologies telles que la β -thalassémie.

La β -thalassémie est une maladie qui perturbe le métabolisme du fer, bien qu'elle ne soit pas directement liée à des mutations des gènes régulant l'hepcidine. Il s'agit d'une pathologie génétique grave du sang, causée par une mutation du gène de la β -globine. La conséquence de cette mutation est une production défectueuse de la chaîne β qui résulte en une cascade dévastatrice : un déséquilibre dans la synthèse

de la chaîne α/β -globine, une érythropoïèse inefficace et une survie réduite des globules rouges entraînant l'anémie¹⁴². Les phénotypes diffèrent entre des β - thalassémies homozygotes ou hétérozygotes et comprennent la thalassémie majeure (TM) et la thalassémie intermédiaire (TI). On dit que c'est une pathologie liée à un surcharge en fer secondaire. En effet, dans la thalassémie, une érythropoïèse excessive supprime l'hepcidine de manière chronique, augmentant ainsi l'absorption du fer responsable *in fine* d'une surcharge¹⁴³.

A l'inverse, comme vu dans la partie portant sur l'inflammation, une induction chronique de l'hepcidine est à l'origine d'une privation en fer et aboutit à l'anémie. Ce phénomène est observé dans certaines maladies inflammatoires chroniques comme l'insuffisance rénale¹⁴⁴, les infections, l'insuffisance cardiaque chronique¹⁴⁵, les maladies auto-immunes ou encore le cancer¹⁰⁰.

En conclusion, l'identification de nouveaux régulateurs négatifs de l'hepcidine pourrait donc contribuer au développement de nouvelles thérapies efficaces et ainsi permettre l'amélioration de la qualité de vie d'un nombre non négligeable de patients.

Chapitre 3 : PAR₂, récepteur activé par les protéases

Dans ces travaux, nous avons étudié l'implication du récepteur PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine. En utilisant des approches *in vivo* via différents modèles PAR₂ KO, nous avons mis en évidence son rôle dans l'inhibition de l'hormone hépatique, dans des conditions de stress érythropoïétique. C'est-à-dire un stress anémique qui requiert la production de nouveaux globules rouges par une activation plus forte de l'érythropoïèse.

Ainsi, ce troisième chapitre est consacré à l'introduction du récepteur PAR₂, une protéine transmembranaire impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques faisant le lien entre l'activité cellulaire et l'environnement protéolytique. Nous abordons dans un premier temps des notions générales autour de cette famille particulière composée de quatre récepteurs. Puis nous rentrons plus en détail sur l'implication de PAR₂ en physiologie. Enfin nous exposons quelques éléments de la littérature à l'origine des hypothèses que nous avons formulées. Précisons qu'à ce jour, la fonction de PAR₂ dans la régulation du métabolisme du fer n'a encore jamais été décrite.

I. Introduction générale sur les PAR

Les protéases sont des enzymes essentielles impliquées dans une multitude de processus biologiques, allant de la digestion des aliments à la régulation de la coagulation sanguine. Ces enzymes agissent comme des ciseaux moléculaires en coupant les liaisons peptidiques de leurs protéines cibles, modifiant ainsi leur structure et leur fonction. Par conséquent, les protéases jouent un rôle crucial dans la régulation fine de nombreux processus physiologiques.

Une découverte significative dans le domaine de la signalisation cellulaire a été celle d'une famille de récepteurs activés par les protéases : les PAR pour « protease-activated receptor ». En effet, c'est au début des années 1990 que le récepteur PAR₁ est découvert. Il est alors désigné sous le nom de "récepteur à la thrombine" en raison de son activation par cette protéase, impliquée dans le processus de coagulation sanguine¹⁴⁶.

La mise en lumière de cette découverte a ainsi conduit à l'identification d'une famille complète de récepteurs capables d'être activés par les protéases, ouvrant alors de nouvelles perspectives de recherche sur les mécanismes de signalisation cellulaire. Cette avancée a suscité un intérêt considérable dans le traitement de diverses pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, ou encore cancéreuses.

Dans cette partie, nous établissons dans un premier temps, un portrait général des PAR tout en soulignant leur mode d'action particulier. Dans un second temps, nous explorerons de manière plus détaillée le récepteur PAR₂ et son implication en physiologie puisque celui-ci a été au centre d'une de nos problématiques de thèse concernant son implication en tant que régulateur négatif de l'hepcidine.

1. Qu'est-ce que les PAR ?

Les récepteurs activés par les protéases ou PAR (« proteases-activated receptors ») font partie d'un ensemble de récepteurs couplés aux protéines G transmembranaires (RCPG) qui représente une des plus grandes familles de récepteurs membranaires, ciblés pharmacologiquement par un tiers des médicaments thérapeutiques existant sur le marché. Ces PAR sont au nombre de 4 : PAR₁, PAR₂, PAR₃, et PAR₄. Comme leur nom l'indique, la spécificité des PAR est qu'ils peuvent être activés par des protéases qui, au-delà de leur premier rôle protéolytique, vont agir comme des médiateurs hormonaux ou des substances paracrines, pour réguler *in fine* l'activité de certaines cellules¹⁴⁷. En effet, le fonctionnement principal des PAR repose sur le clivage protéolytique d'un de leur fragment N-terminal extra cellulaire permettant de révéler un ligand captif activant alors le récepteur et induisant un changement conformationnel de ce dernier pour initier une signalisation. Ce mécanisme d'activation est détaillé dans les pages suivantes.

Chez l'Homme comme chez la souris, les PAR sont largement exprimés dans tout l'organisme et peuvent être activés par diverses protéases. Aujourd'hui, il est bien établi que les PAR jouent rôle crucial en tant que régulateurs de divers processus physiologiques et sont associés à de nombreuses conditions pathologiques. Par exemple, PAR₁ et PAR₄ jouent un rôle essentiel dans la régulation de la fonction plaquettaire dans laquelle ils participent grandement à l'hémostase du système circulatoire, tandis que PAR₂ est solidement décrit comme un médiateur des réponses inflammatoires¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

2. Structure génique et protéique des PAR

Les PAR sont respectivement codés dans l'ordre numéraire par les gènes : *F2R* ; *F2RL1* ; *F2RL2* et *F2RL3*. Chez l'Homme, les gènes codant pour PAR_{1,2} et ₃ sont situés sur le chromosome 5 tandis que PAR₄ se trouve sur le chromosome 19. Quant à la souris, les loci *F2r* ; *F2rl1* et *F2rl2* sont sur le chromosome 13, situés à moins de 80 kilobases les uns des autres et *F2rl3* sur le chromosome 8. Les gènes des récepteurs PAR sont tous constitués de deux exons séparés par un intron de taille

variable. Le premier exon code pour un peptide signal tandis que le second contient la séquence du récepteur mature¹⁵¹.

D'un point de vue protéique, les récepteurs PAR appartiennent à la classe A des RCPG appelée également "Rhodopsin-like". Les PAR sont constitués de sept domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires (ECL1-3) et 3 intracellulaires (ICL1-3). Leur région N-terminale est extracellulaire et comprend un peptide signal suivi d'un propeptide. Lors de l'activation du récepteur, ce propeptide est clivé au niveau d'un site de clivage canonique, exhibant un ligand captif du côté N-terminal du récepteur. Le domaine C terminal est intracellulaire. La stabilité des PAR est notamment permise par un pont disulfure entre la partie transmembranaire 3 et la boucle ECL3¹⁵².

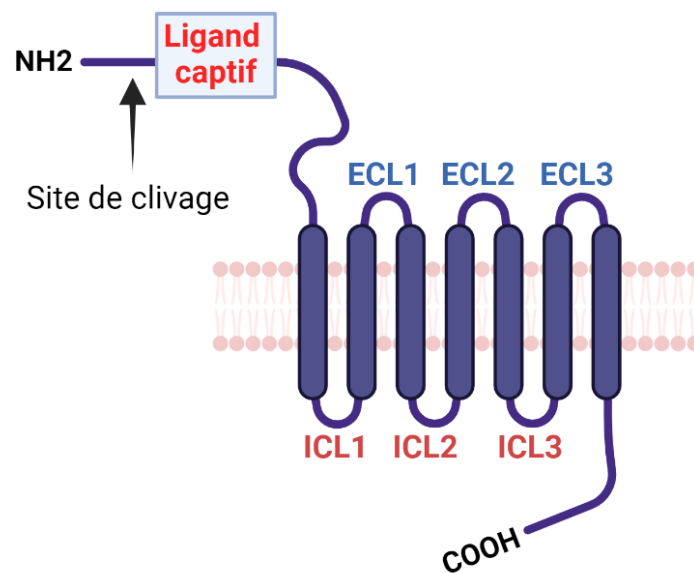


Figure 9 : Caractéristiques structurales des PAR

Les PAR ont une structure commune constituée de 7 domaines transmembranaires reliés par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. Du côté N-terminal se trouve un ligand captif en aval du site de clivage canonique. Le pôle C-terminal est intracellulaire.

Dans l'ensemble, chaque PAR est associé à une protéase spécifique, considérée comme son activateur canonique. Par exemple, la thrombine est l'activateur canonique de PAR₁, PAR₃ et PAR₄, tandis que la trypsine est préférentiellement associée à l'activation de PAR₂.

3. Mécanismes d'activation principaux des PAR

Comme introduit précédemment, le mécanisme d'activation des PAR repose sur des clivages spécifiques et irréversibles par différentes protéases. Celles-ci ont une origine endogène, pouvant provenir du micro-environnement de la cellule, de la circulation sanguine ou une origine exogène, provenant d'organismes extérieurs (bactéries, champignons, plantes etc..). Ces protéases activent les PAR en clivant une séquence spécifique qui entraîne la libération d'un ligand captif, on parle alors d'activation canonique¹⁴⁶. En effet, contrairement à des récepteurs classiques agissant par une interaction spatiale avec un ligand, les PAR sont activés par le clivage protéolytique à leur extrémité N-terminale. Ce clivage spécifique libère un fragment peptidique et permet l'exposition d'une nouvelle séquence d'environ 6 acides aminés qui était précédemment captive car liée au pro-peptide de la séquence du domaine N-terminal. Après élimination du pro-peptide par la protéase, le ligand captif endogène appelé TL (tethered ligand) est libéré. Ce dernier peut alors interagir avec la deuxième boucle extracellulaire, activant le PAR. L'activation induit alors un changement de conformation des domaines transmembranaires ce qui active une voie de signalisation en aval. Dans les voies classiques, les récepteurs activés recrutent différentes protéines G (Gq, Gi, G12/13) pour médier la signalisation cellulaire. Cette signalisation peut être dépendante de la mobilisation du calcium intracellulaire, ou encore de l'activation de diverses protéines kinases.

Des mécanismes alternes ont également été décrits au fil de ces dernières années comme par exemple des clivages sur des sites distincts du site canonique pouvant entraîner une réponse cellulaire différente par la cellule, on parle alors de signalisation biaisée¹⁵³. De plus, certaines protéases peuvent cliver un site non canonique sans entraîner de signalisation. Ces événements n'induisent pas d'activation directe du récepteur mais le rendent insensible à d'autres protéases dont le mode d'action est de cibler un domaine canonique. Dans ces conditions, l'excision de l'extrémité concernée de façon définitive entraîne un désarmement du récepteur rendant celui-ci insensible à sa protéase canonique¹⁵⁴. Pour illustrer ce propos, nous pouvons prendre l'exemple de PAR₂. Parmi les protéases pouvant cliver PAR₂, la cathepsine G a été décrite comme une enzyme pouvant désarmer le récepteur¹⁵⁵.

Enfin, des peptides synthétiques de quelques acides aminés mimant la séquence des ligands endogènes peuvent activer spécifiquement les PAR. Nous revenons sur ces points dans la partie suivante, dédiée spécifiquement au récepteur PAR₂.

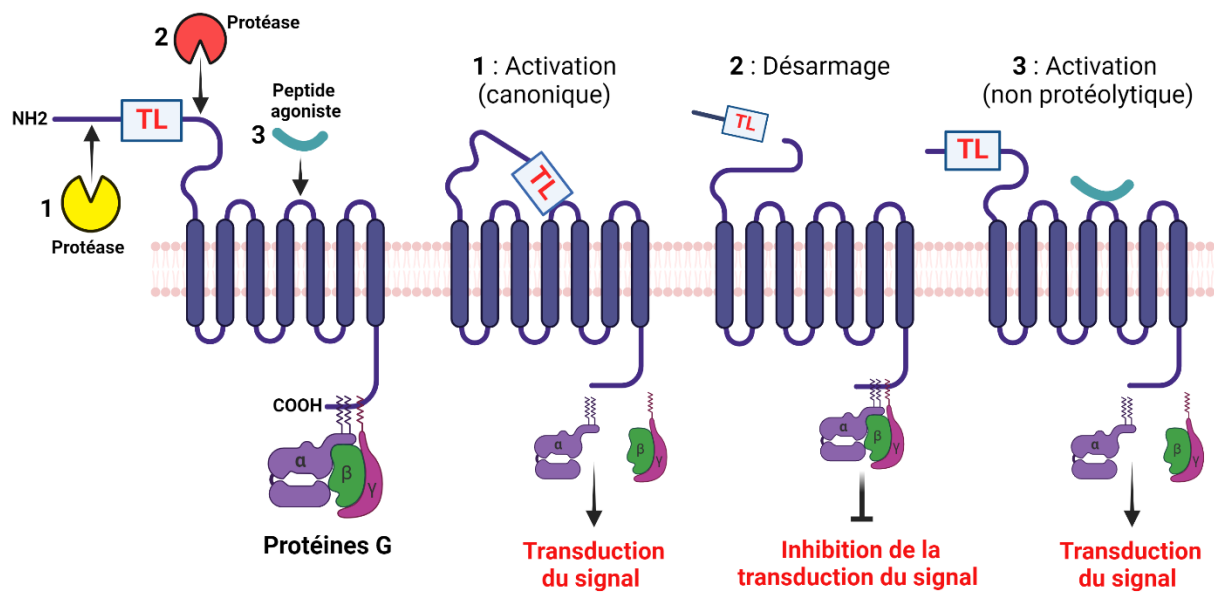


Figure 10 : Mécanismes d'activation et d'inhibition des PAR

(1) Des protéases peuvent cliver le site canonique des PAR, libérant ainsi le TL et entraînant son interaction avec la boucle ECL2. Cette activation déclenche la transduction du signal intracellulaire via le recrutement de protéines G. (2) Des protéases peuvent cliver les PAR en aval du TL ce qui libère la séquence et désarme le récepteur, le rendant insensible au clivage par d'autres protéases. (3) Des peptides exogènes mimant la séquence du TL peuvent activer les PAR en se fixant sur la boucle ECL2 et ainsi activer la transduction du signal indépendamment d'un mécanisme protéolytique.

II. Introduction générale sur le récepteur PAR₂

1. Description générale, structure et localisation du récepteur PAR₂

Historiquement, le récepteur PAR₂ a été découvert quelques temps après PAR₁, c'est-à-dire en 1994¹⁵⁶. Les auteurs décrivent alors un gène murin qui code pour un RCPG qui est prédit comme ressemblant fortement à PAR₁. Cette ressemblance est à l'origine du nom du gène qui code la protéine : *F2RL1* pour *F2R Like trypsin receptor 1*. Cependant, les deux protéines ne partagent que 30% d'homologie et il est démontré que le récepteur n'est pas clivé par la thrombine mais par la trypsine¹⁵⁷.

Le gène codant pour PAR₂ s'étend sur plus de 13 kb. Les deux exons sont séparés par un intron d'environ 10 kb. Le premier modèle murin PAR₂ KO (*F2rl1*^{-/-}) est apparu en 1999 et ce n'est qu'en 2017 qu'est décrite la structure de la protéine lors d'expériences de cristallographie^{158,159}. En utilisant des antagonistes et anticorps, cette découverte met alors en évidence la structure complexe de PAR₂ ainsi que ses similitudes et différences avec le récepteur PAR₁.

En terme de localisation, la littérature décrit que PAR₂ est largement exprimé dans le système gastro-intestinal c'est-à-dire dans le côlon, le duodénum, l'intestin grêle, l'estomac et la vésicule biliaire¹⁵⁷. Toutefois, son expression n'est pas cantonnée au tractus digestif ; on le retrouve également dans les cellules immunitaires telles que les monocytes, les neutrophiles, les mastocytes et les macrophages, ainsi que dans les neurones et le système vasculaire les cellules musculaires lisses et endothéliales¹⁵³.

Dans le foie, bien que décrit dans les hépatocytes, l'expression de PAR₂ semble restreinte aux cellules non-parenchymateuses, en particulier dans les macrophages et les cellules endothéliales. Nous reviendrons sur ce point important car celui-ci fait l'objet de certains de nos résultats.

2. Activation/Inhibition de PAR₂

a. Ligands endogènes ou d'origine biologique

La découverte du fonctionnement des PAR via une activation protéolytique a ouvert la voie à la recherche de protéases activatrices/inhibitrices de ces derniers, dans l'organisme. La trypsine est la protéase canonique de PAR₂ : chez l'Homme, elle clive PAR₂ au niveau des résidus Arg³⁶/Ser³⁷ pour révéler le ligand captif SLIGKV alors que chez la souris, celle-ci clive PAR₂ au niveau des résidus Arg³⁸/Ser³⁹, exposant le ligand captif SLIGRL¹⁴⁷.

Il existe toutefois d'autres activateurs dont voici quelques exemples. D'abord, il a été montré que l'activation de PAR₂ est médiée par la tryptase des mastocytes¹⁶⁰. De plus, PAR₂ peut être activé indirectement par le facteur Xa (FXa) généré par le TF (Tissular factor)-FVIIa¹⁶¹. Depuis, de multiples protéases activatrices, aux diverses origines, ont alors été identifiées parmi lesquelles nous pouvons citer l'acrosine¹⁶², la matriptase-1¹⁶³, la trypsine IV¹⁶⁴, la Granzyme A¹⁶⁵, TMPRSS2¹⁶⁶, ou encore plusieurs protéases appartenant à la famille des kallikréïnes¹⁶⁷ mais également la sérine protéase allergène des moisissures Pen c¹⁶⁸. Il est important de rappeler que l'activation de PAR₂ par toutes ces protéases n'induit pas nécessairement la même signalisation qu'un clivage par la trypsine.

Par ailleurs, d'autres protéases sont capables de cliver PAR₂ induisant un désarmage et donc une inactivation du récepteur comme la plasmine, la protéase 3 et la calpaïne, ainsi que l'élastase des neutrophiles et la cathepsine G¹⁵⁵.

b. Ligands exogènes

Les progrès en matière de compréhension de l'activation de PAR₂ ont aidé au développement de divers agonistes et antagonistes synthétiques. Ces découvertes sont basées sur la synthèse de peptides activateurs mimant la séquence du ligand captif (le TL) spécifique à chaque récepteur ainsi que de divers courts agonistes et antagonistes peptidiques qui reproduisent l'action du TL (peptidomimétique).

Ainsi, des peptides agonistes du récepteur ont été conçus en utilisant une approche similaire imitant la séquence TL du PAR₂ humain (SLIGKV-NH₂) et de la souris (SLIGRL-NH₂)¹⁶⁹. A l'inverse, des approches pour inhiber la signalisation de PAR₂ ont été développées, elles incluent : le blocage du site de liaison du ligand captif avec un petit antagoniste ; l'occlusion du site de clivage du ligand captif avec un anticorps sélectif de PAR₂ qui empêche l'activation de la protéase ; ou l'interférence des interactions entre PAR₂ et ses protéines transductives de signal intracellulaire que sont les protéines G ou les β -arrestines, en utilisant des peptides pénétrants. Ces molécules de synthèses peuvent être classées en différentes catégories qu'elles soient peptidiques, non peptidiques ou encore qu'elles miment une action peptidique¹⁴⁷.

3. Signalisation en aval de PAR₂

L'activation canonique de PAR₂ peut déclencher plusieurs voies de signalisation. En effet, une fois activé, PAR₂ initie une cascade de signalisation intracellulaire impliquant principalement des protéines relais comme les protéines G (G α q/11, G α i et G α 12/13)¹⁷⁰ et la β -arrestine¹⁷¹. L'activation des protéines G conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation, telles que la mobilisation du calcium via les voies des phospholipases C et A₂, générant des seconds messagers comme le diacylglycérol et l'inositol triphosphate, ce qui entraîne la libération de Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la PKC (protéine kinase C)¹⁷². La signalisation dépendante de PAR₂ peut également impliquer l'activation de l'enzyme GTPase RhoA ou encore l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique). Parallèlement, lors de l'endocytose de PAR₂, la voie de la β -arrestine peut activer des kinases telles que ERK1/2, entraînant une cascade de phosphorylations et l'activation *in fine* de gène influençant la prolifération cellulaire, la migration ou encore l'inflammation.

L'activation de ces différentes voies de signalisation font de PAR₂ un acteur clé dans des conditions pathologiques comme l'inflammation, la douleur et les maladies cardiovasculaires¹⁷².

Dans nos travaux, nous avons principalement cherché à mettre en évidence le rôle de PAR₂ sur le contrôle négatif de l'expression de l'hépcidine. Dans ce contexte nous avons peu exploré les mécanismes d'activation et de signalisation. Ainsi, la signalisation complexe en aval de PAR₂ ne sera pas développée dans le détail mais les voies principales sont résumées dans la **figure 11** ci-dessous.

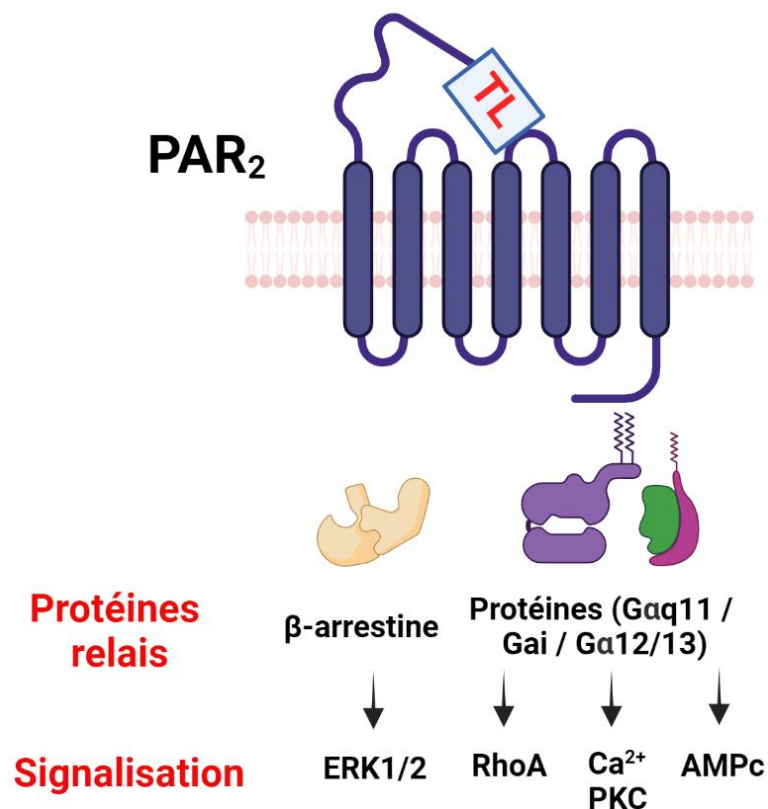


Figure 11 : Signalisations principales en aval de PAR₂

La stimulation de PAR₂ entraîne la stimulation de protéines G ou le recrutement de la β-arrestine. Ces relais protéiques activent différentes voies de signalisations impliquant des effecteurs comme ERK1/2, RhoA, le Ca²⁺ intracellulaire, la PKC ou encore l'AMPc.

III. Le récepteur PAR₂ régule diverses fonctions physiologiques

Il est assez difficile de fournir des éléments de la littérature quant au rôle de PAR₂ dans la régulation du métabolisme du fer car l'implication de ce dernier dans ce contexte précis n'a encore jamais été décrit. Toutefois, il est important de mentionner ce qui est connu dans d'autres tissus, car les mécanismes développés apportent des indices et des pistes à explorer sur les modes d'actions de PAR₂. Cette partie a donc pour but d'introduire ce qui est connu à ce jour sur le rôle de PAR₂ en physiologie mais également lors de divers processus pathologiques. Nous détaillerons dans un premier temps l'implication générale du récepteur dans les systèmes digestif, vasculaire ou encore immunitaire puis nous aborderons le cas précis des macrophages car l'expression de PAR₂ dans ces phagocytes a constitué un axe important de ces travaux de recherche.

1. Introduction au rôle de PAR₂ dans l'organisme

Les premières études sur l'expression de PAR₂ utilisaient des techniques moins avancées que celles disponibles à l'heure actuelle. En 1994, des techniques de northern blot ont été employées pour analyser les transcrits de PAR₂ dans divers organes humains, révélant des niveaux élevés d'ARNm dans des organes tels que le foie, les reins, le pancréas, la prostate, l'intestin grêle et le côlon, tous des sites riches en protéases et impliqués dans le métabolisme ou la digestion¹⁵⁶. Cette localisation est cohérente avec la nature de PAR₂, activé par des enzymes protéolytiques, retrouvées en très grand nombre dans ces organes. Ainsi, PAR₂ joue un rôle crucial dans la digestion en stimulant la sécrétion exocrine dans le pancréas, les cellules intestinales, et les glandes salivaires. Il régule aussi la motilité intestinale et est impliqué dans la transmission de la douleur intestinale ainsi que dans les fonctions immunitaires, particulièrement dans les conditions inflammatoires chroniques de l'intestin¹⁷³⁻¹⁷⁵

Le rôle de PAR₂ a également été largement décrit dans le système circulatoire où ce dernier est exprimé dans les cellules musculaires lisses et endothéliales. Ceci a

notamment été montré par la découverte que l'administration de trypsine provoque une hypotension aiguë dépendante de l'endothélium chez le chien¹⁷⁶, précédant la démonstration que l'activation de PAR₂ induit une vasodilatation de l'aorte chez le rat par la libération de NO et d'endothéline^{173,177}. De plus, il a été mis en évidence que l'activation systémique de PAR₂ induit une hypotension via la voie L-arginine/NO et pourrait protéger contre l'ischémie cardiaque¹⁷⁸. Dans les maladies cardiovasculaires, PAR₂ est impliqué dans l'athérosclérose, où son déficit réduit l'infiltration de monocytes et ralentit la progression des lésions¹⁷⁹. Enfin, PAR₂ est activé par les facteurs de coagulation VIIa et Xa, suggérant un rôle dans l'activation endothéliale lors de blessures et d'inflammation¹⁸⁰.

Par ailleurs, l'expression de PAR₂ dans les globules blancs a montré son rôle dans l'immunité dans laquelle le récepteur est présent sur les éosinophiles, neutrophiles, mastocytes, lymphocytes T, monocytes¹⁸¹ et macrophages¹⁸². Il a alors été montré chez la souris que PAR₂ est crucial pour la chimiotaxie de certaines cellules immunitaires. Par exemple dans la dermatite allergique de type IV, la déplétion de PAR₂ réduit l'infiltration immunitaire et atténue la maladie¹⁸³. De plus, l'agoniste de PAR₂, SLIGRL-NH₂, augmente la migration des leucocytes, un phénomène dépendant de l'activité plaquettaire¹⁸⁴. L'utilisation de souris *F2r11*^{-/-} a permis de mettre en évidence l'implication de PAR₂ dans l'inflammation chronique, comme dans la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose, où son absence réduit la synovite et la dégradation du cartilage¹⁸⁵. Paradoxalement, PAR₂ possède également un potentiel anti-inflammatoire. Son activation dans les macrophages améliore l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et supprime les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-6 et IL-12 en réponse au LPS¹⁸⁶. De plus, il inhibe la production de certaines cytokines pro-inflammatoires, protégeant contre la colite induite par le TNBS.¹⁸⁷

En résumé, PAR₂ joue des rôles fondamentaux dans l'homéostasie du tractus gastro-intestinal ainsi que dans les maladies associées. Il régule aussi la pression sanguine, la coagulation, et la santé vasculaire, et son dysfonctionnement peut contribuer à diverses maladies cardiovasculaires et circulatoires. PAR₂ est également crucial dans le chimiotactisme des cellules immunitaires, contribuant à la réponse inflammatoire et la régulation de l'inflammation aiguë et chronique. Cette dualité pro-

et anti-inflammatoire de PAR₂ en fait un acteur clé dans diverses pathologies, nécessitant une compréhension approfondie pour le ciblage thérapeutique.

2. Rôle physiopathologique de PAR₂ dans les macrophages

a. **L'expression de PAR₂ dans les macrophages régule divers processus immunitaires**

Nous avons vu que le récepteur PAR₂ est présent à la surface de certaines cellules myéloïdes et notamment à la surface des macrophages. Il a été démontré que son activation influence la réponse immunitaire mais les fonctions précises de PAR₂ dans ces macrophages sont encore assez floues. Voici quelques données de la littérature qui décrivent à ce jour divers phénomènes physiopathologiques médiés par PAR₂ dans les macrophages.

Tout d'abord, au regard de son implication en immunité et sa localisation dans les macrophages, il n'est pas surprenant que PAR₂ puisse réguler d'une quelconque manière un processus inflammatoire. Ainsi, plusieurs rôles fonctionnels ont également été rapportés. Dans un modèle cellulaire murin, l'activation de PAR₂ avec le facteur de coagulation FXa entraîne une augmentation de la production de TNF α , d'IL6 et d'IFN γ induite par le LPS dans une lignée de macrophages RAW 264¹⁸⁸. De plus, nous avons vu précédemment que chez l'Homme, la stimulation de PAR₂ avec le peptide agoniste SLIGKV régule à la hausse le récepteur et induit la production de cytokines TNF α et IL10 de manière similaire au LPS¹⁸². Enfin, une autre étude également basée sur une culture de macrophages RAW264 ainsi que des macrophages dérivés de cellules de moelle osseuse (BMDM) de souris *C57Bl/6/J*, a révélé que la stimulation de PAR₂ favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire associé à la production d'IL1 β , d'IL6 et également de TNF α . Les auteurs démontrent dans leurs travaux que ce phénomène est dépendant du facteur de transcription FOXO1 et qu'une administration de trypsine récapitule ce phénotype¹⁸⁹.

Récemment, une équipe a montré chez la souris que la perte de l'expression de PAR₂ dans les macrophages alvéolaires des poumons entraîne une altération de la phagocytose bactérienne et des lésions irréversibles dans l'organe. Les auteurs décrivent que la délétion de PAR₂ dans ces macrophages a altéré la formation du

phagosome, dépendante de l'AMPc et de la protéine du remodelage du cytosquelette Rac1¹⁹⁰. Ces éléments sont importants car bien qu'indépendants du métabolisme du fer, ils établissent un lien entre le mécanisme de phagocytose et le récepteur PAR₂, ce qui constitue une piste intéressante à explorer quand on sait l'importance de ce mécanisme d'épuration, notamment lors du recyclage des globules rouges par les macrophages

b. Rôle de PAR₂ dans les macrophages sur l'érythropoïèse embryonnaire

Le développement de souris KO pour le récepteur PAR₂ de façon spécifique aux macrophages a permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions du récepteur.

Ainsi, en 2020, Mona Saffarzadeh *et al.* ont publié des travaux sur l'importance de PAR₂ dans les macrophages pour l'érythropoïèse embryonnaire¹⁹¹. En utilisant un modèle de délétion spécifique de PAR₂ dans les macrophages : *F2r1^{LysM}*, les auteurs décrivent que l'absence de ce dernier a entraîné un défaut d'érythropoïèse fœtale régulé par le facteur VIIa de la coagulation et une anémie associée à une létalité embryonnaire accrue. De plus, les auteurs rapportent qu'à l'âge adulte, PAR₂ n'est pas impliqué dans la régulation de l'érythropoïèse à l'état d'équilibre. Cependant, dans des conditions de stress érythropoïétiques telles qu'une hémolyse intravasculaire, induite par l'injection de phénylhydrazine, ces derniers mettent en avant l'importance de PAR₂ dans la récupération post-stress. Un fait extrêmement intéressant est que la délétion de PAR₂ dans les macrophages des embryons a entraîné une surexpression de l'hépcidine hépatique, non discuté dans cette étude par les auteurs. Ces données soulèvent donc la question d'une potentielle fonction du récepteur dans la régulation de l'hormone hépatocytaire.

Chapitre 4 : Les macrophages dans la régulation du métabolisme du fer

La première année de ces travaux a été consacrée dans une majeure partie, à la mise en évidence d'un rôle de PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine, notamment dans un contexte d'inhibition de l'hepcidine, en réponse à l'anémie induite dans le modèle murin *F2rl1*^{-/-}.

Par la suite, nous avons poursuivi nos recherches et étudié l'implication des macrophages sur cette inhibition en travaillant sur le modèle de délétion de PAR₂, spécifiquement dans les macrophages, le modèle *F2rl1*^{LysM}. Les résultats obtenus nous ont poussé à étudier plus en détail la fonction de ces phagocytes sur la régulation de l'hepcidine, et cela de manière indépendante du récepteur PAR₂.

Ainsi, ce chapitre de cette introduction propose une vue d'ensemble du rôle des cellules *LysM*⁺ (promoteur utilisé pour la délétion de PAR₂ dans les macrophages) dont les principaux représentants sont les macrophages ainsi que les monocytes. Nous traiterons de la nature de ces cellules en abordant brièvement leur origine et de leur hétérogénéité.

Puis, nous définirons leurs fonctions, en décrivant ce qui est connu à ce jour sur leurs implications dans la régulation du fer dans l'organisme.

Enfin, nous détaillerons les données de la littérature qui établissent un lien entre cellules myéloïdes et hepcidine, et qui soulèvent l'existence éventuelle de signaux provenant des macrophages pour inhiber l'hepcidine des hépatocytes.

I. Les macrophages, cellules myéloïdes de l'immunité innée, résidentes des tissus

L'immunité innée, également connue sous le nom d'immunité naturelle, est un système de défense de l'organisme qui constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes et les substances étrangères. L'immunité innée est constituée de plusieurs lignes de défenses. Une ligne de défense externe et physique formée par la peau et les muqueuses ainsi qu'une barrière chimique par la sécrétion de mucus, salives, larme etc. Si un agent infectieux arrive toutefois à franchir cette barrière, il est alors confronté aux défenses internes de l'organisme. Parmi ces défenses internes se trouvent des cellules spécialisées telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Ces cellules ont la capacité de déclencher une réaction rapide dans les minutes ou les heures suivant l'agression. Elles constituent la lignée myéloïde et appartiennent à un ensemble de cellules dites « phagocytaires ». Ce sont des cellules spécialisées qui ont la capacité d'ingérer et de détruire des particules étrangères, telles que des bactéries, des virus, des cellules mortes, des débris cellulaires et d'autres substances nocives¹⁹².

Ce chapitre introductif est principalement dédié aux macrophages. Nous définissons dans un premier temps ces derniers ainsi que les autres types de cellules myéloïdes, étudiées dans nos expérimentations. Puis, nous abordons les fonctions des différents types de macrophages dans le maintien de l'homéostasie martiale. Enfin nous décrivons ce qui est connu à ce jour sur le rôle des cellules myéloïdes dans la régulation de l'hepcidine.

1. Fonctions, hétérogénéité et développement des macrophages tissulaires

Les macrophages sont des cellules retrouvées dans la quasi-totalité des tissus chez les mammifères. Leur principale fonction est de phagocyter les agents pathogènes, les cellules mortes et les débris cellulaires. Ils jouent également un rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire en présentant les antigènes aux lymphocytes T et B, ce qui déclenche une réponse adaptative. De plus, ces

phagocytes produisent des cytokines et des facteurs de croissance qui régulent l'inflammation et la cicatrisation des tissus.

Les macrophages peuvent être classés en deux catégories selon leurs origines. On peut d'abord distinguer d'une part les macrophages tissulaires d'origine embryonnaire qui se sont développés en même temps que les tissus dans lesquels ils nichent : les macrophages résidents ou « resMacs ». Ces derniers sont présents dans la plupart des tissus de l'organisme dans des conditions physiologiques¹⁹³. Leur objectif principal est de maintenir ou de rétablir l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules apoptotiques et les éventuels agents pathogènes. Leur diversité en termes de phénotypes et leurs spécialisations fonctionnelles varient selon le microenvironnement spécifique¹⁹⁴. Cette hétérogénéité résulte de l'intégration de différents signaux de l'environnement, qui favorisent une identité tissulaire et une différenciation locale¹⁹⁵. Cette identité, imprimée par l'environnement local, induit un phénotype fonctionnel aux resMacs qui permet à ces cellules d'être les plus adaptées possible aux exigences spécifiques du tissu dans lequel elles résident. Il faut souligner que la différenciation en resMacs est stable et irréversible¹⁹⁶. Les différences entre les divers macrophages tissulaires, tant sur le plan phénotypique que sur celui de leurs localisations dans l'organisme, expliquent les différents noms qui leur ont été attribués.

Les macrophages résidents d'origine embryonnaire proviennent de trois vagues hématopoïétiques : la première à E7,5 génère la microglie à partir des PEM (précurseur érythro-myéloïde) ; la deuxième à E8,5 voit les PEM migrer vers le foie fœtal pour se différencier en monocytes, donnant naissance aux macrophages périphériques ; la troisième à E10,5 produit des CSH dans la région AGM (Aorte, gonade, et mésonéphros), transportées vers le foie fœtal et la moelle osseuse, assurant l'hématopoïèse adulte^{197,198}. Ces macrophages se maintiennent principalement par auto-renouvellement^{199,200}. Il est également important de préciser que la majorité des resMacs assure leur renouvellement par prolifération *in situ*, sous l'impulsion de divers facteurs comme observé pour la microglie dans le cerveau, les cellules de Langerhans de la peau, les KC dans le foie, les macrophages alvéolaires des poumons ou encore les RPM de la rate²⁰¹.

D'autre part, dans certains tissus, la contribution des monocytes de la MO est toutefois nécessaire chez l'adulte pour le développement de certaines populations de macrophages. En effet, il existe également des populations de macrophages continuellement renouvelées par les monocytes sanguins, indépendamment d'une réponse immunitaire, c'est par exemple le cas des macrophages capsulaires du foie identifiés comme : F4/80⁺ CX3CR1⁺⁺ Tim4⁻ CD64⁺ Ly6C^{-/+}, qui assurent des fonctions de surveillance de la cavité péritonéale contre divers pathogènes²⁰². De plus, dans certaines conditions physiopathologiques, ce phénomène qui implique la différenciation des monocytes en macrophages est crucial. En effet, en cas de déplétion et mort cellulaire, ou encore pour enrichir un réservoir de macrophages face à un pathogène extérieur (processus inflammatoire), des monocytes de la MO peuvent infiltrer les tissus et se différencier en macrophages. On parle alors de macrophages dérivés des monocytes ou « ModMac » (« monocytes-derived macrophages »). Ces monocytes acquièrent dans le tissu un profil transcriptionnel très proche des macrophages résidents. Nous décrivons plus en détail ce phénomène dans la partie suivante en prenant l'exemple des macrophages résidents hépatiques, les cellules de Kupffer, dont la déplétion conduit au recrutement de monocytes qui se différencient en « KC dérivés des monocytes »^{203,204}. Précisons qu'une analyse comparative du transcriptome de ces deux types de macrophages (KC d'origine embryonnaire vs monocyttaire) a révélé que plus de 90% des gènes sont exprimés de manière similaire dans le foie²⁰⁵. Ces éléments suggèrent qu'au-delà de l'origine de ces cellules, l'environnement tissulaire semble être en majeure partie responsable de la programmation transcriptionnelle des macrophages.

Pour résumer, les macrophages résidents, implantés de manière permanente dans certains tissus, ont donc un rôle particulièrement crucial dans le maintien de l'homéostasie locale. Ils peuvent également contribuer à la physiopathologie de diverses maladies inflammatoires chroniques, telles que les maladies métaboliques ou le cancers²⁰⁶. Enfin, chez l'adulte, dans certains contextes physiopathologiques, des macrophages peuvent être dérivés de monocytes infiltrants et acquérir un profil transcriptionnel ainsi qu'un phénotype très proche du macrophage résident, présent dans le tissu.

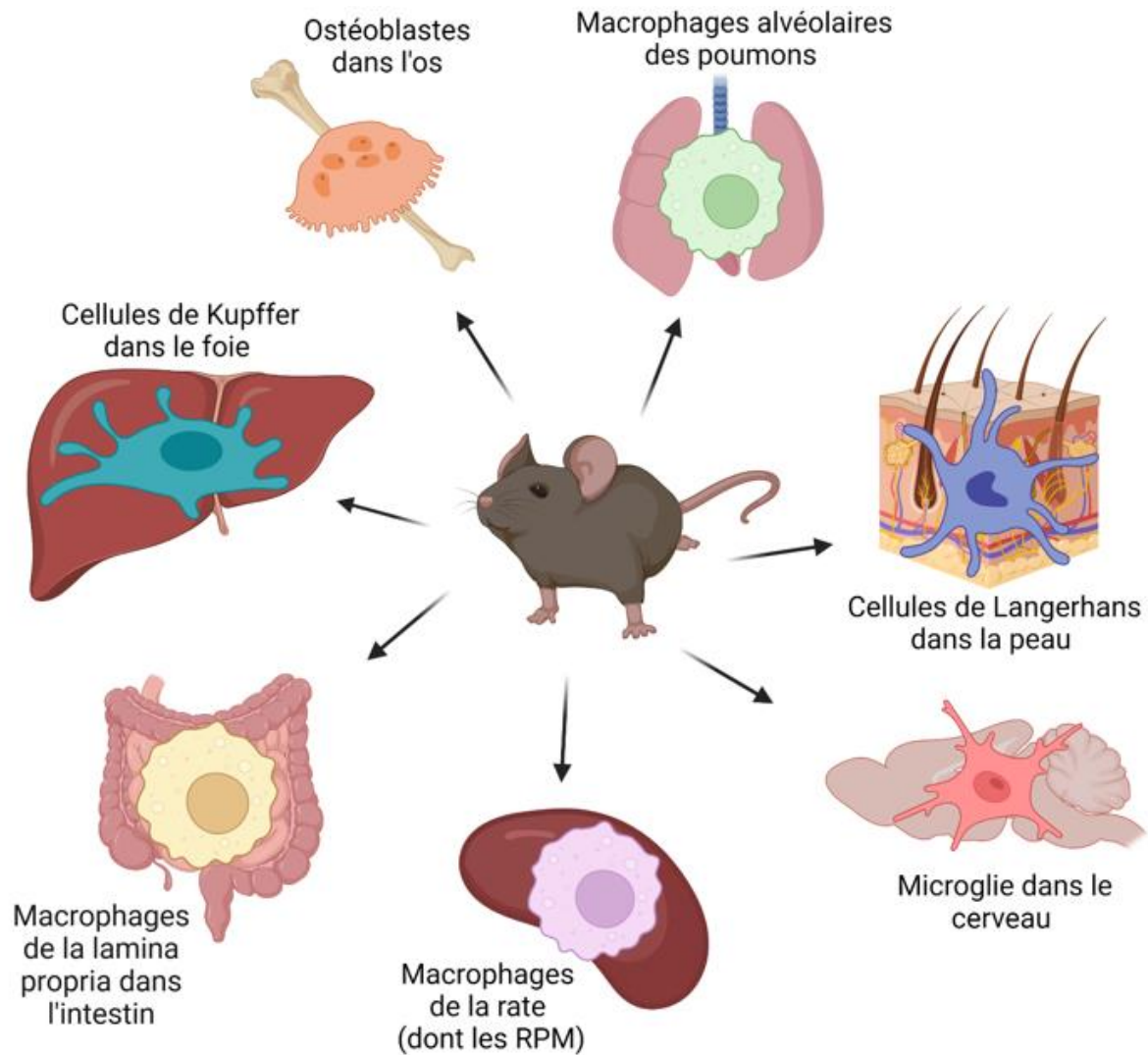


Figure 12 : Représentation des différents types de macrophages résidents et spécifiques de différents tissus

Les différents types de macrophages résidents dans les organes permettent le maintien de l'homéostasie des tissus. Ces macrophages ont en commun un programme transcriptionnel de base, leur permettant d'assurer des fonctions de surveillance et de défense immunitaire. Par ailleurs ces derniers acquièrent également une signature spécifique, imprimée par l'environnement local dans lequel ils évoluent. Cette niche assure le maintien de leur identité et détermine leurs fonctions pour adapter au mieux ces macrophages à leur environnement. Les KC sont un bon exemple de macrophages résidents, ils sont en première ligne dans le foie pour activer l'immunité innée en cas d'agression hépatique mais assurent également des fonctions spécialisées dans le métabolisme du fer ou énergétique.

2. Description des autres cellules de la lignée myéloïde

a. Les monocytes

Nous venons d'apporter quelques éléments concernant les populations de macrophages. Nous avons vu que ces derniers peuvent provenir de monocytes ayant subi un processus de différenciation. Toutefois, il serait erroné de définir ces monocytes uniquement en tant que précurseurs des macrophages. Ces derniers représentent une famille de cellules hétérogènes aux fonctions spécialisées, caractérisées plus en détail dans cette sous partie.

Comme les macrophages, les monocytes sont des cellules myéloïdes qui ont la capacité de phagocytose. Ces globules blancs, qui circulent dans le sang sous forme de cellules mononucléées, sont caractérisés par leur noyau généralement en forme de rein et leur capacité à se différencier en macrophages mais aussi en cellules dendritiques, lorsqu'ils pénètrent dans les tissus. Dans la circulation sanguine, les monocytes peuvent détecter et phagocyter les agents pathogènes, les cellules mortes et les débris cellulaires. Une fois activés, ils peuvent migrer vers les tissus affectés par l'infection ou l'inflammation, où ils se différencient en macrophages et contribuent à la réponse immunitaire en phagocytant les agents pathogènes et en libérant des cytokines pro-inflammatoires. Les monocytes jouent donc un rôle crucial dans la défense de l'organisme contre les infections et dans la régulation de l'inflammation ainsi que dans l'homéostasie des tissus où ils permettent de reconstituer les populations de macrophages²⁰⁷.

Chez la souris, ces cellules représentent environ 5% des leucocytes dit « périphériques » et sont produits dans la MO au cours de l'hématopoïèse²⁰⁸. Les monocytes sont décrits comme étant des cellules rapidement mobilisées lors de mécanismes inflammatoires dans lesquels la chimio-attraction leur permet de se rendre sur des sites lésés pour produire diverses cytokines. Le développement de technologies d'étude du phénotypes précis des cellules a permis de mettre en évidence leurs hétérogénéités au sein même d'une population cellulaire. En effet, des techniques telle que la cytométrie en flux ont notamment permis de montrer, chez la souris, qu'il existe plusieurs populations de monocytes²⁰⁹. Il a ainsi été mis en évidence

une opposition entre deux groupes de monocytes, tous deux identifiés par l'expression du récepteur CD115, également connu sous le nom de CSF1-R (« coloning stimulating factor receptor»), le récepteur d'un facteur de différenciation nécessaire à la survie, à la prolifération et à la différenciation de nombreux types de cellules myéloïdes. Ainsi, chez la souris, les monocytes CD115⁺ peuvent être subdivisés en deux groupes distincts, par l'expression d'une série de plusieurs antigènes que sont Ly6C et CCR2. Ainsi, a été définie une population de monocytes dits « classiques » Ly6C⁺ ; CCR2⁺ ; CD62L⁺ et une population dite non classique Ly6C^{low} ; CCR2^{low} ; CD62L⁻. Il est intéressant de préciser que des analyses transcriptionnelles ont montré la même opposition chez l'Homme via l'utilisation des marqueurs de surface CD14 et CD16²¹⁰. Cependant, il existe tout de même des limites à cette comparaison comme l'ont montré Cros *et al.* qui décrivent des différences d'expression de gènes impliqués dans l'activité phagocytaire des monocytes chez l'Homme, par rapport à la souris²¹¹. De plus, chez la souris, les deux sous populations de monocytes sont réparties en nombre égal, ce qui n'est pas le cas chez l'Homme où l'on retrouve 80% de monocytes classiques²¹². Cette différence nous rappelle que l'étude de certains mécanismes, sur modèle murin, n'est pas forcément transposable à l'Homme. En plus de ces deux populations assez bien définies, il existe une troisième population dite « intermédiaire ». L'utilisation du marqueur CX3CR1 a permis l'identification de cette population. Toutefois, contrairement aux monocytes classiques et non classiques, les monocytes intermédiaires ne représentent pas une population homogène.

Bien qu'ils soient subdivisés en différentes catégories par leurs emplacements, phénotypes morphologiques et leurs signatures transcriptionnelles, les monocytes ont tous une origine commune. Ces derniers proviennent d'abord de précurseurs présents dans le foie fœtal au cours de l'hématopoïèse embryonnaire puis de la MO osseuse chez l'adulte. Le développement des monocytes depuis ces organes lymphoïdes primaires dépend entièrement d'un facteur de différenciation appelé CSF1 ou M-CSF (« coloning stimulating factor »)²¹³. La mise en évidence du rôle majeur de ce ligand a été décrite dans des travaux sur des souris déficientes en CSF1R qui présentent une forte diminution des monocytes appelée monocytopénie²¹⁴.

Il est intéressant de noter que la rate peut produire et constituer un réservoir important de monocytes²¹⁵. En effet, cet organe lymphoïde secondaire est capable, en

réponse à un stimulus inflammatoire, de générer un ensemble conséquent de monocytes, cela a notamment été montré dans un contexte d'athérosclérose, on parle alors d'hématopoïèse extra-médullaire.

Par ailleurs, des expériences de cartographie de destinée cellulaire (ou « fate-mapping ») ont démontré que les monocytes non classiques ont une durée de vie plus longue que les monocytes classiques, soit environ 2 à 7 jours²¹⁶. Ces cellules, caractérisées par leur profil Ly6C^{low} ; CCR2⁻, remplissent un rôle de surveillance dans les vaisseaux sanguins, les artérioles et les veines, contribuant au maintien de l'intégrité endothéliale. En cas d'inflammation, leurs fonctions spécifiques restent encore à établir clairement, mais elles semblent participer à la réponse au stress dans les vaisseaux sanguins et au recrutement de neutrophiles, qui induisent la nécrose des cellules endothéliales endommagées²¹⁷. Par la suite, ces monocytes assurent l'élimination des débris cellulaires lors de l'efférocytose.

Les monocytes classiques, quant à eux, sont plus transitoires et peuvent migrer vers les tissus grâce notamment à certains récepteurs comme CCR2. Ils jouent un rôle crucial dans l'homéostasie tissulaire. Il a été montré qu'une vague de monocytes sortant de la moelle osseuse vers les vaisseaux sanguins se produisait de manière quotidienne. Ce mécanisme est sous le contrôle du gène circadien *Bma1* (basic helix-loop-helix ARNT like 1). Le monocyte Ly6C⁺ ; CCR2⁺ présente une faible durée de vie dans les vaisseaux puisqu'il infiltre rapidement les tissus pour reconstruire le réservoir de macrophages qui y résident (comme par exemple dans l'intestin, le cœur ou encore la peau)²¹⁸. Rappelons qu'en condition d'homéostasie, certains macrophages résidents des tissus, comme les KC dans le foie, se maintiennent par auto-renouvellement. Cependant, ces derniers peuvent tout de même en cas d'agression hépatique et/ou diminution de leur quantité, être repeuplés par des monocytes classiques²⁰⁵. Dans un contexte de sénescence pathologique des érythrocytes, ces monocytes infiltrants, peuvent par exemple participer, dans le système circulant, à l'érythrophagocytose des GR endommagés, puis acquérir *in situ*, un phénotype proche de celui des KC et ainsi gérer l'efflux de fer provenant des GR ingérés⁴¹. Ce phénomène est développé plus en détails dans la **partie II** de ce chapitre.

b. Les neutrophiles

Comme expliqué en introduction, la grande famille des phagocytes est également constituée de neutrophiles. Ces derniers, aussi appelés polynucléaires neutrophiles ou granulocytes neutrophiles, représentent les globules blancs les plus abondants dans le sang circulant. En effet, ceux-ci constituent environ 50 à 70% de tous les globules blancs. Ils ont une apparence caractéristique avec un noyau lobé et de nombreuses granulations dans leur cytoplasme. Ils sont particulièrement efficaces dans la lutte contre les infections bactériennes extracellulaires. En réponse à un signal d'infection ou d'inflammation, les neutrophiles quittent la circulation sanguine et migrent vers les sites infectés ou inflammatoires, où ils exercent leur action phagocytaire. Ils sont également capables de libérer des enzymes, des protéines antimicrobiennes et des radicaux oxygénés pour détruire les agents pathogènes. Cependant, leur activité peut également contribuer à des dommages tissulaires excessifs lors d'une inflammation intense. D'une durée de vie relativement courte, généralement de quelques heures à quelques jours, ils sont ensuite éliminés par les macrophages.

Les neutrophiles murins expriment plusieurs marqueurs caractéristiques, notamment Ly6G, un antigène de surface couramment utilisé pour leur identification. Ils expriment également le CD11b, une intégrine impliquée dans l'adhésion cellulaire et la migration, et le CD62L, une molécule d'adhésion qui facilite le roulage des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire²¹⁹. Les neutrophiles expriment également CXCR2, un récepteur de chimiokines impliqué dans leur recrutement vers les sites d'inflammation²²⁰.

Dans nos travaux, nous avons étudié et quantifié ces neutrophiles puis utilisé les résultats obtenus pour tenter de caractériser les niveaux d'inflammations dans le foie des souris de nos différentes cohortes.

c. Les cellules dendritiques

Quant aux cellules dendritiques, ce sont des cellules immunitaires jouant un rôle central dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire adaptative en capturant les antigènes et en les présentant aux lymphocytes T et B. Ces cellules

existent sous différentes formes, notamment les cellules dendritiques immatures, chargées de la capture des antigènes, et les cellules dendritiques matures, prêtes à activer les lymphocytes. En plus de leur rôle dans la réponse immunitaire, elles participent également à la tolérance immunitaire en éduquant le système immunitaire à reconnaître les antigènes du soi. En résumé, les cellules dendritiques sont des acteurs essentiels de l'immunité, intervenant à la fois dans la protection contre les agents pathogènes et dans la tolérance aux antigènes du corps.

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes principalement intéressés à l'implication des macrophages dans la régulation de l'hepcidine. C'est pourquoi la suite du propos va se focaliser sur ces cellules ainsi que sur les populations de monocytes dont elles dérivent.

II. Fonctions des macrophages dans la régulation de l'homéostasie martiale

Au-delà de leur rôle immunitaire, les macrophages sont des cellules polyfonctionnelles qui assurent certaines fonctions biologiques spécialisées pour maintenir l'homéostasie d'un tissu, comme par exemple les KC, qui participent dans le foie à la régulation du métabolisme du fer.

La fonction des macrophages dans la régulation du métabolisme du fer a été au centre des problématiques de cette thèse de recherche. Ce métabolisme est régulé par plusieurs organes, parmi lesquels peuvent être cités la moelle osseuse, la rate et surtout, le foie, qui joue un rôle central en tant qu'organe régulateur majeur. Dans ces organes, divers types de macrophages sont impliqués dans la gestion du fer, principalement à travers le recyclage du fer provenant des érythrocytes sénescents. Ce processus est assuré par les macrophages de la rate et du foie. Nous verrons également que les macrophages de la moelle osseuse ont aussi un rôle à jouer, en tant que « nourriciers » lors du développement des précurseurs de globules rouges.

Ainsi, cette sous-partie a pour but d'approfondir plus en détail les diverses fonctions des macrophages depuis les différents organes impliqués dans le maintien

efficace de l'équilibre du fer dans l'organisme. Nous décrivons les fonctions spécifiques de ces macrophages hautement spécialisés ainsi que l'environnement tissulaire dans lequel ces derniers évoluent, qui conditionne leurs phénotypes.

1. Les cellules de Kupffer : macrophages résidents du foie aux fonctions spécialisées dans la régulation du métabolisme du fer

Les KC sont des acteurs majeurs du métabolisme du fer et expriment des gènes impliqués dans l'absorption, le traitement et l'export du fer. Ils peuvent également participer au recyclage des globules rouges sénescents, à la détoxification de l'hème libre et à l'export de fer dans la circulation, utilisé notamment pour la synthèse *de novo* de l'hémoglobine. De plus, quelques données de la littérature suggèrent que ces cellules pourraient même être plus directement impliquées dans la régulation de l'hepcidine. Cette fonction de régulation de l'hepcidine a représenté un axe important de ces travaux de thèse. De ce fait il est nécessaire de développer plus en détail ce qui est connu à ce jour sur le rôle des KC dans le maintien de l'homéostasie martiale.

Cependant, avant d'aborder les mécanismes de régulation du fer par ces macrophages, il est d'abord important de décrire l'environnement hépatique dans lequel ceux-ci évoluent.

a. Anatomie, fonctions et types cellulaires du foie

Fonction principale

Situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, le foie joue un rôle vital dans le métabolisme et la détoxification. Il régule la glycémie, stocke des vitamines et synthétise des protéines cruciales telles que l'albumine et les facteurs de coagulation, essentiels pour l'hémostase. En outre, le foie filtre les toxines et les déchets du sang, contribuant ainsi au maintien de l'équilibre interne du corps. Grâce à sa vascularisation unique par l'axe intestin/veine porte, il exerce également une fonction de surveillance immunitaire en détectant les agents pathogènes ayant franchi la barrière épithéliale intestinale²²¹. Chez la souris, de taille relativement importante, il est divisé en quatre

lobes : gauche, droit, caudé et carré. Il reçoit son apport sanguin à 30 % par l'artère hépatique, qui apporte le sang oxygéné, et à 70 % par la veine porte, qui transporte le sang désoxygéné riche en nutriments, mais parfois en endotoxines, depuis l'intestin.

Le lobule hépatique : unité fonctionnelle du foie

L'architecture du foie comprend des hépatocytes, des vaisseaux sanguins et des canaux biliaires, le tout enveloppé par une capsule conjonctive appelée capsule de Glisson. Cette capsule divise le foie en lobules, l'unité fonctionnelle du foie. Chaque lobule est centré autour d'une veine centrale, entourée de sinusoides hépatiques qui permettent aux hépatocytes d'absorber les nutriments et les toxines. Les lobules sont structurés avec une veine centro-lobulaire au centre et des triades portales en périphérie. La triade portale comprend une branche de la veine porte, une artère hépatique et un canal biliaire, le tout entouré de tissu conjonctif. Cette structure permet aux hépatocytes de recevoir les nutriments et l'oxygène nécessaires à leurs fonctions métaboliques, et de sécréter la bile, collectée dans les canalicules biliaires et transportée vers le duodénum via le conduit biliaire commun.

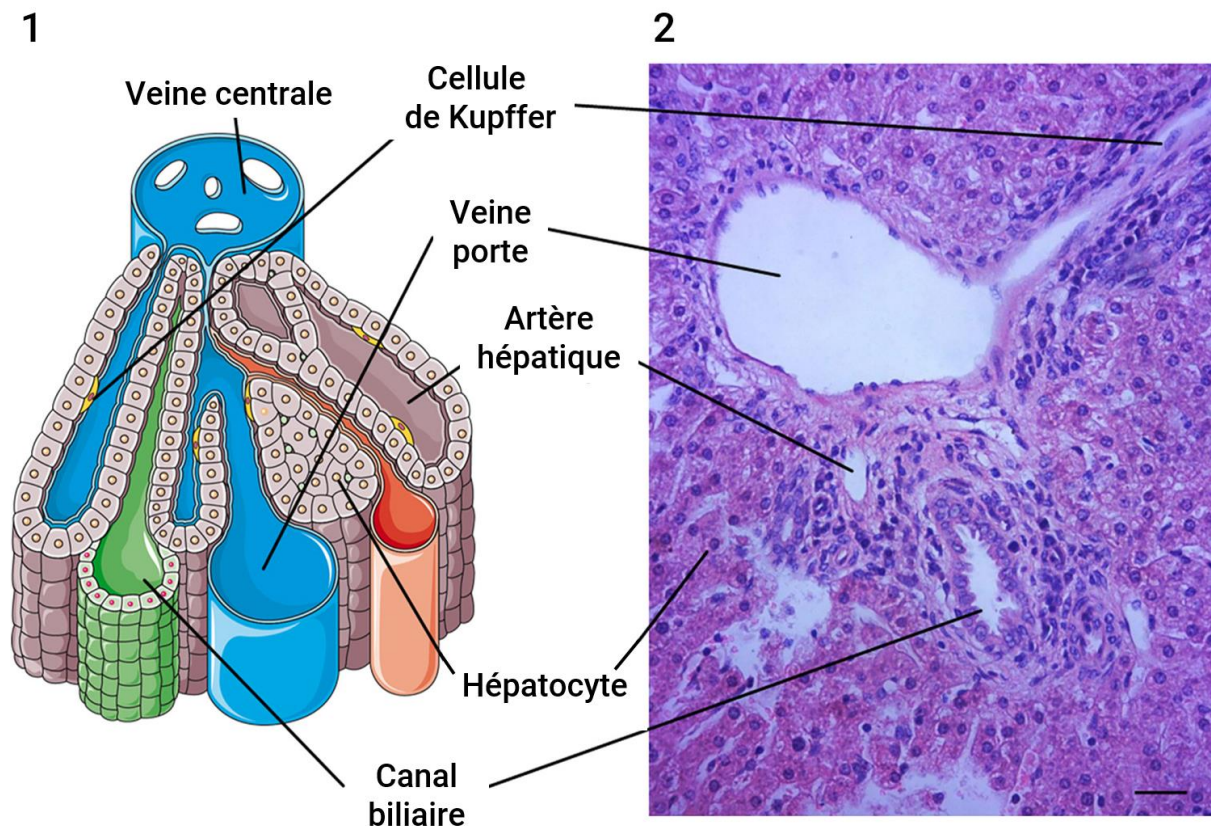


Figure 13 : Architecture d'un lobule hépatique

(1) Représentation schématique d'un lobule hépatique. (2) Coupe histologique d'une triade portale colorée par l'hématoxyline et l'éosine. Une triade portale comprend une branche de la veine porte apportant du sang riche en nutriments depuis le tractus gastro-intestinal, une branche de l'artère hépatique fournissant du sang oxygéné, et un canal biliaire qui draine la bile produite par les hépatocytes vers la vésicule biliaire et le duodénum. Figure adaptée de Ling Yang *et al.* 2023²²²

Types cellulaires du foie

Le foie est composé de différents types cellulaires. La cellule majoritaire est l'hépatocyte, qui représente environ 70 % des cellules. Les autres types cellulaires sont regroupés dans un ensemble de cellules dites « non-parenchymateuses », comprenant des cellules endothéliales, les KC, des cellules stellaires ainsi que des cholangiocytes. Cette partie résume très succinctement le rôle de ces différents types cellulaires pour se focaliser ensuite sur les cellules ayant suscité le plus notre attention : les macrophages.

Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules parenchymateuses principales du foie, représentant environ 80 % de sa masse. Leur rôle est central dans le maintien de l'homéostasie hépatique et dans l'exécution de nombreuses fonctions vitales. Ces larges cellules épithéliales polarisées sont caractérisées par la présence d'un ou deux noyaux. Leurs pôles basolatéraux sont en contact avec la matrice extracellulaire de l'espace de Disse, situé entre les hépatocytes et les cellules endothéliales. Leur disposition anatomique en plaques radiales autour des sinusoides hépatiques facilite l'échange de substances avec le sang. Au-delà de leurs rôles dans le métabolisme énergétique et la détoxification de molécules complexes, ces cellules régulent le métabolisme du fer en sécrétant l'hepcidine et en stockant le fer lorsque la quantité sérique de l'élément est trop importante par rapport aux besoins de l'organisme.

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ou LSEC forment un tissu qui tapisse les parois des vaisseaux sanguins hépatiques, y compris les sinusoides hépatiques. Elles jouent un

rôle crucial dans la fonction vasculaire du foie. Les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques présentent des caractéristiques particulières qui facilitent les échanges. En effet, elles sont caractérisées par des fenestrations, de petites ouvertures à travers leur membrane cellulaire, qui permettent un échange facile de substances entre le sang et les cellules hépatiques²²³. Les cellules endothéliales hépatiques interagissent étroitement avec les hépatocytes et les cellules de Kupffer pour maintenir un environnement hépatique favorable. Par exemple, elles sécrètent les protéines BMP2 et BMP6 pour moduler la production d'hepcidine via la voie canonique des BMP⁷³. Une étude récente a renforcé l'idée que les LSEC sont en constant dialogue avec les cellules environnantes. En effet, les travaux de l'équipe du Dr Muckenthaler suggèrent que la sécrétion de BMP6 par les LSEC, en réponse au fer, est dépendante de signaux sécrétoires provenant des hépatocytes⁷⁶. Enfin, les cellules endothéliales du foie sont également impliquées dans la réponse immunitaire du foie. Elles peuvent exprimer des molécules d'adhésion cellulaire et produire des cytokines qui recrutent les cellules immunitaires en cas d'infection ou de dommages hépatiques²²⁴.

Les cellules stellaires

Initialement décrites par le Dr Von Kupffer en 1876, les cellules stellaires, également appelées cellules Ito, sont des cellules étoilées localisées dans l'espace de Disse. Leur fonction principale est le stockage de la vitamine A sous forme de gouttelettes lipidiques, qu'elles libèrent en cas de besoin²²⁵. De plus, les cellules stellaires hépatiques participent à la régulation du flux sanguin, à la réponse inflammatoire et à la cicatrisation en produisant des cytokines et des facteurs de croissance²²⁶. À ce jour, il n'a pas été décrit de rôle direct des cellules stellaires dans la régulation du métabolisme du fer. En revanche, elles jouent un rôle majeur dans le développement de la fibrose hépatique, une conséquence possible d'une surcharge en fer prolongée dans l'organisme²²⁷. Outre leurs rôles immunitaire et fibrogène, les cellules stellaires interagissent avec les cellules de Kupffer. En effet, leurs contacts étroits avec les LSEC et les cellules de Kupffer forment une niche permettant l'étroite collaboration de ces différents types cellulaires. Ainsi, des travaux ont par exemple démontré que dans certaines conditions d'abolition des cellules de Kupffer, les cellules stellaires (ainsi que les LSEC) orchestrent le recrutement et l'adhésion des monocytes,

puis induisent la différenciation de ces derniers en moKC (« Kupffer dérivés des monocytes ») sous l'action de facteurs de transcription comme LXR α . Les cellules stellaires ont donc la capacité d'imprimer une identité aux cellules de Kupffer pour maintenir l'homéostasie du tissu hépatique²⁰⁴.

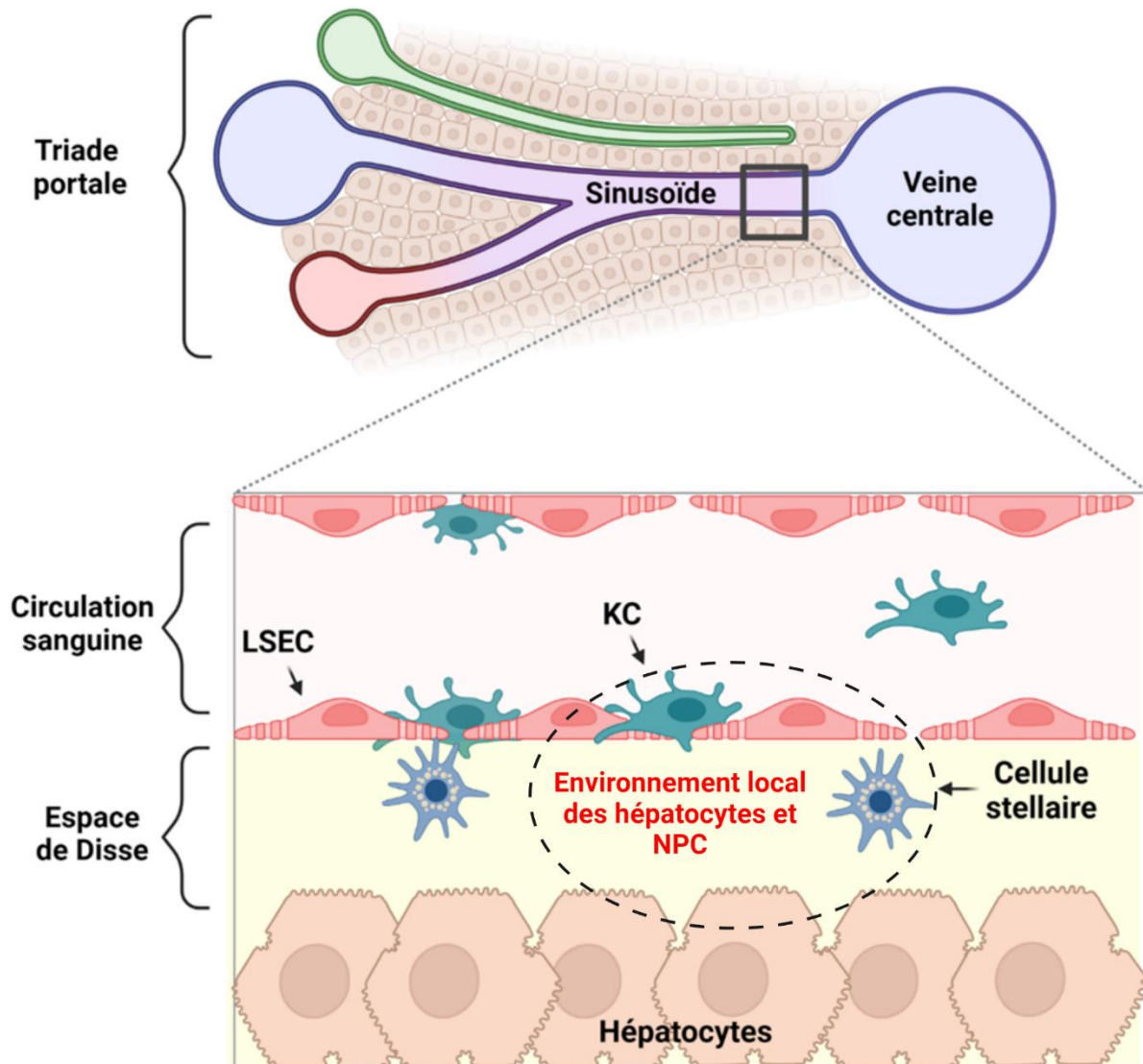


Figure 14 : Schématisation des différentes cellules présentes dans le microenvironnement des sinusoides hépatiques

Les sinusoides hépatiques sont bordées par les LSEC qui constituent l'interface entre ces dernières et la circulation sanguine. Ces cellules sont en dialogue constant avec les autres cellules du microenvironnement notamment avec les hépatocytes pour réguler le métabolisme du fer. Les KC sont présents dans les vaisseaux sanguins, enchevêtrés entre les LSEC, et développent des prolongements cellulaires dans l'espace de Disse. Dans cet espace se trouvent des cellules stellaires, au plus proche des hépatocytes. Bien qu'en faible nombre, elles communiquent également avec les autres NPC, notamment avec les KC dont elles participent à maintenir leur identité. Enfin, les hépatocytes sont les cellules constituant 70% des cellules du foie, ils forment une barrière polarisée et exercent leurs fonctions métaboliques à partir des éléments passant par les fenestrations des LSEC.

b. Cellules de Kupffer : développement, identification et phénotype

D'abord confondus avec des cellules endothéliales, les KC doivent leurs noms à Karl Wilhelm von Kupffer qui les décrit pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle. Ce ne sera que quelques années plus tard que des scientifiques les définiront plus précisément comme des macrophages puis comme des cellules du système phagocytaire mononucléées²²⁸.

Dans un foie sain, les cellules de Kupffer représentent environ 25% des cellules non parenchymateuses et on estime qu'il y a environ une KC pour 10 à 20 hépatocytes²²⁹. Leur position dans les sinusoides, enchevêtrées avec les cellules endothéliales, est idéale pour interagir avec les éléments du sang. De plus, leurs prolongements dans l'espace de Disse favorise également les échanges avec les autres cellules de leur environnement, dont les hépatocytes²⁰⁴.

Comme vu en amont dans la partie introductive, les KC sont des macrophages tissulaires. Ils apparaissent pour la première fois au cours de l'embryogénèse et sont maintenus ensuite chez l'adulte par auto-renouvellement. C'est le cas chez la souris ou les progéniteurs embryonnaires « PEM » issus du sac vitellin¹⁹⁷ et/ou les CSH²³⁰ évoluent en monocytes du foie fœtal²³¹. Par la suite, ces monocytes se différencient en cellules de Kupffer sous l'effet du facteur de croissance CSF1, qui leur permet également de se maintenir de manière autonome, indépendamment des monocytes circulants¹⁹⁸. Il existe également une description plus récente de ce processus de différenciation dans laquelle un « pré macrophage » est généré à partir du PME et colonise ensuite des tissus par chimiotactisme grâce notamment à l'expression du récepteur CX3CR1²³². Divers facteurs ont été décrits pour différencier ces précurseurs

et ainsi induire une destinée de KC à ces cellules. Parmi ces facteurs peuvent être cités ID3 (transcription factor inhibitor of DNA binding 3), ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2) qui régule l'expression du facteur de transcription LXRα (codé par le gène *Nr1h3*) le facteur Spi-C ou encore le ligand de Notch DDL4 produit par les LSEC^{204,232,233}. Une fois établies chez l'adulte, ces KC d'origine embryonnaire ou emKC, se maintiennent par prolifération locale en conditions d'homéostasie, indépendamment des monocytes circulants²⁰⁰.

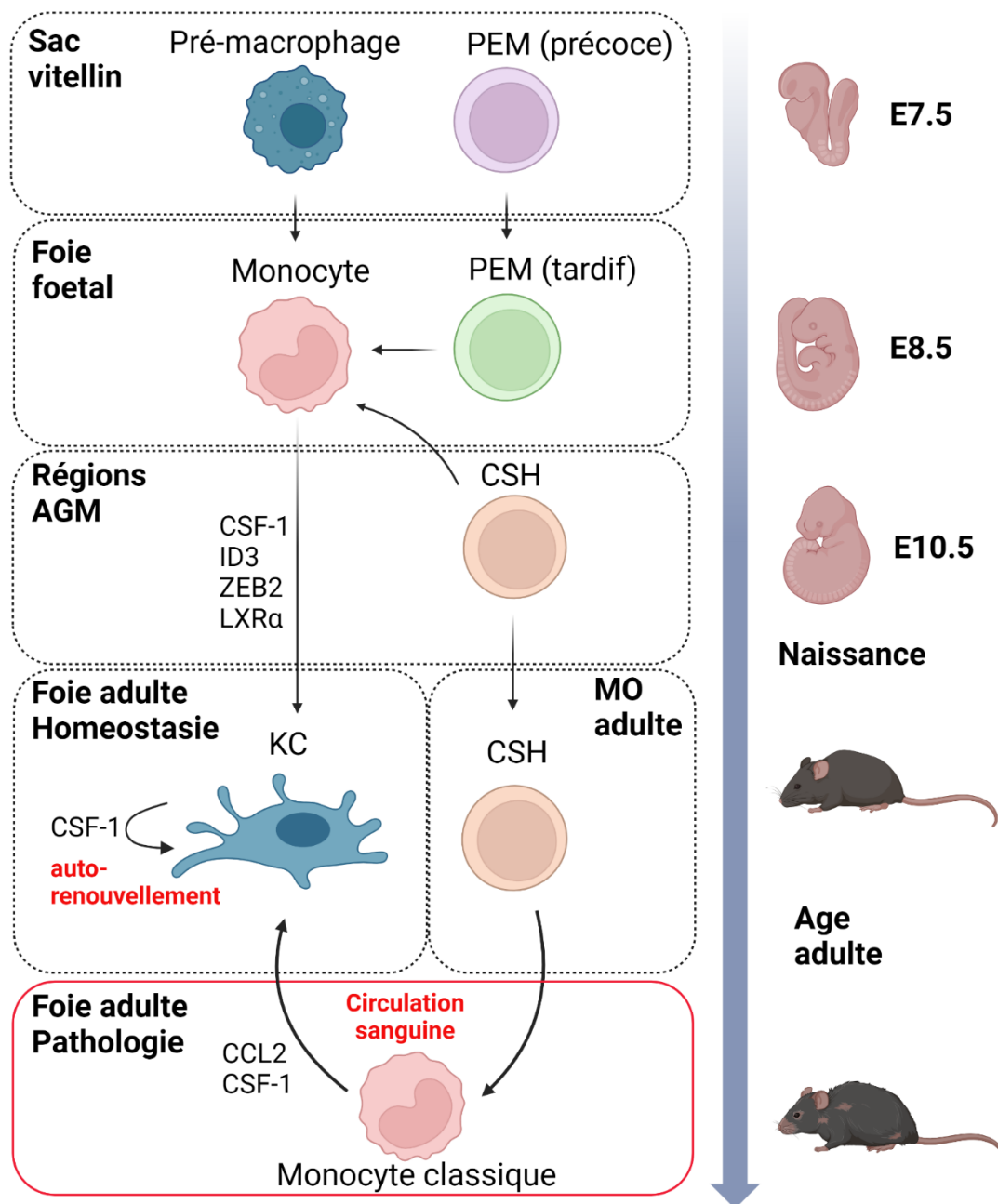


Figure 15 : Développement des cellules de Kupffer

Les KC ont une origine embryonnaire et se développent à partir d'un PEM et/ou d'un pré-macrophage issus du sac vitellin mais également à partir d'une CSH provenant des régions AGM. Ces derniers vont se différencier en monocytes dans le foie fœtal puis en KC sous l'impulsion de divers facteurs. Les KC vont ensuite se maintenir par auto-renouvellement. Dans certaines conditions, des monocytes provenant de la MO peuvent infiltrer le foie et se différencier en KC pour reconstituer/enrichir le réservoir de KC.

Les technologies d'analyse de transcriptome sur cellule unique ou « single cell RNA seq, associées à des études phénotypiques protéiques par cytométrie en flux ont permis le développement d'identification plus précise des cellules de Kupffer. Ainsi des gènes spécifiquement exprimés par les KC ont été identifiés comme par exemple le gène *Clec4f* ou encore *Timd4*, dont l'analyse des niveaux de transcrits et de protéines est aujourd'hui couramment utilisée pour cibler ces cellules^{205,234}. TIMD4 est un récepteur aux phosphatidylsérines exposées à la surface des cellules apoptotiques et des globules rouges endommagés. Quant à l'antigène CLEC4F, il convient de préciser que bien qu'il soit un marqueur intéressant, l'utilisation de ce dernier pour identifier les KC peut présenter des limites. En effet, il est exprimé relativement tard dans le développement des KC, ce qui rend difficile l'identification des cellules qui se développent en KC^{204,205,235}. Ce n'est pas le cas pour les emKC. Cependant cela peut constituer un biais pour leur étude dans un contexte pathologique qui entraînerait leur mort puis le recrutement de monocytes de la MO pour reconstituer un réservoir de moKC, décrits précédemment. Aujourd'hui, il est intéressant d'utiliser une association d'antigènes pour identifier les KC, définis comme CD45⁺ ; CD11b^{int} ; F4/80⁺ ; CLEC4F⁺ ; TIMD4⁺. Enfin, durant ces dernières années, l'augmentation massive des recherches sur le phénotype de ces macrophages a fait émerger des nouveaux marqueurs d'identifications de ces cellules dont CLEC2 (c-type lectin-like receptor 2), CD207 et VSIG4²³⁶. Une partie de ces marqueurs a été utilisée dans nos recherches pour étudier les KC que ce soit par cytométrie ou encore par des analyses de biologie moléculaire de type PCR quantitative. Ces derniers sont retrouvés dans le **tableau 1** ci-dessous.

Marqueurs	KC d'origine embryonnaire	KC dérivés des monocytes	Monocytes classiques
CD11b	+	+	++
Ly6C	-	-	++
F4/80	++	++	-
CCR2	-	-	++
Cx3CR1	-	-	+
CLEC4F	++	+	-
TIMD4	++	+	-
VSIG4	++	+	-
CLEC2	++	+	-
SLC40A1 (FPN)	++	++	-
CD163	++	+	-
HO-1	++	+	-
CD207	+	+	-

Tableau 1 : Principaux marqueurs protéiques pour identifier les KC

Ce tableau regroupe divers antigènes permettant de différencier les cellules de Kupffer d'origine embryonnaire (emKC), les Kupffer dérivés de monocytes (moKC) et les monocytes classiques qui dans certaines conditions peuvent se différencier en moKC.

c. Fonctions des Kupffer dans l'érythrophagocytose ainsi que le recyclage de l'hémoglobine et l'hème

En condition d'équilibre homéostatique, le recyclage des globules rouges a lieu principalement dans la rate²³⁷. Toutefois la littérature démontre que les macrophages hépatiques sont également impliqués dans l'érythrophagocytose de GR sénescents, mais les données restent peu claires. Il a été proposé que les cellules endothéliales sinusoidales du foie jouent un rôle important dans le processus de capture des globules rouges sénescents (et peu déformables), dans les sinusoides hépatiques²³⁸. Ces LSEC participeraient à la capture des globules rouges âgés dans les sinusoides, ce qui faciliterait leur ingestion par les KC. Des études récentes sur l'imagerie de l'architecture du tissu hépatique montrent que les KC résident non seulement dans les

vaisseaux sinusoïdaux, occupant souvent la majeure partie de leur lumière, mais se propagent également dans l'espace de Disse, une niche entre les LSEC et les hépatocytes. Il est plausible qu'un tel microenvironnement local, caractérisé par une lumière étroite des sinusoïdes, bordée de LSEC et remplie de KC dépassant de la paroi endothéliale, soit impliqué dans la capture des globules rouges rigides. Il est intéressant de préciser qu'au regard de l'hétérogénéité des populations de macrophages, il est également possible que seul un sous ensemble distinct de macrophages hépatique soit responsable de l'érythrophagocytose de globules rouges²³⁹.

En revanche, dans des conditions de dommages excessifs aux cellules sanguines, il a été montré que les KC occupent une rôle primordial pour la clairance des globules rouges, en phagocytant ces derniers depuis le foie qui devient alors l'organe principal pour l'érythrophagocytose⁴¹. De plus les auteurs démontrent également que lors de l'hémolyse massive, l'hémoglobine et l'hème circulants libérés par les GR endommagés sont captés dans le sang par les protéines haptoglobine et hémopexine. Les KC expriment alors les récepteurs CD163 et CD91 pour piéger ces molécules, permettant ainsi de prévenir le stress oxydatif dû à la présence de fer libre. Lorsque la capacité des KC est dépassée, ces cellules sont susceptibles de mourir par ferroptose, un processus induit par le stress oxydatif et la peroxydation lipidique²⁴⁰. Pour compenser cette perte, il a alors été montré que des monocytes sanguins se différencient en une population transitoire de macrophages exprimant fortement le récepteur CCR2. Le recrutement de ces monocytes vers le foie est médié par un gradient de la chimiokine CCL2, attirant ainsi les monocytes vers l'organe pour soutenir les KC⁴¹. Dans leurs travaux, les auteurs démontrent également que ce mécanisme est dépendant du facteur de différenciation CSF1 ainsi que du facteur de transcription NRF2. Notons que des mécanismes similaires de mort des KC et reconstruction de leur réservoir par des monocytes dérivés de la MO ont été observés dans des situations telles que l'infection à *Listeria monocytogenes*, suggérant que ce mécanisme pourrait être une réponse générale au stress, modulée en fonction de la nature du stress initial²⁴¹. Enfin, après avoir phagocyté les érythrocytes, les KC assurent le recyclage du fer en exprimant tous les gènes impliqués dans son absorption, sa transformation et son export²⁴².

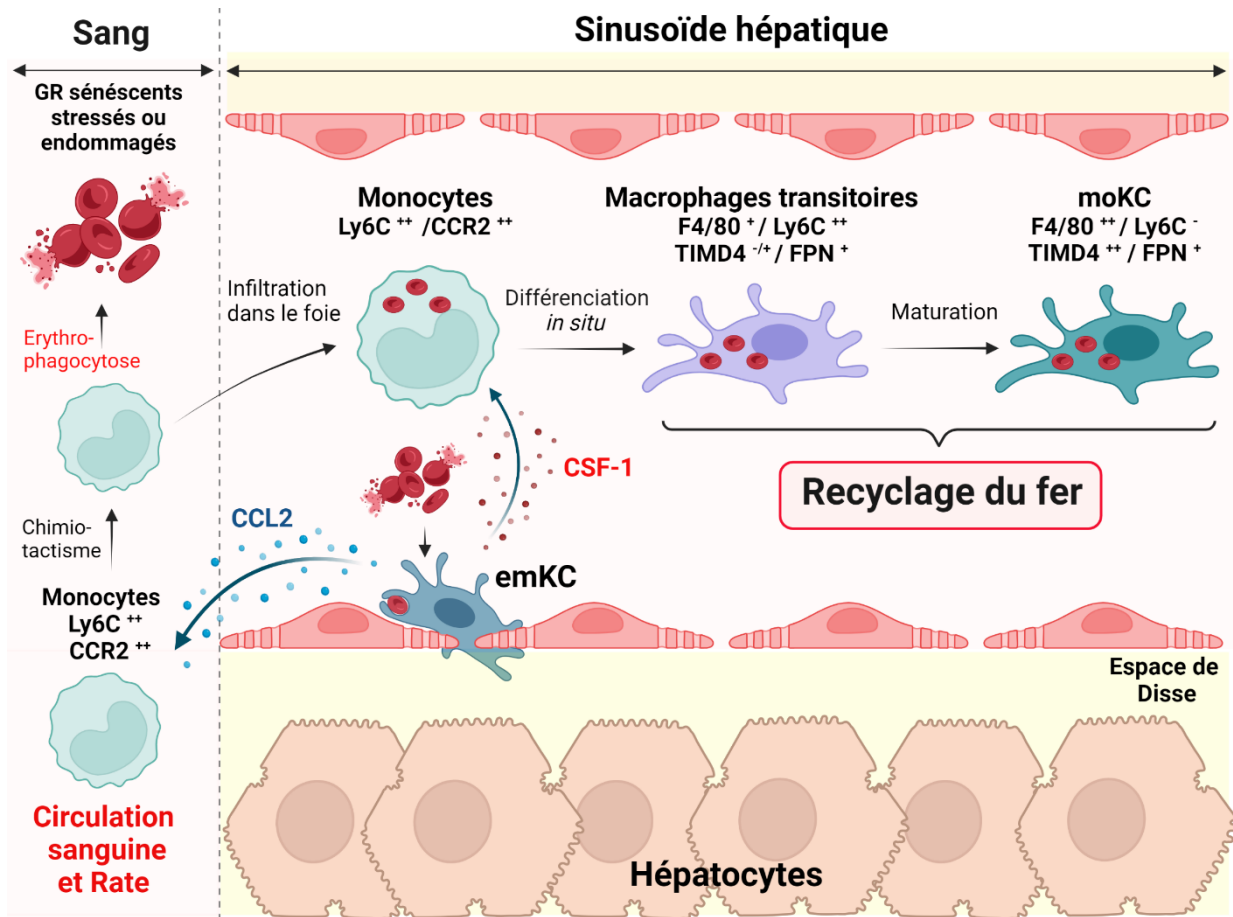


Figure 16 : Recyclage de globules rouges sénescents par des macrophages transitoires issus de monocytes $Ly6C^{++}/CCR2^{++}$

Des GR stressés ou endommagés, en excès, sont érythro-phagocytés par des emKC. Ces derniers, pouvant être dépassés par un stress oxydant trop important, recrutent alors des monocytes $Ly6C^{++}$ de la circulation sanguine et de la rate par un mécanisme CCL2-dépendant. Les monocytes recrutés participent ainsi à l'élimination des GR et se différencient dans le foie en macrophages dits transitoires, capables de recycler efficacement le fer issu des GR. Ces derniers mûrissent ensuite en macrophages, au phénotype très proche de celui des emKC, ils sont alors appelés moKC. Figure réalisée d'après Theurl *et al.* 2016⁴¹.

d. D'autres populations de macrophages cohabitent avec les KC, dans le foie

Le développement de nouvelles méthodes novatrices, basées sur des techniques d'analyse de transcriptomes sur cellule unique, a permis de mettre en évidence des sous-ensembles de macrophages dans le foie²⁴³. Ces expériences ont révélé que les KC ne constituent pas la seule population de macrophages présente dans le foie. Ici, nous définissons les différents types de macrophages qui cohabitent dans cet organe.

Nous avons vu précédemment dans ce chapitre que chez l'adulte, en condition physiologique, certains macrophages présents dans les tissus dépendent continuellement des monocytes de la MO pour maintenir leurs réservoirs. Pour illustrer notre propos, nous avons abordé le cas des macrophages capsulaires également connus sous le nom de LCM (Liver Capsular Macrophages). En effet, contrairement aux KC qui se développent à partir d'un précurseur embryonnaire, puis s'auto-renouvellent, les LCM dérivent des monocytes circulants. Une fois différenciés en LCM, ces derniers résident sous la capsule de Glisson, une localisation idéale pour la surveillance de la cavité péritonéale. Phénotypiquement, ces derniers expriment des marqueurs de macrophages généraux, tels que F4/80 et CD64, mais n'expriment pas les marqueurs de KC comme VSIG4, CLEC4F, TIMD4 ou CLEC2, décrits précédemment²⁴³. Ils expriment plutôt les antigènes CX3CR1 et CD207. Cependant, la protéine CD207 est également présente à la surface des KC, soulignant la nécessité d'utiliser des marqueurs spécifiques des KC pour exclure ces derniers de toutes analyses lorsque l'on veut étudier les autres populations de macrophages présentes dans le foie. D'un point de vue fonctionnel, les macrophages capsulaires sont principalement impliqués dans la protection contre les infections péritonéales, jouant ainsi un rôle crucial dans la défense immunitaire du foie contre les agents pathogènes potentiellement dangereux²⁰².

Puis, des macrophages exhibant une signature transcriptionnelle assez proche des LCM ont également été identifiés et fait l'objet de recherches. En effet, ce sous-ensemble de macrophages, présent dans la veine centrale a d'abord été confondu

avec des cellules dendritiques qui se trouvent également autour des veines et expriment l'antigène CD207²⁴³.

Par ailleurs, en plus de ces LCM et des macrophages de la veine centrale, a été décrite une population supplémentaire de macrophages dans le foie murin (et aussi humain), à proximité des voies biliaires. Ces macrophages ou « LAM » (Lipid-associated macrophages), présentent un phénotype proche de ceux décrits dans le tissu adipeux obèse ou aussi ceux que l'on retrouve dans foie en condition de stéatose hépatique. Ils expriment des gènes tels que *Gpnmb*, *Spp1*, *Trem2* et *Cd9*^{235,243}.

Enfin, notons que dans la circulation hépatique circule un petit pourcentage de monocytes. En effet, comme vu précédemment, ces cellules peuvent être divisées en deux sous-groupes. D'une part, sont retrouvés les monocytes non classiques Ly6C^{low}; CX3CR1⁺⁺; CCR2⁻ qui surveillent les sinusoides pour maintenir l'homéostasie vasculaire en éliminant les cellules endothéliales infectées ou en fin de vie²⁴⁴. D'autre part, on trouve les monocytes classiques Ly6C⁺⁺; CX3CR1^{low}; CCR2⁺⁺, qui sont recrutés dans les tissus en cas d'inflammation et peuvent se transformer en cellules dendritiques ou en macrophages²⁴⁵. Ces macrophages dérivés des monocytes constituent une population hétérogène et plastique, générée dans des contextes physiopathologiques d'infection stérile ou non stérile, d'agression hépatique ou encore de stéatose.

Pour résumer l'ensemble de ces éléments, il est évident que bien que les KC constituent la principale population de macrophages dans le foie sain, ils coexistent avec au moins deux autres populations de macrophages ainsi que des monocytes. Toutefois, les KC représentent la population de macrophages majoritairement spécialisée dans les fonctions associées au métabolisme du fer.

Enfin, certaines données suggèrent que les KC pourraient être impliqués de façon plus directe dans la régulation du métabolisme du fer et exercer des signaux inhibiteurs sur l'hepcidine des hépatocytes²⁴². Nous avons longuement travaillé sur cette problématique qui est introduite dans la dernière partie de ce chapitre (**partie III**)

2. Recyclage des globules rouges par les macrophages de la pulpe rouge dans la rate

Les KC ne sont pas le seul groupe de macrophages qui expriment une machinerie spécifique pour réguler le fer. En effet, en condition physiologique les RPM de la rate sont spécialisés dans l'érythrophagocytose des globules rouges sénescents pour maintenir un apport continu de fer recyclé. Dans cette partie, nous passons succinctement en revue le rôle de ces RPM qui contribuent à la régulation du métabolisme du fer.

Les RPM hydrolysent les érythrocytes dans le phagolysosome à partir duquel l'hème est libéré après la dégradation protéolytique de l'hémoglobine. Ces macrophages, présentent une expression accrue des gènes nécessaires à l'érythrophagocytose et au recyclage du fer (CD163, FPN et HO-1). L'hème est ensuite catabolisé par HO-1 libérant ainsi le fer ferreux. En fonction des besoins, le fer est stocké dans la ferritine ou libéré par les cellules dans la circulation (par les mécanismes d'export décrits dans le chapitre 1) pour fournir un apport suffisant de fer aux érythroblastes de la MO lors de l'érythropoïèse.

Les macrophages de pulpe rouge splénique sont caractérisés chez la souris par des cellules F4/80⁺; CD68⁺; VCAM1⁺; CD11b^{+/-246}. Ils se développent sous l'influence du facteur de transcription Spi-C, exprimé spécifiquement dans ces RPM. Les souris *Spi-C*^{-/-} présentent une splénomégalie et une accumulation de fer dans la rate associée à une faible expression de ferroportine, ce qui entraîne une capacité limitée à exporter du fer recyclé²⁴⁷. Il a été montré que Spi-C est induit par le CSF-1 ce qui est cohérent avec le rôle proposé de ce facteur de croissance dans l'induction de la différenciation en macrophages spécialisés dans l'érythrophagocytose.

3. Rôle trophique des macrophages de la moelle osseuse dans l'érythropoïèse

Nous avons vu dans le **chapitre 2** que l'érythropoïèse est un processus dynamique régulé par divers signaux extérieurs et dépendant d'un apport d'holotransferrine adéquat. Cet apport de fer permet la synthèse d'hème au cours de l'érythropoïèse définitive. Dans certaines zones de la MO se trouvent des structures appelées îlots érythroblastiques dans lesquelles mûrissent des cellules érythroïdes à différents stades de développement²⁴⁸. Ces îlots sont donc constitués d'un amas de progéniteurs de GR avec en son centre un macrophage dit « nourricier ». Ce macrophage, caractérisé comme CD169+ fournit une niche pour la régulation érythropoïétique²⁴⁹.

La formation des îlots érythroblastiques est permise grâce à des molécules d'adhésion cellulaire. En effet, c'est notamment le cas de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et de la molécule d'adhésion intercellulaire 4 (ICAM-4) exprimée à la membrane des précurseurs érythroïdes. Ces molécules interagissent respectivement avec la molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 : VCAM-1 et les intégrines α_v , telles que $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$ ²⁵⁰. L'utilisation d'anticorps neutralisants a démontré que ces molécules d'adhésion sont importantes pour l'intégrité des îlots érythroblastiques puisque que le blocage de l'interaction des intégrines ICAM-4 – α_v entraîne une réduction du nombre d'îlots ainsi que du nombre total d'érythroblastes par îlot²⁵¹. De même, la perte de l'interaction $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1 a conduit à une perturbation des îlots érythroblastiques soulignant l'importance des macrophages dans ces niches de précurseurs érythroïdes²⁵².

Par ailleurs, le macrophage nourricier soutient l'érythropoïèse en émettant des signaux de stimulation et d'inhibition pour réguler la balance entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes, tout en maintenant les signaux de survie nécessaires³⁴. Parmi ces signaux peuvent être cités différents facteurs solubles, tels que la BMP4, le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (ILGF1), l'IL-3 et le facteur de différenciation en granulocytes et macrophages : GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). De plus, des régulateurs négatifs de l'érythropoïèse peuvent être libérés par ces macrophages notamment le facteur de transcription GATA 1 et les molécules TGF- β , IFN γ (interféron gamma) et TNF α ^{34,253}.

Enfin, Il a également été montré que les macrophages nourriciers sont impliqués dans l'élimination des noyaux extrudés des érythroblastes. En effet, nous avons vu dans la section concernant l'érythropoïèse que durant leur maturation, les progéniteurs libèrent un fragment érythrocytaire contenant leur noyau appelé pyrénocyte²⁵⁴.

III. Démonstration des liens entre macrophages et hepcidine

Durant ces trois années de recherches, nous avons exploré l'implication des macrophages sur la régulation de l'hepcidine. Dans ce contexte, nous avons testé des hypothèses sur le rôle de ces phagocytes mononucléés par des approches *in vivo* et *in vitro*.

Cette dernière partie a pour but de résumer les données de la littérature qui font état de liens directs entre les macrophages et l'hepcidine. Nous verrons que le rôle des macrophages (dont les KC) dans l'homéostasie martiale, n'a peut-être pas encore été pleinement caractérisé et que ces derniers pourraient être impliqués de façon plus directe dans la régulation de l'hepcidine des hépatocytes, en produisant notamment des signaux inhibiteurs.

1. Expression de l'hepcidine par les macrophages

Les macrophages, présents dans divers tissus, sont directement impliqués dans la sécrétion de l'hepcidine. Dans le foie, les cellules de Kupffer sécrètent de l'hepcidine en réponse au LPS, par une voie dépendante de TLR4⁵⁹. De la même façon, il a été démontré que des macrophages spléniques peuvent synthétiser de manière endogène l'hepcidine après infection bactérienne. En effet des injections intrapéritonéales de LPS étaient capables d'augmenter l'expression de l'hepcidine dans ces macrophages, toujours via TLR4²⁵⁵.

Dans les poumons, les macrophages alvéolaires produisent également de l'hepcidine en réponse aux infections respiratoires. Cette sécrétion aide à limiter la

disponibilité du fer pour les agents pathogènes, réduisant ainsi leur prolifération et soutenant la défense immunitaire locale^{256,257}. Ainsi, les macrophages alvéolaires jouent un rôle clé dans la protection des voies respiratoires contre les infections notamment dans le contexte de tuberculose²⁵⁸.

En résumé, les macrophages peuvent produire localement de l'hépcidine dans certains tissus, particulièrement dans des contextes inflammatoires, ce qui suggère un rôle protecteur de l'hépcidine contre les pathogènes. Au-delà de ce rôle local, se pose la question d'un rôle systémique, c'est-à-dire l'effet des macrophages sur l'expression de l'hépcidine par les hépatocytes. Cette problématique, qui a été au centre de ces travaux de thèse, est développée dans la partie suivante.

2. Les KC inhibent-ils l'hépcidine ?

Aujourd'hui, il est acquis qu'une augmentation du fer plasmatique stimule la production de l'hépcidine par les hépatocytes, limitant ainsi l'export du fer des macrophages via le blocage et l'élimination de la FPN. De ce fait, il n'est pas impossible qu'un mécanisme inverse puisse exister. C'est-à-dire un mécanisme provenant des macrophages, vers les hépatocytes, pour ajuster les niveaux d'hépcidine en fonction du contexte. Ainsi, en 2008, il a été décrit que les KC semblent atténuer l'expression de l'hépcidine des hépatocytes. En effet, dans leurs travaux, les auteurs ont développé un modèle de mort cellulaire des KC induite par les liposomes de clodronate. Ils ont alors observé que cette diminution de la population de macrophages hépatiques a entraîné une augmentation de l'expression de l'hépcidine et en conséquence une baisse significative des taux plasmatiques de fer²⁴².

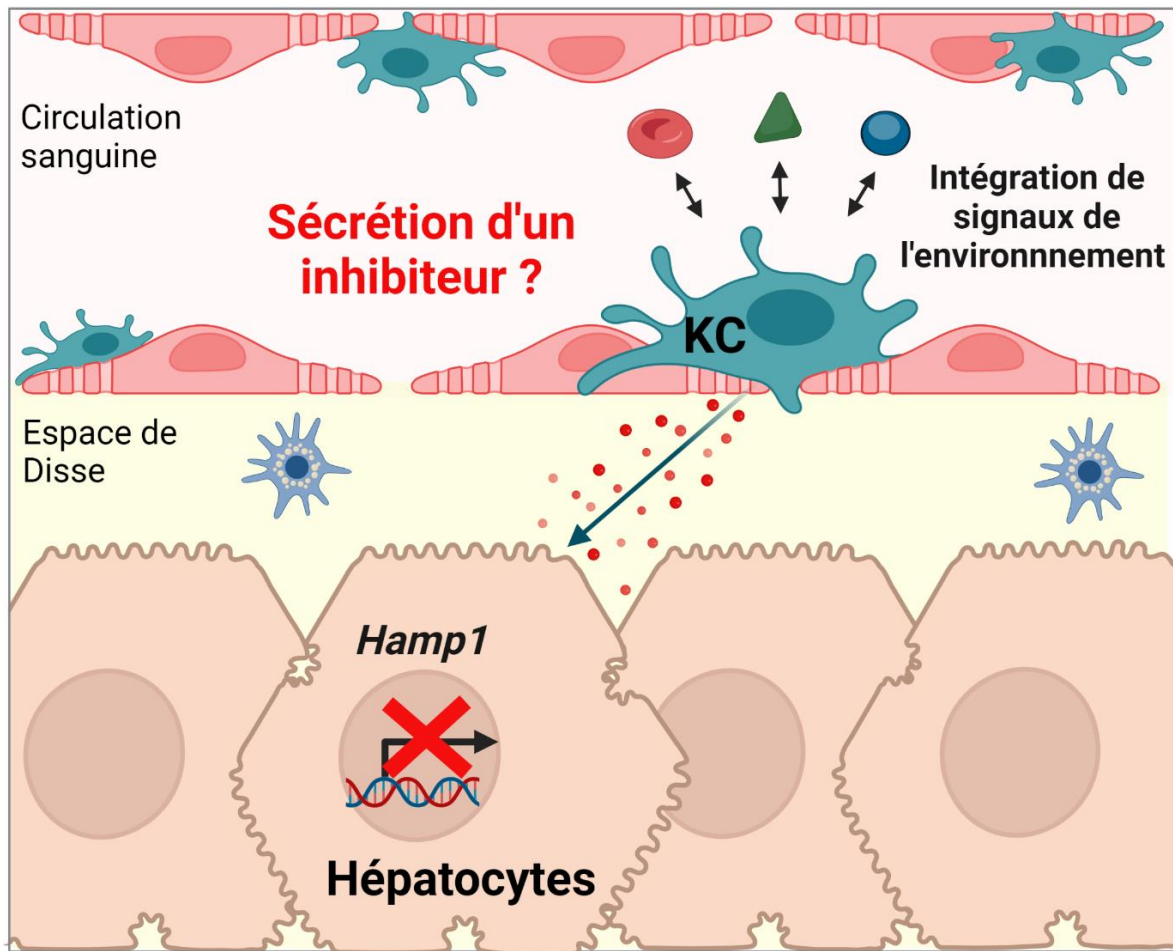


Figure 17 : Modèle hypothétique d'une inhibition de l'expression de l'hepcidine hépatocytaire par les KC en réponse à des signaux de leur environnement

D'après Theurl *et al.* 2008²⁴², les KC pourraient exercer une inhibition de l'expression de l'hepcidine des hépatocytes. En effet, la position stratégique de ces macrophages, à l'interface entre la circulation hépatique et l'espace de Disse, permet à ces cellules d'agir comme des sentinelles capables de sonder les signaux de l'environnement. Ainsi, l'hypothèse que ces macrophages puissent rendre compte de ces signaux, en agissant sur les hépatocytes pour réguler l'hepcidine n'est pas impossible.

Au regard de ces éléments, il est tentant de spéculer que les KC peuvent affiner la production d'hepcidine et qu'un circuit hépatique intrinsèque rende compte de la quantité de fer acquise par les KC par érythrophagocytose. Il n'est pas non plus impossible que d'autres signaux, provenant de l'environnement, puissent être détectés par les KC qui pourraient ensuite réguler l'hepcidine des hépatocytes. A ce jour, aucune preuve de ce dialogue KC-hépatocytes n'a été pleinement avancée, ces interrogations ont fait l'objet d'un axe important dans nos travaux de recherches.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS

En résumé de cette introduction, l'hepcidine est une hormone hépatocytaire qui permet de maintenir un niveau adapté de fer sérique, en contrôlant son absorption au niveau intestinal et son export dans la circulation par les macrophages et les hépatocytes. Dans des conditions de stress de l'érythropoïèse, l'hepcidine est inhibée pour augmenter de la biodisponibilité du fer et ainsi fournir une quantité adéquate pour la synthèse d'hémoglobine par les érythroblastes, lors du processus d'érythropoïèse. Cependant, les mécanismes permettant la suppression de l'expression de l'hormone hépatique ne sont pas encore tout à fait élucidés.

Dans ce contexte, de nouveaux acteurs pourraient être identifiés, comme par exemple le récepteur PAR₂, qui agit comme un senseur de l'environnement protéolytique pour médier différentes réponses cellulaires. En effet, nous avons largement décrit ce récepteur, appartenant à une famille particulière de RCPG, dont l'activation réside dans le clivage d'un de leur fragment extracellulaire par diverses protéases. Nous avons également vu que la fonction de PAR₂ n'a jamais été étudiée dans le contexte du métabolisme du fer, en particulier celui de la régulation de l'hepcidine. Toutefois, la littérature décrit que sa délétion dans les macrophages altère l'érythropoïèse embryonnaire et induit l'anémie des embryons transgéniques *F2r1^{LysM}*. Une surexpression de l'hepcidine était également associée à ce phénotype, suggérant que PAR₂ pourrait être impliqué dans la régulation de cette hormone.

Par ailleurs, les macrophages assurent des fonctions physiologiques pour maintenir l'équilibre homéostatique du fer. Cependant, à ce jour, ces phagocytes n'ont pas encore livré tous leurs secrets. En 2008, l'implication directe des macrophages dans la régulation de l'hepcidine hépatocytaire a été suggérée mais ce phénomène demeure aujourd'hui assez flou et demande à être pleinement caractérisé.

Dans ce contexte de recherche, plusieurs objectifs se sont dessinés pour décrypter certains mécanismes de régulation de l'hepcidine. Dans un premier temps,

nous avons cherché à démontrer l'implication du récepteur PAR₂ dans l'inhibition de l'hormone hépatique. Pour répondre à cette problématique, nous avons développé plusieurs modèles murins dans lesquels PAR₂ a été supprimé. Les expériences menées sur ces modèles ont eu pour but de déterminer si PAR₂ peut être une cible intéressante pour le traitement de certaines pathologies associées à une dérégulation de l'hepcidine.

Le deuxième objectif fut d'explorer la fonction des macrophages dans l'inhibition de l'hormone hépatocytaire. Par des approches *in vivo* et *in vitro*, nous avons tenté de caractériser le comportement de ces cellules myéloïdes en condition d'homéostasie mais également lors de l'anémie engendrée par la phlébotomie. La compréhension précise du fonctionnement de ces cellules est importante pour enrichir les connaissances fondamentales de la biologie des macrophages et pourrait s'avérer intéressante dans divers domaines de recherche biomédicale.

Le troisième objectif de cette thèse s'est intégré dans un projet secondaire dans lequel nous avons clarifié la fonction de la matriptase-2 hépatocytaire. En effet, cette protéase transmembranaire exprimée dans plusieurs organes et surtout dans le foie, inhibe l'hepcidine pour établir des niveaux basaux en condition d'homéostasie. Chez l'Homme mais aussi chez la souris, la perte de fonction de la matriptase-2 entraîne l'IRIDA. En supprimant *in vivo* la matriptase-2 des hépatocytes, nous avons étudié les conséquences de la délétion sur les souris et ainsi déterminé si leur phénotype récapitule celui dont la matriptase-2 est éteinte dans tout l'organisme.

L'ensemble de ces travaux de thèse a donc pour objectif d'identifier, d'éclaircir ou caractériser différents acteurs de la régulation de l'hepcidine, dans diverses conditions physiopathologiques.

MATERIELS ET METHODES

I. Modèles *in vivo*

1. Animaux

L'utilisation de modèles *in vivo* s'est avérée indispensable pour tester nos hypothèses. Nous avons donc choisi le modèle murin pour sa facilité de manipulation, mais également parce que sa physiologie est très proche de celle de l'Homme, notamment celle concernant la régulation de l'hepcidine et du fer.

Plusieurs lignées de souris transgéniques ont été utilisées. Ces souris ont été hébergées principalement dans la zootchnie A1 du CREFRE (Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales) – US006 à statut SPF (Specific Pathogen Free). Exceptionnellement, la lignée de souris *F2rl1^{LysM}* a été hébergée dans une autre zootchnie d'expérimentation type A1 du CREFRE à statut conventionnel. Toutes les souris ont été élevées dans des cages ventilées (5 souris maximum/cage), dans des conditions de libre accès à l'eau et à la nourriture (180 mg/kg de fer ; ssniff ; Soest ; Allemagne) en suivant un rythme nyctémère constant.

Différentes lignées murines ont été utilisées :

- **Souris *F2rl1^{-/-}*** : Ces souris, provenant de l'équipe du Dr Nathalie Vergnolle à l'INSERM U1220 (premièrement décrites par Lindner, J.R *et al.*2000), présentent une délétion constitutive du gène *F2rl1* codant pour PAR₂. Elles sont issues d'un fond C57Bl/6J et ne présentent pas de phénotype macroscopique particulier.
- **Souris *F2rl1^{LysM}*** : Ces souris présentent une délétion de l'exon 2 du gène *F2rl1* codant pour PAR₂ spécifiquement dans les monocytes/macrophages (*F2rl1^{LysM}*). La délétion de l'exon entraîne un arrêt de la transcription et en conséquence une absence du récepteur dans les cellules LysM+. Elles sont

issues d'un croisement entre les souris *F2rl1^{Flox/Flox}* (provenant du Dr Eric Camerer, PAARC, Inserm U970) et les souris *LysM^{Cre}* (provenant du Dr Jean-Philippe Pradere, RESTORE, CNRS UMR5070). Sous un fond C57Bl/6J, elles ne présentent pas de phénotype macroscopique particulier.

- **Souris *LysM^{iDTR}*** : Ces souris expriment le récepteur de la toxine diphtérique induit (iDTR) uniquement dans les monocytes/macrophages. Elles sont issues d'un croisement entre les souris *iDTR^{Flox/Flox}* (provenant du Dr Nicolas Gaudenzio, INFINITY INSERM U1291) et les souris *LysM^{Cre}* d'un fond C57Bl/6J et ne présentent pas de phénotype macroscopique particulier.
- **Souris *Tmprss6^{-/-}*** : Ces souris présentent une délétion constitutive du gène *Tmprss6* codant pour la matriptase-2, elles sont issues d'un fond génétique C57Bl/6J. Les souris n'exprimant pas la matriptase-2 présentent une anémie ferriprive, c'est-à-dire une anémie liée à une carence en fer, et une alopecie.
- **Souris *Tmprss6^{Alb}*** : Ces souris présentent une délétion de l'exon 3 du gène *Tmprss6* de la matriptase-2 conduisant à l'absence d'expression de la MT2 spécifiquement dans les hépatocytes. Elles sont en fond génétique C57Bl/6J. Elles sont issues d'un croisement entre les souris *Tmprss6^{Flox/Flox}* générées par l'institut clinique de la souris à l'IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Strasbourg) et les souris *Alb^{Cre}* (Jackson Laboratory).

Pour l'étude de ces différents modèles murins, nous avons utilisé des souris contrôles dites « littermates », issues de l'élevage concerné et des mêmes portées, mais dont le gène d'intérêt n'a pas été supprimé. Nous avons également travaillé sur une cohorte de souris sauvages WT (Wild-Type) C57Bl/6J (Janvier Labs) qui ne présentent pas de mutations. Ces dernières ont été hébergées dans des conditions identiques à celles des modèles transgéniques. L'ensemble des souris utilisées dans le cadre de nos expériences étaient des mâles âgés de 8 à 12 semaines. Toutes les expérimentations animales ont été menées conformément à la législation européenne sur la recherche animale et aux directives ARRIVE 2.0.

2. Modèle d'induction d'un stress érythropoïétique

1. Anémie induite par la phlébotomie

La phlébotomie est une incision pratiquée dans une veine pour retirer du sang. Cette technique a pour but d'induire un stress de l'érythropoïèse, responsable d'une anémie qui requiert la production de nouveaux globules rouges. Cela permet d'engendrer une baisse significative du nombre de globules rouges conduisant à une diminution de la concentration globale d'hémoglobine associée à une baisse de l'hématocrite qui représente le volume de globules rouges par rapport au volume sanguin total.

Pour réaliser ces phlébotomies, des souris mâles âgées de 10 à 12 semaines ont été anesthésiées avec de l'isoflurane pendant quelques secondes. Celles-ci ont ensuite été contentionnées afin de rendre plus accessible un faisceau vasculaire situé sous la mâchoire, derrière la pointe de l'os mandibulaire. A l'aide d'une aiguille stérile d'un diamètre de 18G, la veine mandibulaire est percée pour laisser s'écouler un volume précis de sang, collecté dans un tube de 1,5ml. Une forte pression est ensuite appliquée sur la joue pour arrêter le saignement.

Le protocole de phlébotomie est basé sur deux phlébotomies (300 μ L de sang / phlébotomie) séparées de 24h, les souris sont ensuite sacrifiées 24h après le second prélèvement.

2. Stimulation de l'érythropoïèse par injection d'EPO recombinante

Afin d'induire la production de nouveaux globules rouges et de mimer un stress érythropoïétique pour diminuer l'expression de l'hepcidine, des souris âgées de 10 à 12 semaines ont reçu une dose intrapéritonéale de 200U d'EPO (329871 ; **Sigma-Aldrich**). Les souris ont ensuite été sacrifiées 15h après l'injection pour les différents prélèvements d'échantillons.

3. Modèle d'inflammation induite par injection de LPS

Pour induire une réponse inflammatoire systémique, les souris ont été injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) avec une solution saline contenant du LPS (1 µg/g de souris ; L2637 **Sigma-Aldrich**) et sacrifiées 2h, 15h ou 24h après injection. Les souris du groupe contrôle ont reçu une injection de solution saline (NaCl 0,9%) dans les mêmes conditions.

4. Modèle de déplétion des macrophages par injection de toxine diphtérique

Les souris *LysM^{iDTR}* ont reçu une injection i.p. de 500ng de toxine diphtérique recombinante (D0564, **Sigma-Aldrich**) par jour pendant trois jours. La toxine induit une inhibition de la synthèse protéique dans toutes les cellules exprimant le récepteur iDTR, majoritairement les monocytes et macrophages. Un groupe de souris contrôle a reçu 3 injections de PBS (Phosphate Buffered Saline). Les animaux ont été sacrifiés 12 heures après la dernière injection.

5. Mise à mort des animaux et prélèvement d'échantillons biologiques

Les souris ont été euthanasiées par injection i.p. d'une dose de pentobarbital sodique (90 mg/kg ; **Dolethal**) puis différents prélèvements ont rapidement été réalisés *post-mortem* :

- Le sang a été prélevé par exsanguination au niveau de l'aorte abdominale quelques secondes après la mort des individus. Environ 100 µL ont été prélevés dans un tube (Microvette®, 20.1288.100, **Sarstedt**) dont les parois sont enduites d'EDTA (éthylènediaminetétraacétique), permettant d'empêcher la coagulation sanguine qui interférerait avec la mesure de paramètres hématologiques comme la NFS (Numération Formule Sanguine), les globules blancs et les plaquettes

avec un automate spécialisé (CELL-DYN Emerald, **Abbott**). Environ 500 μ L de sang ont été récupérés pour extraire le sérum par centrifugation à 2500 rpm puis stockés à -80°C.

- Les organes d'intérêt (foie, rate, reins, etc.) ont été prélevés sur glace, rincés en PBS et immédiatement congelés dans de l'azote liquide pour être ensuite stockés à -80°C.
- Les fémurs, contenant la moelle osseuse (MO), ont été prélevés dans du PBS à 4°C, puis coupés, à l'aide d'un scalpel, de part et d'autre au niveau de la diaphyse. Les fémurs ont été placés dans des micro-tubes de 0.2ml, préalablement perforés, et placés eux-mêmes dans un tube de 1.5ml puis centrifugés à 5000 rpm pendant 2,5min. La moelle osseuse, ainsi récupérée, a été congelée dans une solution de Trizol permettant de stabiliser les ARN (Acides RiboNucléiques) pour les expériences de biologie moléculaire.
- Pour les analyses de cytométrie en flux, la rate a été prélevée, puis écrasée entre deux lames de verre et dissociée avec une seringue de 5mL dans une solution de PBS contenant 5% de SVF (sérum de veau foetal ; CVFSVF00-01, **Eurobio scientific**) à 4°C, puis passée à travers un tamis cellulaire de 70 μ M (352350, **Falcon**®) pour retirer les débris et obtenir une suspension cellulaire. La moelle osseuse a été récupérée en incisant les fémurs et les tibias à l'aide d'un scalpel, puis en injectant du PBS-SVF 5% pour en extraire les cellules qui ont été conservées à 4°C. Pour étudier les cellules NPCs, le foie a été lavé dans du PBS, puis a subi une digestion à la collagénase, décrite dans la section suivante des modèles *in vitro*.

II. Modèles *in vitro*

1. Production de milieu conditionné par la lignée cellulaire L929

La lignée L929 est une lignée de fibroblastes murins qui a été utilisée pour produire un lot de milieu conditionné appelé LCCM (L-Cell-Conditioned Medium) comprenant des facteurs de différenciation pour établir une culture de macrophages dérivés de cellules de moelle osseuse. Ce milieu contient notamment du M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) ou CSF1, une cytokine sécrétée par les fibroblastes L929 qui induit la différenciation de cellules souches hématopoïétiques en macrophages. Les cellules L929 ont été cultivées pendant 3 semaines dans des flasques T75 à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂, dans du milieu RPMI (61870-010, **Gibco**) avec glutamax supplémenté avec 10% de SVF inactivé par la chaleur ; 1% d'antibiotiques P/S (pénicilline 50 U/ml ; streptomycine 50 mg/ml, 15140-122, **Gibco**). Le LCCM a été collecté après 20 jours de culture puis filtré avec une unité de filtration sous vide (S2GPU10RE, **Sigma-aldrich**) et stocké à -80°C.

2. Culture de macrophages dérivés des cellules souches de moelle osseuse

Pour étudier l'inhibiteur sécrété par les macrophages *in vitro*, nous avons choisi le modèle BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage). Ces macrophages ont été cultivés en utilisant des cellules de la moelle osseuse isolées à partir des fémurs de souris C57Bl/6J WT âgées de 8 à 12 semaines. Les cellules de la MO ont étéensemencées (J0) à une densité de 3.3×10^6 cellules dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, ou à une densité de 5.8×10^5 cellules dans des plaques 6 puits de 3,5 cm de diamètre. Les cellules ont été cultivées à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂, dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 4.5g/L de glucose (31966-01, **Gibco**) complété par 10% de SVF, 10% de LCCM (milieu de culture cellulaire L929, source de CSF-1) et 1% de P/S. Au jour 4, les cellules ont été rincées deux fois avec une solution saline équilibrée de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ;

H8264, **Sigma-aldrich**) et le milieu a été renouvelé. Une deuxième étape de lavages et de renouvellement du milieu a été réalisée à J6, les BMDM ont été laissés 24h dans un milieu DMEM (4.5g/L de glucose ; 0.1% SVF ; 10% LCCM ; 1% P/S) avant que le milieu ne soit collecté et utilisé pour stimuler des hépatocytes primaires.

3. Culture d'hépatocytes primaires

1. Isolement et ensemencement des hépatocytes primaires

Les hépatocytes primaires ont été isolés à partir des foies de souris C57Bl/6J WT adultes âgées de 8 à 12 semaines. Les souris ont été anesthésiées à l'aide de pentobarbital sodique (90 mg/kg) administré par injection i.p. Une laparotomie a été réalisée et le foie a été perfusé *in situ* avec une solution d'HBSS à 37°C sans Ca²⁺ contenant 25mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique, 31966-01, **Gibco**) et 1% de P/S pour éliminer le sang. Ensuite, une perfusion avec une solution de collagénase (100U/mL ; WOLSO4188, **Worthington Biochemical Corporation**) dans du DMEM (21885-025, **Gibco**) (1g/L Glucose ; 15mM HEPES ; 1% P/S) a été effectuée pour dissocier les cellules. Le foie a ensuite été excisé et placé dans une boîte de Pétri contenant du PBS froid.

La capsule de Gibson a été rompue manuellement pour dissocier les cellules. La suspension cellulaire contenant les hépatocytes dissociés a été filtrée à travers un tamis cellulaire de 70 µm, puis centrifugée à 50g pendant 5min à 4°C pour éliminer les débris. Le culot d'hépatocytes a été re-suspendu dans une solution de Percoll 50% (17-0891-01, **GE HEALTHCARE**) puis centrifugé à 300g pendant 10min à 4°C. Cette même opération a été répétée, après suspension, au préalable des hépatocytes dans du DMEM (4,5g/L GlutaMax pyruvate ; 10% SVF ; 1% P/S).

La viabilité cellulaire a été évaluée par coloration au bleu de Trypan. Les hépatocytes viables ont été repris dans un milieu de culture contenant 50% de DMEM glutaMax pyruvate (4,5g/L) et 50 % de F12 (31765027, **ThermoFisher Scientific**) supplémenté avec 10% de SVF, 1% P/S et ensemencés à une densité de 4×10^5

cellules par puits dans des plaques de culture 12 puits (140620, **ThermoFisher Scientific**). Les hépatocytes ont été incubés à 37°C, en atmosphère humidifiée, avec 5% de CO₂. Le milieu de culture a été renouvelé 1h et 4h après l'ensemencement.

2. Traitement des cellules

Une moitié du volume du milieu conditionné, provenant des BMDM, a été conservée à 4°C afin d'être utilisé pour stimuler directement les hépatocytes. L'autre moitié a été filtrée à travers des tubes Amicon (Maillage 3kD ; UFC900324 **Merck**) pour concentrer les molécules, puis, re-suspendue dans du milieu DMEM frais (4,5g/L glutamax pyruvate, 10% LCCM et 1% P/S) contenant soit 0,1% ou 10% de SVF. Les hépatocytes ont alors été traités toute une nuit (environ 15h) avec ces différents milieux conditionnés.

De plus, une solution de BMP2 recombinant humain (10ng/mL 12002C, **Peprtech**) a été ajoutée dans certains puits au moment du traitement des hépatocytes par le milieu conditionné de BMDM. Ce ligand induit l'expression de l'hepcidine et a pour but de mettre en évidence l'effet d'un possible inhibiteur de la voie BMP-SMAD qui aurait été sécrété par les BMDM dans le milieu conditionné.

4. **Isolement *ex vivo* des cellules non-parenchymateuses du foie**

Pour isoler les cellules non-parenchymateuses du foie, l'appareil « Liver Dissociator » (**Miltenyi Biotec**) a été utilisé selon le protocole du fabricant. Le foie des souris a été prélevé et rincé dans du milieu DMEM, puis coupé en petits fragments d'environ 0,5cm/0,5cm. Ces derniers ont ensuite été placés dans les tubes de dissociation contenant le tampon enzymatique (collagénase A 1mg/mL, 10103578001 et DNase I 10U/mL, 04536282001, **Roche**) préalablement activé à 37°C pendant 15min.

Les tubes contenant les foies dans le tampon ont alors été placés dans le Liver Dissociator et traités pour une digestion complète, durant 30 minutes à 37°C. Après la

première dissociation, les tubes ont à nouveau été incubés 30min 37°C, puis replacés dans le Liver Dissociator avec une agitation de 30sec permettant la séparation finale des cellules.

La suspension cellulaire obtenue a été filtrée à travers un tamis cellulaire de 70 µm pour éliminer les débris et les agrégats puis centrifugée 10min à 300g à 4°C pour récupérer les cellules. Toutes les centrifugations de ce protocole ont été réalisées dans ces conditions. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans une solution de DMEM puis à nouveau centrifugé 5min. Les globules rouges présents dans le culot ont été lysés avec un tampon de lyse ACK (Ammonium Chloride Potassium, A1049201, **Gibco**). Le culot contenant les cellules d'intérêt restantes a ensuite été dilué dans une solution de PBS (0,5% SVF ; 2mM EDTA (139-33-3, **Sigma-aldrich**)). Les cellules ont subi une dernière centrifugation de 5min puis ont été re-suspendues dans 1mL de PBS (0,5% SVF ; 2mM EDTA).

Les NPC isolées ont été comptées avec un compteur cellulaire (Mutisizer, **Beckman coulter**) et leur viabilité a été contrôlée par coloration au bleu de Trypan avant d'être utilisées pour les analyses ultérieures.

III. Techniques expérimentales

1. Analyse de la transcription des gènes

1. Extraction des ARN tissulaires/cellulaires

Les ARN ont été extraits à partir de fragments de tissus provenant de divers organes ou de cellules mises en culture. Pour ce faire, un échantillon de tissu est broyé et lysé dans une solution contenant 1mL de trizol (TR118-200, **Euromedex**) à l'aide d'une sonde ultraturax (**IKA**) afin de dissocier les cellules. Les cellules en culture, après lavage en PBS, ont été directement reprises dans du trizol. Par la suite, 200µL de chloroforme (6766-3, **Sigma-aldrich**) sont ajoutés à la suspension de trizol suivi d'une incubation de 5min à température ambiante (TA) puis d'une centrifugation (5417-R, **Eppendorf**) à 24000 g pendant 10min à 4°C. Toutes les centrifugations suivantes ont été réalisées avec ces conditions. Ainsi, l'étape précédente a produit une solution à 3 phases, les ARN, contenus dans la phase aqueuse supérieure, sont prélevés (350µL) et mélangés à 350µL d'isopropanol (67-63-0, **Sigma-aldrich**) puis incubés 5min à TA avant centrifugation. Les ARN sont précipités sous la forme d'un dépôt blanc au fond du tube. Pour l'extraction à partir d'une faible quantité de cellules, quelques microlitres d'une solution de glycogène à (50mg/mL, AM9510, **Thermofisher scientific**) sont ajoutés préalablement à la suspension d'isopropanol. Les ARN co-précipitent avec le glycogène, rendant le culot plus visible après centrifugation. Enfin, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est repris dans 1mL d'éthanol (1-00983, **Supelco**) à 75% puis stocké dans un congélateur à -20 °C afin de réaliser un lavage des ARN. Quelques heures plus tard, les ARN sont à nouveau placés dans 1mL d'éthanol 75% et conservés une nuit à -20°C avant la rétrotranscription des ARN en ADNc (ADN complémentaire).

2. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires

Cette expérience a pour but de synthétiser des brins d'ADN complémentaires aux séquences d'ARN messagers (ARNm) préalablement extraits. Pour cela, les ARN sont re-suspendus dans de l'eau ultra-pure (100977035, **ThermoFisher scientific**) pendant 1h à 4°C, puis dosés avec un spectrophotomètre Nanodrop (**Implen , GmbH**). La quantité adéquate d'ARN (1µg pour les cellules et 3µg pour les tissus) est mélangée avec une solution d'amorces oligodT (6µL, 100 µM, **Eurogentec**) et de l'eau RNase-free dans un volume final de 17,75µL. Ce mélange est incubé à 70°C pendant 5min pour dénaturer les ARN puis immédiatement placé dans de la glace pendant 5min. Ensuite, l'enzyme ARN-polymérase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, 1µL, 200U, M1705, **Promega**), le tampon réactionnel 5X (5µL, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, **Promega**), et le mélange de dNTP (1,25µL, 0,5M ; EUA01601, **Euromedex**) sont ajoutés pour la réaction de rétrotranscription. Ce mélange réactionnel est incubé pendant 60 minutes à 42°C, période au cours de laquelle l'enzyme synthétise le brin d'ADNc dans le sens 3' – 5'. Ensuite, l'enzyme est inactivée à 70°C pendant 15min. Les ADNc obtenus sont ensuite dilués au 1/8^{ème} dans de l'eau ultra-pure en vue des expériences de PCR quantitative.

3. PCR quantitative

La PCRq (quantitative Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour mesurer l'expression d'un gène spécifique dans un échantillon biologique. Cette méthode repose sur l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADNc (issue de la rétrotranscription des ARNm) en utilisant des amorces spécifiques (**Tableau 2**). Pour cela, 2µL d'ADNc sont ajoutés à un mélange réactionnel de 8µL contenant 2,4µL d'eau RNase free, 0,6µL d'un mélange d'amorces sens et anti-sens (10µM), ainsi que 5µL du tampon de réaction 2X Takyon (UF-NSMT-B0701, **Eurogentec**) qui contient l'ADN polymérase Takyon™, 5,5mM de MgCl₂, des dNTPs, un colorant bleu inerte et des stabilisateurs. La sonde contenue dans le Takyon émet un signal de fluorescence lorsqu'elle s'intercale dans l'ADN double brin synthétisé après chaque cycle d'amplification. Ainsi, plus la quantité d'ADN double brin est

importante, plus la fluorescence émise par la sonde augmente. La PCRq a été réalisée dans un appareil de type LightCycler480 (**Roche Diagnostics**). Ce dispositif de PCR en temps réel est basé sur la détection fluorescente d'ADN, permettant un suivi continu de l'amplification. Les étapes de la PCRq comprennent la dénaturation de l'ADN (15sec à 95°C), l'hybridation des amorces aux séquences cibles (10sec à 60°C) et l'élongation des brins complémentaires par l'ADN polymérase (15sec à 72°C). Ces cycles se répètent 40 fois de manière itérative, chaque cycle doublant la quantité d'ADN amplifié. A la fin de chaque cycle, la quantité de fluorescence est alors mesurée par l'appareil.

La fluorescence émise au cours du temps est représentée par 3 phases. Premièrement, la phase de bruit de fond durant laquelle la quantité d'ADN amplifiée est trop faible pour générer un signal fluorescent détectable. S'ensuit une phase exponentielle durant laquelle la quantité d'ADN amplifiée devient suffisante pour générer un signal fluorescent détectable au-dessus du seuil de détection de l'appareil. Le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle de PCRq. Enfin, on observe une phase de plateau, à mesure que la réaction de PCR progresse, certains composants, tels que le nombre de molécules d'ADN polymérase, deviennent limitants. Cela conduit à une diminution de l'amplification exponentielle et la courbe atteint un plateau. Le début de la phase exponentielle est particulièrement important pour la quantification précise de l'ADN qui est réalisée en déterminant les cycles seuils (Ct) de chaque échantillon pour une amorce donnée.

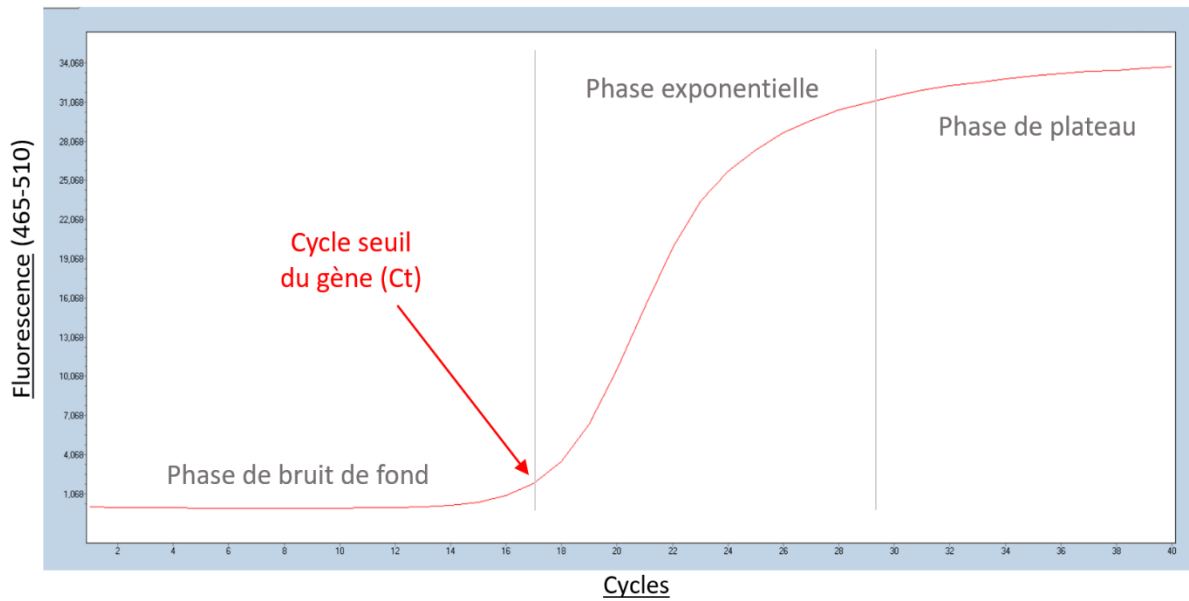


Figure 18 : Représentation graphique d'une courbe d'amplification en PCRq

Interprétation des résultats : Pour un échantillon, l'expression des gènes cibles est mesurée en parallèle avec celle d'un gène de référence dont l'expression reste constante dans nos conditions expérimentales. Dans notre étude, le gène de référence est *Hprt* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase). Le niveau d'expression des gènes cibles est exprimé en $-\Delta Ct$, calculé en faisant la différence du Ct du gène cible avec le Ct de la *Hprt* ($Ct \text{ cible} - Ct \text{ Hprt}$). Cette méthode de quantification relative permet de normaliser les variations d'expression des gènes cibles en fonction du niveau d'expression du gène de référence, éliminant ainsi des biais liés à des variations expérimentales entre les échantillons telles que l'efficacité de la synthèse des ADNc. Les moyennes des valeurs $-\Delta Ct$, obtenues pour chaque groupe expérimental, ont été comparées par une analyse de variance (ANOVA), suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux à l'aide du test de Tukey.

Transcrit murin	Amorces sens (5'- 3')	Amorces anti-sens (5'- 3')
<i>mHprt</i>	CTGGTTAAGCAGTACAGCCCCAA	CGAGAGGTCCTTTTCACCAGC
<i>mHamp1</i>	AAGCAGGGCAGACATTGCGAT	CAGGATGTGGCTCTAGGCTATGT
<i>mIld1</i>	ACCCTGAACGGCGAGATCA	TCGTCGGCTGGAACACATG
<i>mSmad7</i>	GCAGGCTGTCCAGATGCTGT	GATCCCCAGGCTCCAGAAGA
<i>mF2r11</i>	TGCTGGGAGGTATCACCCCTT	AGGCTGGGTTTCTAATCTGCC
<i>mErfe</i>	TGGCATTGTCCAAGAAGACA	ATGGGGCTGGAGAACAGC
<i>mCcr2</i>	GCTGTGTTTGCCCTCTCTACCAG	CAAGTAGAGGCAGGATCAGGCT
<i>mCcl2</i>	GAGCATCCACGTGTTGGCT	GGTGAATGAGTAGCAGCAGGTG
<i>mCx3cr1</i>	GAGCATCACTGACATCTACCTCC	AGAAGGCAGTCGTGAGCTTGCA
<i>mSocs3</i>	TTAAATGCCCTCTGTCCCAGG	TGTTTGGCTCCTTGTGTGCC
<i>mSaa3</i>	ACCTTCCAGGATGAGGACATGAG	CATCCCATGAGTCACAGAGGATG
<i>mS100a9</i>	TGGTGGAAAGCACAGTTGGCAAC	CAGCATCATACACTCCTCAAAGC
<i>mF4/80</i>	AAGGACACGAGGTTGACC	GCCAATCTGGAAAATGCC
<i>mTimd4</i>	AGAATGTGCGCTTGGAGCTGAG	GGTTGGGAGAACAGATGTGGTC
<i>mBmp6</i>	ATGGCAGGACTGGATCATTGC	CCATCACAGTAGTTGGCAGCGT
<i>mTfr1</i>	CACGAGCGGAATACAGCCA	CCCATGACGTTGAATTGAACCT
<i>mLy6C</i>	CCCTACTGTGTGCAGGAAGAGC	CACTCCATAGCACTCGTAGCACTG
<i>mCd11b</i>	CTACCCATCTGGCTTATCTTACCG	GCAGGCTTTACAAACCAAGGC
<i>mIl6</i>	CGTGGTTGTCACCAGCATCA	CTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGT
<i>mTnfa</i>	AATGGCCTCCCTCTCATCAG	GCTACGACGTGGGCTACAGG
<i>mIl1β</i>	CGAGCAGGATGAAGCCTTCC	GGCTGTCAACTCCAGGATCA
<i>mTmprss6</i>	TCTGTGCTGGCTACCGCAAG	CAGAGTCACCCTGGCAGGC

Tableau 2 : listes des séquences d'amorces utilisées pour la PCRq

2. Cytométrie en flux

1. Principe général et anticorps utilisés pour l'ensemble des expériences de cytométrie

L'objectif des analyses de cytométrie en flux est d'étudier le pourcentage de différentes populations cellulaires dans la rate, la MO et le foie. Pour cela, les organes sont prélevés et les cellules dissociées selon les méthodes décrites précédemment. Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps couplés à un fluorochrome, permettant la détection d'antigènes spécifiques de chaque population cellulaire étudiée. Après leur marquage, les cellules en suspension, passent une à une devant

un faisceau laser au cytomètre Fortessa X20 (**BD Biosciences**). Chaque cellule ayant fixé un anticorps fluorescent est illuminée par le laser, et les propriétés de la lumière diffusée et émise (fluorescence) sont mesurées par des détecteurs. Cela permet ainsi de déterminer des paramètres tels que la taille, la granulosité et l'expression de molécules spécifiques marquées par les fluorochromes.

L'ensemble des anticorps, ainsi que les concentrations utilisées pour les expériences de cytométrie sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**).

Expérience	Cellules ciblées exprimant l'antigène	Anticorps / fluorochrome	Concentration	Référence
Toutes les expériences	Toutes les cellules présentes	Anti-CD16/CD32	1/100	553142 BD Biosciences
Etude des cellules érythroïdes dans la rate et la MO	Neutrophiles	Anti-Ly6G / APC	1/200	560599 BD Biosciences
	Cellules dendritiques	Anti-CD11c / APC	1/200	561119, BD Biosciences
	Lymphocytes T	Anti-CD3 / APC	1/200	565643, BD Biosciences
	Cellules myéloïdes	Anti-CD11b / APC	1/200	553312, BD Biosciences
	Sous-population LT	Anti-CD49b / APC	1/200	560628, BD Biosciences
	Lymphocytes B	Anti-CD19 / APC	1/200	550992, BD Biosciences
	Cellules érythroïdes	Anti-TER119 / BUV395	1/75	553673, BD Biosciences
	Cellules érythroïdes	Anti-CD44 / PE-Cy7	1/200	560599, BD Biosciences
Etude des NPC du foie	Cellules apoptotiques	Zombie NIR / APC-Cy7	1/3000	130-130-404, Miltenyi
	Lymphocytes T	Anti-CD3 / PE-Cy7	1/100	130-116-494, Miltenyi
	Lymphocytes B	Anti-CD19 / PE-Cy7	1/100	130-112-037, Miltenyi
	Natural-Killer	Anti-NK1.1 / PE-Cy7	1/100	130-120-509, Miltenyi
	Cellules hématopoïétiques	Anti CD45 / FITC	1/200	BLE103108, Ozyme
	Cellules endothéliales	Anti-CD31 / BUV 395	1/100	740231, BD Biosciences
	Neutrophiles	Anti-Ly6G / PE	1/100	130-123-780, Miltenyi
	Cellules myéloïdes	Anti-CD11b / BV421	1/200	130-113-810, Miltenyi
	Monocytes (et certains macrophages)	Anti-Ly6C / APC	1/50	130-111-917, Miltenyi
	Macrophages	Anti-F4/80 /Pe- TexRed	1/100	565613, BD Biosciences
	Cellules de Kupffer	Anti-TIM-4 / BV711	1/200	745509, BD Biosciences

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux

2. Analyse de la différenciation érythroïde dans la moelle osseuse et la rate

a. Marquage des cellules

Le principe de cette expérience est de réaliser un marquage avec des anticorps pour quantifier le pourcentage des différents progéniteurs érythroïdes par cytométrie en flux afin d'analyser la différenciation de ces cellules. Pour réaliser ce marquage, les cellules en suspension dans un tampon PBS-SVF 5% issues de la rate et de la moelle osseuse ont été passées à travers un tamis de 70 µm. Les cellules ont été ensuite centrifugées à 300g pendant 5min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été re-suspendues dans du PBS-SVF 5% pour être comptées avec le compteur de cellule. Les marquages ont été réalisés dans des puits de plaque 96 puits à fond conique dans lesquels 2 millions de cellules /puits ont été déposées. Les sites de fixation non spécifiques (récepteur Fc) des anticorps sont saturés en utilisant un anticorps de blocage CD16/CD32 (553142, **BD Biosciences**) dilué au 1/100, pendant 15min à 4°C dans un volume de 100µL. Après centrifugation, les culots cellulaires sont incubés avec 50µL d'un mélange d'anticorps « linéage » (un mélange d'Ac qui cible toutes les cellules myéloïdes et lymphoïdes à éliminer de l'analyse) ; TER119 et CD44, dont les dilutions sont indiquées dans le **Tableau 3**, dans du PBS-SVF 5% pendant 10min à 4°C. Des mono-marquages sont également réalisés avec chaque anticorps dans le but de déterminer des seuils de positivité et d'éliminer le bruit de fond mais aussi pour établir des compensations mathématiques des signaux fluorescents pour corriger le chevauchement spectral entre les différents canaux de détection des fluorochromes utilisés dans l'analyse. Les cellules marquées sont ensuite analysées avec le cytomètre où 250 000 cellules sont comptées pour chaque échantillon.

b. Stratégie d'analyse

Les différentes populations de cellules érythroïdes sont analysées (logiciel FlowJo version 10.8.1) à l'aide d'une stratégie de sélection basée sur la taille FSC (Forward Scatter), la granulosité SSC (Side Scatter), ainsi que la fluorescence émise par les fluorochromes des anticorps fixés sur les différents antigènes ciblés (**Figure 19**). Les cellules myéloïdes et lymphoïdes sont exclues de l'analyse en identifiant les

cellules négatives pour les marqueurs de linéage (LIN-). Parmi ces cellules, les cellules érythroïdes sont alors isolées en sélectionnant celles qui sont positives pour TER119 (TER119+). Enfin, les différentes populations érythroïdes (I : pro-érythroblastes, II : basophiles, III : polychromatiques, IV : orthochromatiques et V : réticulocytes) sont déterminées en fonction de l'expression du marqueur CD44 et de la taille des cellules (FSC). La stratégie de sélection informatique ou « stratégie de gating » est résumée dans la **Figure 19** qui suit.

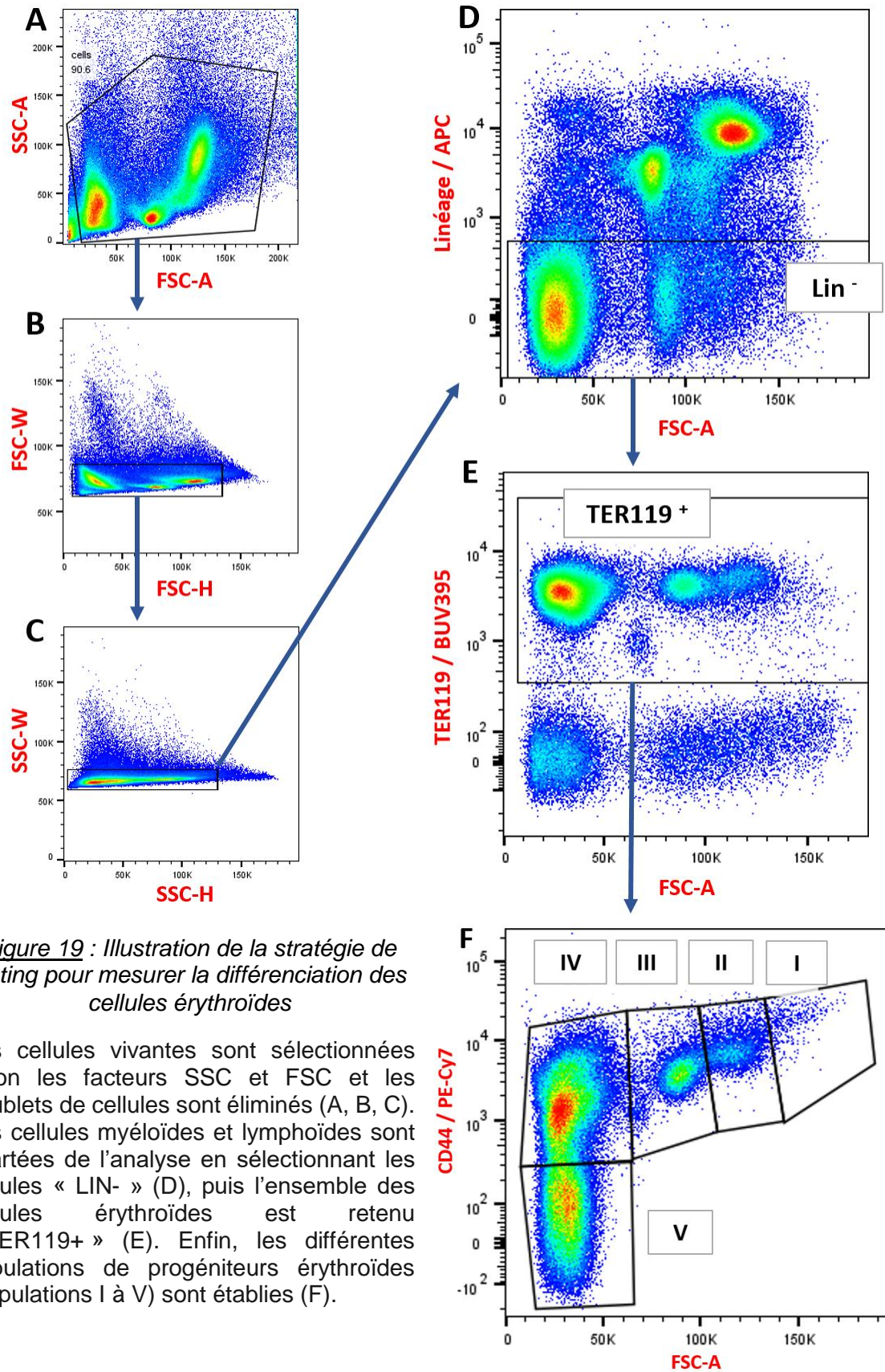


Figure 19 : Illustration de la stratégie de gating pour mesurer la différenciation des cellules érythroïdes

Les cellules vivantes sont sélectionnées selon les facteurs SSC et FSC et les doublets de cellules sont éliminés (A, B, C). Les cellules myéloïdes et lymphoïdes sont écartées de l'analyse en sélectionnant les cellules « LIN- » (D), puis l'ensemble des cellules érythroïdes est retenu « TER119+ » (E). Enfin, les différentes populations de progéniteurs érythroïdes (populations I à V) sont établies (F).

3. Etude quantitative des cellules non-parenchymateuses du foie

Marquage des cellules

Pour le marquage par cytométrie en flux des NPC, les cellules sont isolées du foie selon le protocole décrit précédemment dans ce chapitre de méthodologie (partie II/D). Elles sont ensuite comptées avec un compteur de cellules. Environ 1 million de NPC sont répartis par puits dans une plaque 96 puits à fond conique. Après centrifugation à 300g et élimination du surnageant, les cellules sont reprises dans un tampon de marquage PBS (0.5% sérum de souris ; 2mM EDTA) et incubées avec l'anticorps CD16/CD32 pour bloquer les sites non spécifiques, pendant 15min à 4°C. Après centrifugation à 300g et élimination du surnageant, les cellules sont alors traitées avec une solution de PBS (sans sérum ; 2mM EDTA) contenant le marqueur de viabilité Zombie NIR (130-130-404, **Miltenyi**) (sauf pour les puits des mono-marquage) pendant 10min à TA et à l'abri de la lumière. Il s'en suit une nouvelle étape de centrifugation à 300g et d'élimination du surnageant puis les culots cellulaires sont repris dans 50µL du tampon de marquage contenant les anticorps utilisés avec les concentrations appropriées (**Tableau 3**) pour les différents marquages (mono-marquage et mélange d'anticorps pour les multi-marquages des échantillons d'intérêt), pendant 10min à 4°C. Les cellules sont lavées puis centrifugées une dernière fois à 300g avant d'être reprises dans le tampon de marquage pour être analysées au cytomètre où environ 200 000 cellules seront analysées.

Stratégie d'analyse

Cette technique a entièrement été développée lors de ma thèse et a donc constitué une partie importante de mon projet. Pour cette raison, la stratégie d'analyse des NPC est décrite dans les résultats de ce manuscrit portant sur l'étude de l'infiltration des macrophages transitoires en réponse aux phlébotomies (**Figure 28**).

3. Quantification protéique par Western Blot

Pour la détection et l'identification des protéines par Western Blot, environ 20 mg de foie, conservé à -80°C, sont broyés à l'aide d'un broyeur Fast prep-24 (**Biomedicals**) à 4m/s pendant 15s dans un tampon PEB (Protein Extraction Buffer : 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, pH8) contenant des inhibiteurs de protéases (11836153001, **Roche**) et de phosphatases (P5726, **Sigma-Aldrich**). Puis, les échantillons sont incubés sur glace pendant 10min pour optimiser la lyse et les homogénats sont centrifugés 15min à 20 000rpm, à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubilisées est alors utilisé pour doser les protéines totales, par la méthode de BCA (DC protein Assay) (**Biorad**).

Les échantillons de protéines sont préparés à une concentration de 2 µg/µl dans du tampon Laemmli 1X (S3401, **Sigma-Aldrich**) puis chauffés à 95°C pendant 5min sous agitation dans un ThermoMixer pour dénaturer les protéines. 20µg de protéines par puits sont déposés en gel de polyacrylamide. L'électrophorèse SDS-PAGE permet alors la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire à travers le gel, dans un tampon de migration TGS (Tris/glycine/SDS, EU0510, **Euromedex**) elle est initiée à 50V (Volt) pour que les échantillons traversent un gel de concentration (5% de polyacrylamide) puis continuée à 150V jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel de séparation (12% de polyacrylamide). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose de 45µm par transfert liquide (Tampon de transfert EU0550, **Euromedex**, 20% Ethanol) à 80V pendant 1h30. Après 1h de saturation des sites non spécifiques de la membrane dans du tampon de blocage (PBS 1X ; 0,2 % de Tween 20 ; 5 % de lait), les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire de lapin P-STAT3 (16640, **Cell signaling**), dilué au 1/2000 dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées et incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire anti-lapin (7074S ; **Cell signaling**) dilué au 1/10 000, couplé à une peroxydase. L'ajout d'un substrat ECL (GERPN2232, **Merck**) permet alors de détecter l'activité peroxydase, par émission de chimiluminescence, si l'anticorps secondaire s'est fixé sur l'anticorps primaire, lui-même fixé à la protéine d'intérêt. L'acquisition de la chimiluminescence présente sur la membrane est réalisée à l'aide d'un lecteur ChemiDoc (**Bio-Rad**). Pour mesurer la quantité totale de protéine

STAT3, l'anticorps anti P-STAT3 a ensuite été dés-hybridé, en utilisant un tampon de dés-hybridation (46430, **ThermoFisher**). Puis les membranes ont à nouveau été incubées avec l'anticorps de lapin anti-STAT3 (9145 ; **Cell signaling**) dilué au 1/2000. La même procédure décrite précédemment a alors été appliquée en incubant les membranes avec le même anticorps secondaire anti lapin suivi d'une acquisition du signal avec le ChemiDoc.

4. Dosage de fer

1. Dosage du contenu en fer sérique

Le dosage du fer sérique a été réalisé selon une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation d'un kit mesurant la capacité latente de fixation (CLF) du fer (97408, **Biolabo**). Pour récupérer le sérum, les prélèvements sanguins ont été effectués comme décrit dans la section « mise à mort des animaux et prélèvement des échantillons biologique ».

Une quantité connue de fer ferrique (Fe^{3+}), suffisante pour saturer tous les sites de fixation de la transferrine, a été ajoutée aux échantillons de sérum pour déterminer la CLF. Le dosage du fer non fixé à la transferrine a ainsi été effectué en ajoutant un réactif chromogène au fer (contenant de la férène) à un volume de sérum. Après incubation de 3 min à TA, l'absorbance du complexe formé a été mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La diminution de l'absorbance du complexe, mesurée à 600 nm, est proportionnelle à la quantité de sites de liaison du fer disponibles sur la transferrine. La saturation de la transferrine a été déduite des valeurs de fer sérique et de capacité latente de fixation du fer.

Les résultats ont été exprimés en $\mu g/dL$ de sérum, et chaque échantillon a été dosé en triplicat pour assurer la fiabilité des données.

2. Dosage du contenu en fer hépatique

Pour ce faire, les échantillons de foie conservés à -80°C, préalablement broyés au Fastprep-24 pendant 30 sec à 6m/s avec des billes de céramique, ont été incubés à 65°C dans un mélange contenant 30% d'acide chlorhydrique (T9159100G, **Sigma-Aldrich**) et 10% d'acide trichloracétique (T6399, **Sigma-Aldrich**) pendant 20 heures pour permettre la lyse complète des complexes fer-ferritine. Après incubation, les extraits acides ont été centrifugés à 2500 rpm pour isoler le surnageant. Le dosage du fer a été effectué en mélangeant les lysats avec une solution du réactif chromogène contenant 0.1% de bathophenanthroline sulfonate (B1375,135, **Sigma-Aldrich**) et 1% d'acide thyoglycolique (T3758, **Sigma-Aldrich**). Cette étape permet la réduction des ions ferriques (Fe^{3+}) à l'état ferreux (Fe^{2+}). Les ions ferreux, alors chélatés par la batophénanthroline sulfonée, développent une coloration rose (DO : 535nm) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en fer. La concentration est donc déterminée en mesurant l'absorbance de la coloration rose à 535nm avec un lecteur varioskan (**ThermoFisher**).

Les résultats ont été quantifiés en comparant les valeurs obtenues à une courbe standard préparée avec des solutions de fer dont la concentration est connue. Les mesures, exprimées en μg de fer/g de tissu frais, ont été réalisées en triplicat pour assurer la fiabilité des résultats.

IV. Analyses statistiques

Pour l'analyse statistique des données, le logiciel GraphPad Prism (version 10.1.2, GraphPad Software) a été utilisé. GraphPad Prism a été choisi en raison de ses capacités robustes en matière de visualisation de données et de ses fonctionnalités complètes pour réaliser des tests statistiques variés. Les données expérimentales ont été présentées sous forme de moyennes \pm écart type (SD).

Des tests statistiques appropriés ont été appliqués en fonction de la nature des données et des hypothèses de l'étude. Pour comparer deux groupes, un test t de Student à deux échantillons indépendants ou appariés a été utilisé, selon le contexte de l'expérience. Pour les comparaisons multiples entre plus de deux groupes, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur ou à deux facteurs a été réalisée avec des tests de Brown-Forsythe et Welch, suivie par des tests de comparaisons multiples (Sidak). Le niveau de significativité statistique a été fixé à $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été réalisées conformément aux normes établies pour garantir la rigueur scientifique et l'intégrité des résultats obtenus.

RESULTATS

Partie I : Exploration du rôle du récepteur PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine

I. Introduction, enjeux et hypothèses de recherche

La régulation de l'hepcidine est un processus qui dépend de divers paramètres tels que le statut en fer dans l'organisme, l'inflammation, ainsi que l'activité érythropoïétique. Dans cette dernière condition, l'hepcidine est réprimée afin d'augmenter la disponibilité du fer circulant et de fournir aux progéniteurs des globules rouges une quantité suffisante pour la synthèse de l'hémoglobine. Bien que certains mécanismes aient déjà été décrits, les données de la littérature suggèrent que d'autres acteurs pourraient exercer un pouvoir répresseur sur l'expression de l'hepcidine dans un contexte de stress érythropoïétique.

Les enjeux entourant l'étude de la régulation de l'hepcidine sont majeurs, car la découverte de nouveaux régulateurs pourrait considérablement améliorer la qualité de vie des patients souffrant de maladies associées à une dérégulation du métabolisme du fer. Pour être plus précis, prenons le cas de certaines pathologies comme la β -thalassémie. Dans cette maladie, la mise en évidence de régulateurs pouvant être ciblés pour augmenter les taux systémiques d'hepcidine pourrait s'avérer utile pour traiter cette pathologie dans laquelle l'anémie chronique entraîne une surcharge en fer secondaire, extrêmement délétère pour les malades. Ainsi, la régulation hépatique de l'hepcidine doit rester un axe important de la recherche dans le domaine biomédical.

Dans cette première partie de résultats, nous mettons en évidence un nouvel acteur de la régulation de l'hepcidine, le récepteur PAR₂, une protéine impliquée dans

diverses fonctions physiopathologiques et dont le rôle dans la régulation du métabolisme du fer n'a jamais été décrit jusqu'à présent.

Sur la base de résultats préliminaires obtenus au laboratoire, nous avons formulé l'hypothèse que le récepteur PAR₂ pourrait avoir une action inhibitrice sur l'hepcidine. Pour tester cette hypothèse, nous avons exploré la régulation de l'hepcidine dépendante de PAR₂ en réponse à l'anémie provoquée par différents stimuli, notamment par des phlébotomies, une méthode consistant à enlever un volume précis de sang aux souris.

Dans ce contexte, nous avons d'abord mené ces expériences sur un modèle murin PAR₂ KO (*F2r11*^{-/-}). Les résultats, compilés dans la partie B de cette section, indiquent que ce récepteur participe à la régulation négative de l'hepcidine dans un contexte spécifique de stress érythropoïétique induit par les phlébotomies. De plus, nous avons également étudié le rôle de PAR₂ dans un modèle où le récepteur est spécifiquement supprimé dans les macrophages (*F2r11*^{LysM}). Nos résultats ont mis en évidence l'importance du récepteur PAR₂ depuis son expression dans les macrophages, sur la fonction de régulation de l'hepcidine. En outre, ces données ont ouvert la voie à l'étude du rôle des macrophages dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine, ce qui a constitué une partie majeure de ces travaux de thèse.

II. Résultats : Effet d'une délétion totale du gène du récepteur PAR₂ sur la régulation de l'hepcidine

1. Les embryons PAR₂ déficients sont anémiques et surexpriment l'hepcidine

En collaboration avec l'équipe du Dr Éric Camerer, nous avons commencé à travailler sur les souris *F2r11*^{-/-} (PAR₂ KO). Nous avons alors observé une augmentation de la létalité embryonnaire dans les souris *F2r11*^{-/-} par rapport à leurs homologues littermates *F2r11*^{+/+} du même âge. De plus, à la naissance, certains souriceaux *F2r11*^{-/-} présentaient une pâleur marquée de la peau, indiquant que ces derniers souffraient d'anémie. Ainsi, nous avons étudié *in utero* les souriceaux *F2r11*^{-/-}

. Les mères gestantes ont été sacrifiées au jour embryonnaire E15,5 du développement et différentes analyses ont été réalisées sur les fœtus. Comme en témoigne la photographie, certains embryons *F2r1*^{-/-} étaient nettement plus pâles que leurs homologues WT (**Figure 20A**). Par ailleurs, le nombre de transcrits codant pour l'hépcidine étaient significativement plus élevés dans le foie des souris *F2r1*^{-/-} (**Figure 20B**) comparativement aux WT.

En prenant en compte ces éléments, nous avons émis l'hypothèse que certains embryons PAR₂ KO souffrent d'une anémie induite par la surexpression du gène *Hamp1* dans leur foie fœtal. Au regard de ce phénotype, nous avons ensuite questionné l'effet d'une délétion de PAR₂ chez l'adulte. Les résultats obtenus sont compilés dans la partie suivante.

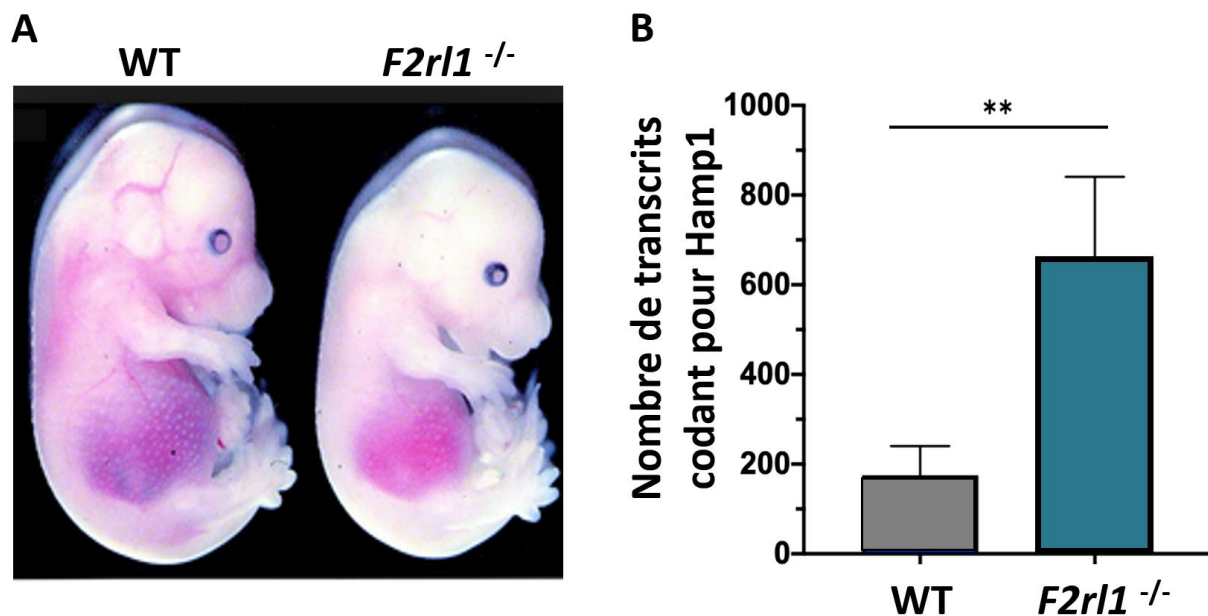


Figure 20 : Les embryons *F2r1*^{-/-} sont pâles et surexpriment le gène *Hamp1* dans le foie.

(A) Photographies d'embryons WT et *F2r1*^{-/-} collectés à E15.5(B) Analyse transcriptionnelle de l'ARNm de *Hamp1* dans le foie des embryons. Les moyennes du nombre de transcrits des souris WT et *F2r1*^{-/-} ont été comparées et analysées par un test t de student. [** : p<0.005]

2. En condition physiologique, les souris PAR₂ KO adultes ne présentent pas d'anomalie de l'expression de l'hepcidine par rapport aux WT

Le phénotype des souris PAR₂ KO adultes a été étudié sur des individus mâles âgés de 10 à 12 semaines et comparé au phénotype des souris WT littermate du même âge. Les paramètres hématologiques étaient normaux car nous n'avons pas observé de diminution du nombre de globules rouges, ni de la concentration en hémoglobine, par rapport aux souris WT (**Figure 21A et B**). Ces données démontrent que les souris PAR₂KO adultes ne sont pas anémiques. De plus, le poids corporel des souris, qui peut être utilisé comme un marqueur de l'état de santé, était également identique entre les deux groupes de souris (**Figure 21C**). Enfin, aucune différence entre les niveaux d'expression de l'hepcidine hépatique n'a été mise en évidence entre les deux groupes de souris (**Figure 21D**).

Collectivement, ces données indiquent qu'à l'âge adulte, le récepteur PAR₂ ne semble pas être impliqué dans le contrôle de l'expression de l'hormone hépatique en condition physiologique.

Pour approfondir notre compréhension du rôle potentiel de PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine pendant la période embryonnaire mais pas à l'âge adulte, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle PAR₂ pourrait exercer une fonction inhibitrice dans des circonstances particulières caractérisées par une activité érythropoïétique accrue. En effet, la croissance fœtale est un processus au cours duquel la prolifération élevée des cellules requiert un afflux sanguin important et par conséquent, une augmentation de l'activité érythropoïétique. Dans les parties suivantes, nous avons donc questionné le rôle de PAR₂ dans des conditions où l'érythropoïèse est stimulée afin de déterminer si ce dernier est impliqué dans la régulation de l'hepcidine en réponse à l'anémie.

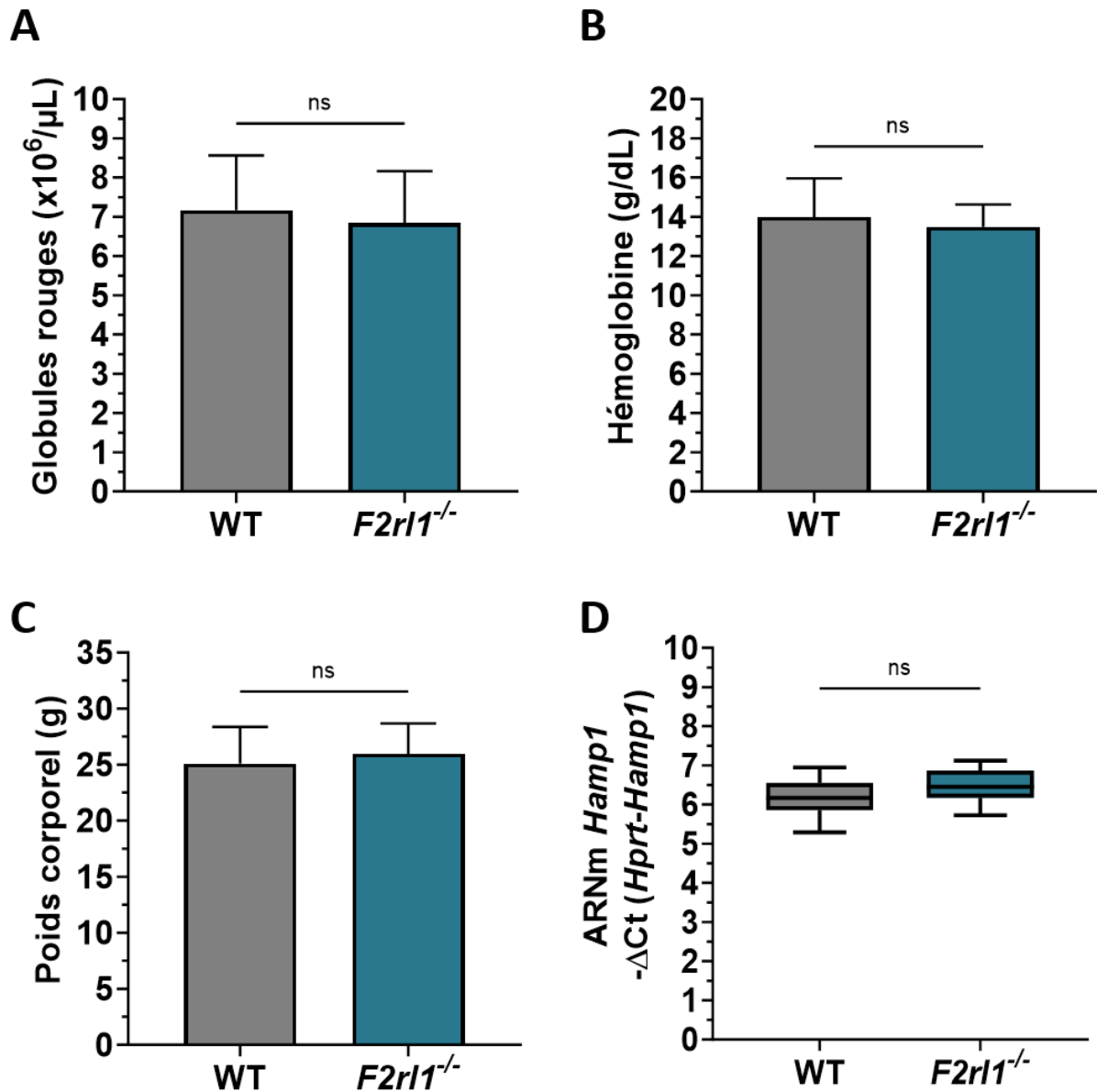


Figure 21 : Les souris *F2r11*^{-/-} ne sont pas anémiques et présentent des taux normaux d'hepcidine

(A-B) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges et taux d'hémoglobine) avec un analyseur d'hématologie. (C) Mesure du poids corporel des souris des souris âgées entre 10 et 12 semaines. (D) Analyse par PCRq de l'ARNm d'*Hamp1* dans le foie.

Les moyennes des paramètres hématologiques, du poids corporel et de $-\Delta\text{Ct}$ de PCRq des souris WT et *F2r11*^{-/-} ont été comparées et analysées par un test t de student. [Non significatif]

3. La délétion de PAR₂ chez l'adulte réduit la suppression de l'hepcidine en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie

Pour étudier la régulation négative de l'hepcidine en réponse à l'anémie induite par une perte de sang, nous avons développé un modèle basé sur deux phlébotomies successives (prélèvement mandibulaire) séparées de 24h. Nos analyses ont été ensuite effectuées 24h après le second prélèvement de sang. Ainsi les résultats qui seront décrits dans cette sous partie s'inscrivent dans une temporalité correspondant à 48h après induction du stress aux différents groupes de souris.

Tout d'abord, l'analyse des paramètres hématologiques démontre l'efficacité de ce modèle dans l'induction de l'anémie puisque le nombre de globules rouges, la concentration d'hémoglobine ou encore l'hématocrite ont été réduits significativement au temps 24h post 2nd phlébotomie (**Figure 22A, B et C**). Cette anémie était à un degré identique entre les souris PAR₂ KO et WT car nous n'avons pas observé de différences significatives pour ces différents marqueurs sanguins entre nos deux lots que ce soit dans des conditions physiologiques ou après phlébotomies.

Après validation du modèle phlébotomie, nous avons procédé à la quantification des transcrits hépatiques codant pour l'hepcidine. Comme vu précédemment, aucune différence dans les niveaux d'expression n'a été observée entre les souris *F2r11*^{-/-} et WT. En revanche, la phlébotomie a entraîné une baisse moins importante de l'hepcidine dans le groupe de souris KO par rapport aux WT (**Figure 22D**). En effet, comme attendu, l'hepcidine a bien été réprimée dans le foie des souris WT de façon très significative tandis que la diminution de l'expression de l'hepcidine des PAR₂ KO était significativement réduite. De plus, nous avons observé une tendance à la diminution de l'expression du marqueur d'activation de la voie BMP-SMAD : *id1* entre les groupes WT et WT phlébotomie ainsi qu'une diminution significative dans le groupe des PAR₂ KO après traitement (**Figure 22E**).

En conclusion, nos résultats suggèrent que la délétion de PAR₂ induit une réponse partielle du mécanisme de suppression de l'hepcidine en réponse à l'anémie induite. Le récepteur PAR₂ pourrait donc contribuer à la régulation de l'hormone hépatique dans des conditions d'anémie aiguë.

Par la suite, nous avons cherché à déterminer si la différence observée entre PAR₂ KO et WT pouvait être expliquée par une altération de l'érythropoïèse. En effet, il est aujourd'hui bien établi que les compartiments érythroïdes que sont la moelle osseuse et la rate, participent à la régulation de l'hepcidine lors d'un stress de l'érythropoïèse. L'ensemble de ces mécanismes est décrit dans le chapitre introductif. À la lumière de ces informations, il était nécessaire d'examiner un possible impact d'une délétion de PAR₂ sur le fonctionnement de l'érythropoïèse. Les résultats quant à cette question sont exposés dans la partie suivante.

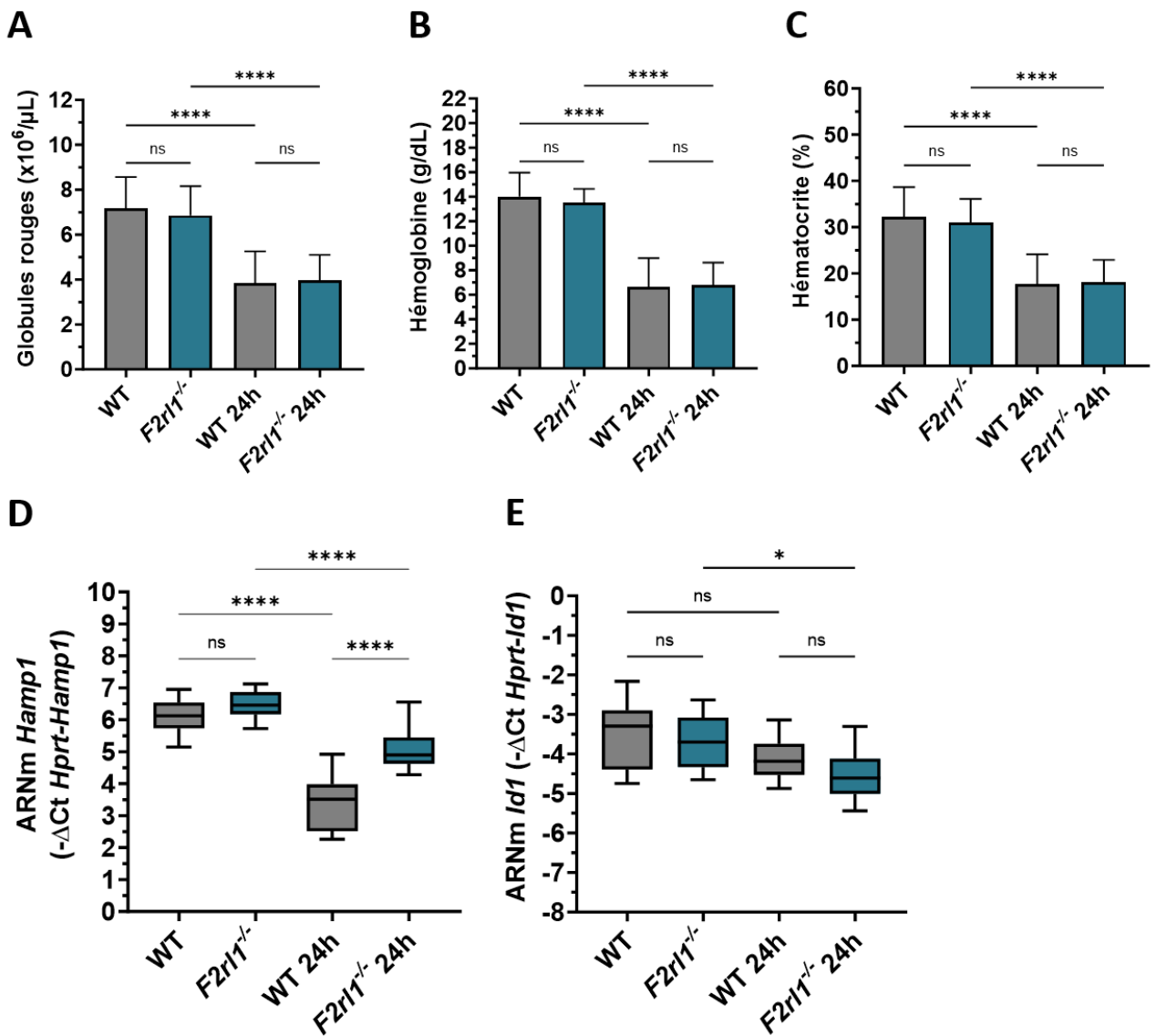


Figure 22 : Les souris PAR₂ KO ne suppriment que partiellement l'hepcidine en réponse à la phlébotomie par rapport aux souris WT

(A-C) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges, taux d'hémoglobine et hématocrite) avec un analyseur d'hématologie. (D-E) Analyse par PCRq de l'expression des ARNm de *Hamp1* et *Id1* dans le foie.

Les moyennes des valeurs des paramètres sanguins et de $-\Delta\text{Ct}$ de PCRq des souris *F2r11*^{-/-} et WT ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - **** : $p < 0.0001$]

4. La délétion de PAR₂ n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie

Comme expliqué ci-dessus, le but de ces expériences était d'évaluer l'effet de la délétion de PAR₂ sur la différenciation érythroïde des souris dans les deux compartiments érythroïdes. Pour ce faire, nous avons identifié les différents stades de la différenciation érythroïde en mesurant par cytométrie en flux l'expression des marqueurs de surface TER119 et CD44, dans la rate et la moelle osseuse. Le paramètre additionnel FSC, qui est une mesure de la taille des cellules, a été utilisé pour discriminer les cinq populations érythroïdes distinctes : (I) pro-érythroblastes, (II) basophiles, (III) polychromatiques, (IV) orthochromatiques et (V) réticulocytes. La stratégie d'analyse utilisée pour mesurer ces populations est développée dans la section méthodologie de ce manuscrit.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au pourcentage total de cellules érythroïdes dans la MO et la rate. Les résultats montrent que de façon globale, il n'y avait pas de différences majeures entre les deux groupes dans la MO ainsi que dans la rate (**Figure 23A et B**). Toutefois, il serait intéressant de mesurer cette différenciation sur une cohorte plus grande de souris afin d'atteindre un niveau de significativité plus important.

Dans un second temps, nous avons étudié les proportions des différents progéniteurs. Dans la moelle, nous n'avons pas observé de différences significatives dans les proportions des progéniteurs PAR₂ KO et WT en condition physiologique (**Figure 23C**). Notons que la variabilité des résultats et le faible nombre d'individus laisserait apparaître qu'en condition basale, les souris WT présentent une

différenciation érythroïde augmentée avec une diminution de la population V mature en faveur d'une augmentation des progéniteurs plus précoces. Toutefois, l'analyse des paramètres hématologiques démontre que ces souris ne présentent pas d'anémie. Nous nous sommes ensuite intéressés à la réponse au stress engendré par la phlébotomie. Comme attendu, nous pouvons voir que les pourcentages de progéniteurs précoces ont été augmentés de façon significative dans les deux groupes de souris et la population V, de GR matures, a été diminuée (**Figure 23C**). De plus nous n'avons pas observé de différence dans les niveaux des progéniteurs entre les groupes WT et PAR₂ KO post-phlébotomie.

Enfin, les données obtenues dans la rate décrivent les mêmes variations à la seule différence que cet organe est spécialisé dans le recyclage des GR, de ce fait, la population V de cellules matures est majoritaire (**Figure 23D**). Nous pouvons également voir que la phlébotomie a entraîné une augmentation significative des populations de précurseurs à des niveaux identiques entre WT et PAR₂ KO.

Collectivement, bien que ces expériences demandent à être reproduites un plus grand nombre de fois, ces données suggèrent que la délétion de PAR₂ n'affecte pas la production de globules rouges dans les différents compartiments érythroïdes. De plus, l'ablation du récepteur ne semble pas non plus modifier l'érythropoïèse en réponse au stress engendré par la phlébotomie.

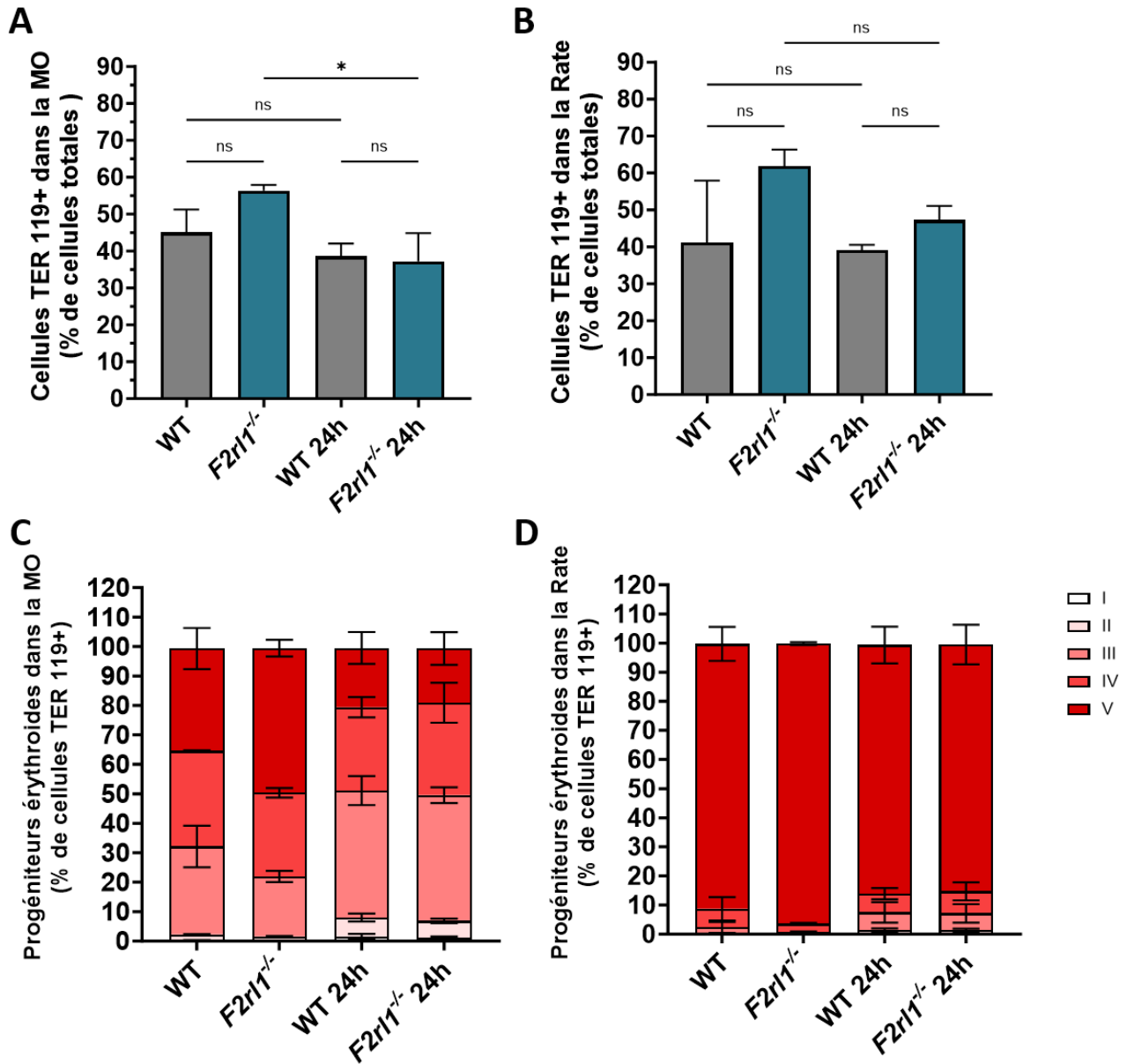


Figure 23 : La délétion de PAR_2 n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie

(A-B) Analyse par cytométrie en flux du nombre total de cellules TER119+ dans la MO et la rate de souris $F2r11^{-/-}$ et WT. (C-D) Analyse par cytométrie des 5 stades distincts de la différenciation érythroïde : (I) pro-érythroblastes (II) basophiles (III) polychromatiques (IV) orthochromatiques et (V) réticulocytes.

Les moyennes des valeurs de pourcentage des cellules TER119+ des souris $F2r11^{-/-}$ et WT ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$].

Les résultats du pourcentage des différents populations érythroïdes sont présentés sous forme de graphiques empilés avec la moyenne \pm SD de $n=3-8$ souris/groupes.

III. Résultats : Effet d'une délétion spécifique de PAR₂ dans les macrophages sur la régulation de l'hepcidine

1. Le récepteur PAR₂ n'est pas exprimé dans les hépatocytes mais plutôt dans les cellules non parenchymateuses

Nous avons voulu déterminer si PAR₂ régule directement l'hepcidine dans les hépatocytes. En effet, l'hepcidine étant majoritairement produite par les hépatocytes, il était important d'investiguer une régulation dépendante de PAR₂ depuis ces cellules. Par ailleurs, PAR₂ est un récepteur activé par des protéases, ce qui en fait un excellent candidat cible de la matriptase-2, une protéase transmembranaire des hépatocytes qui exerce un effet inhibiteur sur l'hepcidine. Ces éléments nous ont ainsi conduits à formuler l'hypothèse d'une régulation hépatocytaire.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser l'expression de PAR₂ dans le foie. Malheureusement, les difficultés rencontrées pour trouver un lot d'anticorps spécifique permettant de cibler la protéine nous ont poussés à nous appuyer sur une méthode de détection plus simple. Ainsi nous avons développé une méthode de tri et séparation des hépatocytes par rapport aux cellules non parenchymateuses pour quantifier les transcrits de PAR₂ dans ces cellules, par des approches de biologie moléculaire. Notons que cette méthode de séparation cellulaire qui est basée sur des digestions enzymatiques, est décrite en détails dans la partie méthodologie de ce manuscrit. Cette technique a été à la base de l'étude des cellules du foie de tout ce projet, nous y reviendrons. Ainsi, nous avons quantifié l'expression de PAR₂ dans les différents types cellulaires et avons observé que le récepteur n'est pas exprimé dans les hépatocytes mais plutôt dans les NPC (**Figure 24A**).

Les résultats obtenus quant à l'expression de PAR₂ dans les NPC ont soulevé deux points : le premier est que PAR₂ ne peut pas être une cible de la MT2 puisque le récepteur n'est pas être exprimé dans les hépatocytes. Le deuxième point est qu'il fallait donc trouver parmi les cellules non parenchymateuses, quel pouvait être le type cellulaire responsable de cette régulation. En se basant sur les données de la

littérature, notamment sur des travaux concernant la délétion de PAR₂ dans les cellules Lysozyme M+ (*LysM*)⁴¹, c'est-à-dire principalement les macrophages, nous avons émis l'hypothèse que les macrophages pourraient être impliqués dans la régulation de PAR₂ dépendant de l'hepcidine.

Dans ce contexte, nous avons développé un modèle dans lequel PAR₂ est spécifiquement supprimé des macrophages (souris *F2r11^{Flox}; LysM^{CRE}*). Pour cela, nous avons croisé des souris exprimant l'enzyme CRE recombinase sous le contrôle du promoteur *LysM* avec des souris dont l'exon 2 du gène *F2r11* est borné par des sites « LoxP » (**Figure 24B**). La reconnaissance des régions floxées par la CRE recombinase, permet alors par recombinaison homologue, de supprimer l'exon 2 du gène de PAR₂ dans les cellules où le gène *LysM* est actif, induisant ainsi un KO du récepteur de façon spécifique aux macrophages. Les expériences et résultats obtenus sur les souris *F2r11^{LysM}* générées par ce croisement sont décrits dans les parties suivantes.

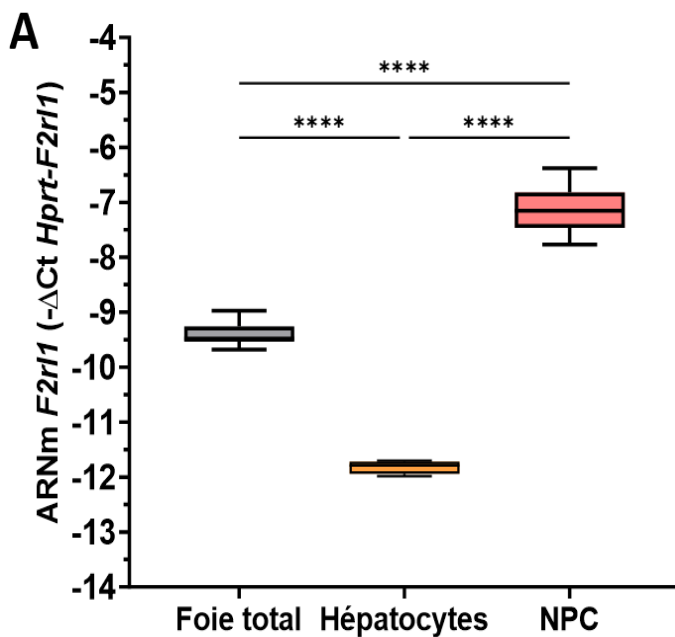
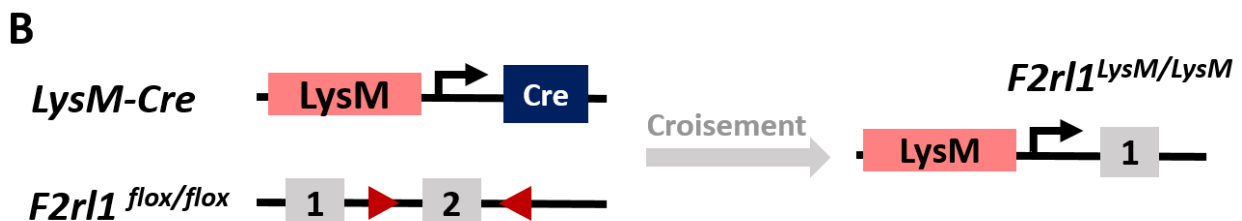


Figure 24 : Expression de PAR₂ dans le foie et développement d'un modèle de délétion dans les macrophages

(A) Analyse par PCRq de l'expression du gène de PAR₂. (B) Construction génique des souris *F2r11^{LysM}*. Les souris *LysM^{Cre}* qui expriment la Cre-Recombinase sous le contrôle du promoteur *LysM* ont été croisées avec les souris *F2r11^{flox/flox}* qui expriment des séquences LoxP bornant l'exon 2 du gène *F2r11*. Le croisement des souris conduit à la délétion de l'exon 2 et à l'inactivation de PAR₂ dans les macrophages.



2. En condition physiologique, la délétion de PAR₂ dans les macrophages n'a aucun impact sur le phénotype des souris adultes

Les souris présentant une délétion de PAR₂ dans les macrophages (*F2rl1^{LysM}*) âgées de 10 à 12 semaines ont été analysées et comparées aux littermates *F2rl1^{+/+}* du même âge. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de l'hepcidine hépatique des souris ayant une délétion de PAR₂ dans les macrophages. De façon équivalente à la cohorte de souris *F2rl1^{-/-}*, aucune différence n'a été observée entre les groupes *F2rl1^{LysM}* et WT concernant l'expression de l'hepcidine ou encore du marqueur de la voie BMP-SMAD : *Id1* (**Figure 25A et B**). De plus, les paramètres sanguins de ces souris étaient également tout à fait normaux avec des niveaux identiques en termes de nombre de globules rouges ainsi que de la concentration en hémoglobine entre les deux groupes d'animaux (**Figure 25C et D**).

Ces données démontrent que la délétion du récepteur PAR₂ spécifiquement dans tous les macrophages des souris adultes n'a pas d'effet en condition physiologique.

Comme pour les souris *F2rl1^{-/-}*, nous avons voulu effectuer les mêmes expériences après induction d'un stress érythroïde aux souris *F2rl1^{LysM}*. L'objectif était d'identifier si la régulation de l'hepcidine par PAR₂ était dépendante des macrophages, dans ce contexte précis d'anémie. Les résultats sont présentés dans la section suivante.

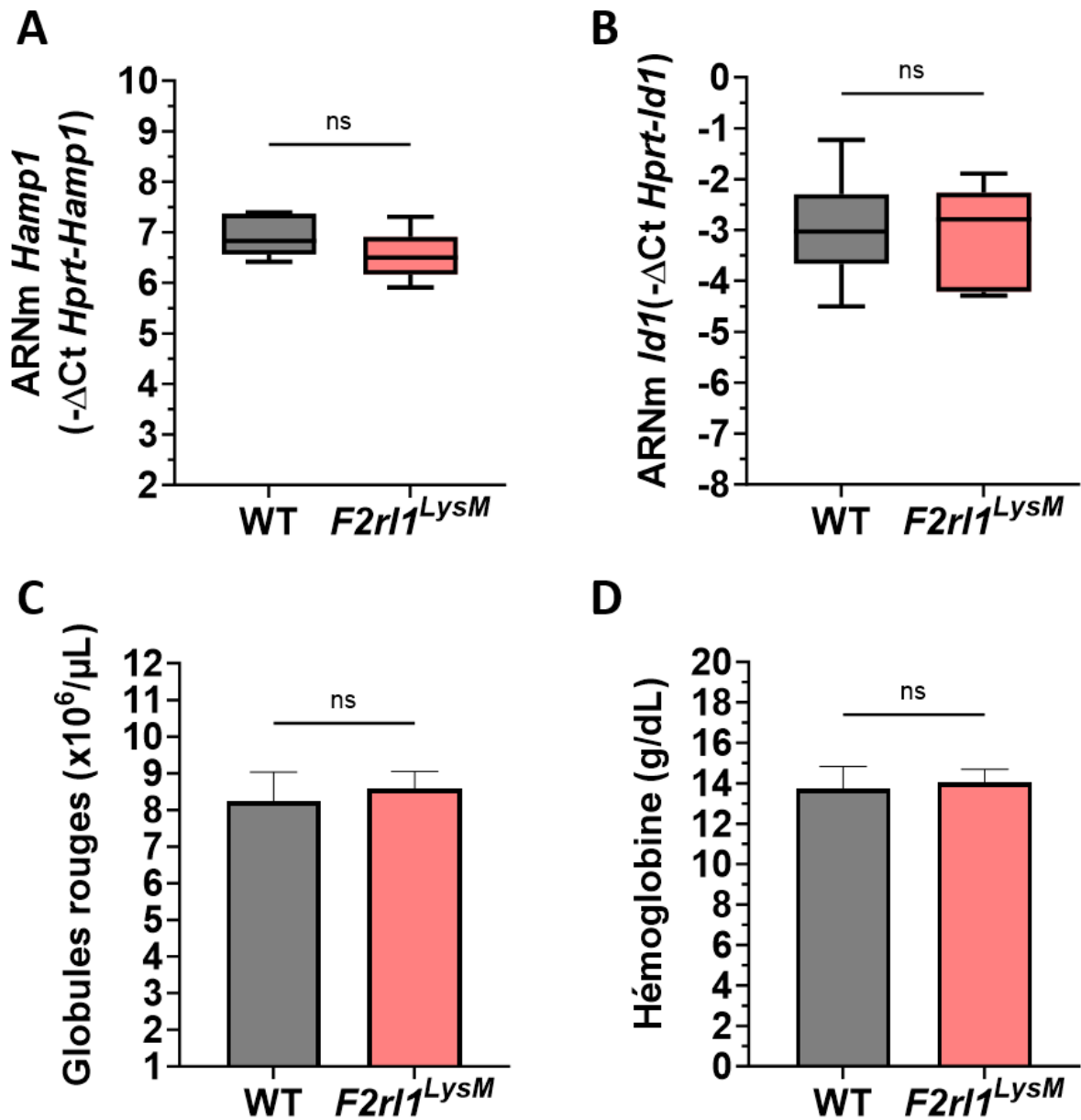


Figure 25 : La délétion de PAR_2 dans les macrophages n'a aucun impact sur le phénotype des souris adultes

(A-B) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Hamp1* et *Id1* dans le foie. (C-D) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges et taux d'hémoglobine) avec un analyseur d'hématologie.

Les moyennes de $-\Delta\text{Ct}$ de PCRq et des paramètres hématologiques des souris WT et *F2r11^{LysM}* ont été comparées et analysées par test t de student. [Non significatif]

3. Les souris *F2r11^{LysM}* récapitulent le phénotype du KO total en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie

Les souris *F2r11^{LysM}* et leurs homologues sauvages ont subi le même protocole de phlébotomie décrit précédemment (2 phlébotomies séparées de 24h, dissection 24h après la 2nd). L'ensemble de ces souris étaient âgées de 10 et 12 semaines.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux paramètres hématologiques. Dans les deux groupes de souris, la phlébotomie a entraîné une nette diminution des globules rouges, de l'hémoglobine ainsi que de l'hématocrite dans les deux groupes de souris (**Figure 26A, B et C**). Il est important de préciser qu'aucune différence significative n'a été observée entre les deux lots d'animaux dans la condition phlébotomie suggérant que l'anémie induite par ce protocole était d'un degré identique entre ces derniers.

Nous avons ensuite effectué des analyses d'expression de gènes sur les foies de ces souris. Comme attendu, nous pouvons observer que l'expression de l'hepcidine a été fortement réduite dans le foie des individus WT en réponse à la phlébotomie (**Figure 26D**). En revanche, de façon équivalente à la cohorte *F2r11^{-/-}*, la suppression de l'hepcidine des souris *F2r11^{LysM}* a été réduite. En effet, nous pouvons remarquer qu'une différence significative entre les groupes WT et KO se distingue après phlébotomies. Notons également que les niveaux d'expression des ARNm de l'hepcidine après phlébotomies étaient identiques entre les deux groupes de souris KO (**Figure 26D**). Par ailleurs, nous avons également observé une légère diminution d'*Id1* dans chaque groupe de souris après phlébotomie (**Figure 26E**).

En conclusion, la délétion de PAR₂ dans les macrophages a partiellement inhibé le mécanisme de suppression de l'hepcidine en réponse à l'anémie. Les souris *F2r11^{LysM}* récapitulent le phénotype des souris *F2r11^{-/-}* en réponse aux phlébotomies. L'ensemble de ces données suggère qu'en condition d'anémie, le récepteur PAR₂ participe à la suppression de l'hepcidine via un mécanisme dépendant des macrophages.

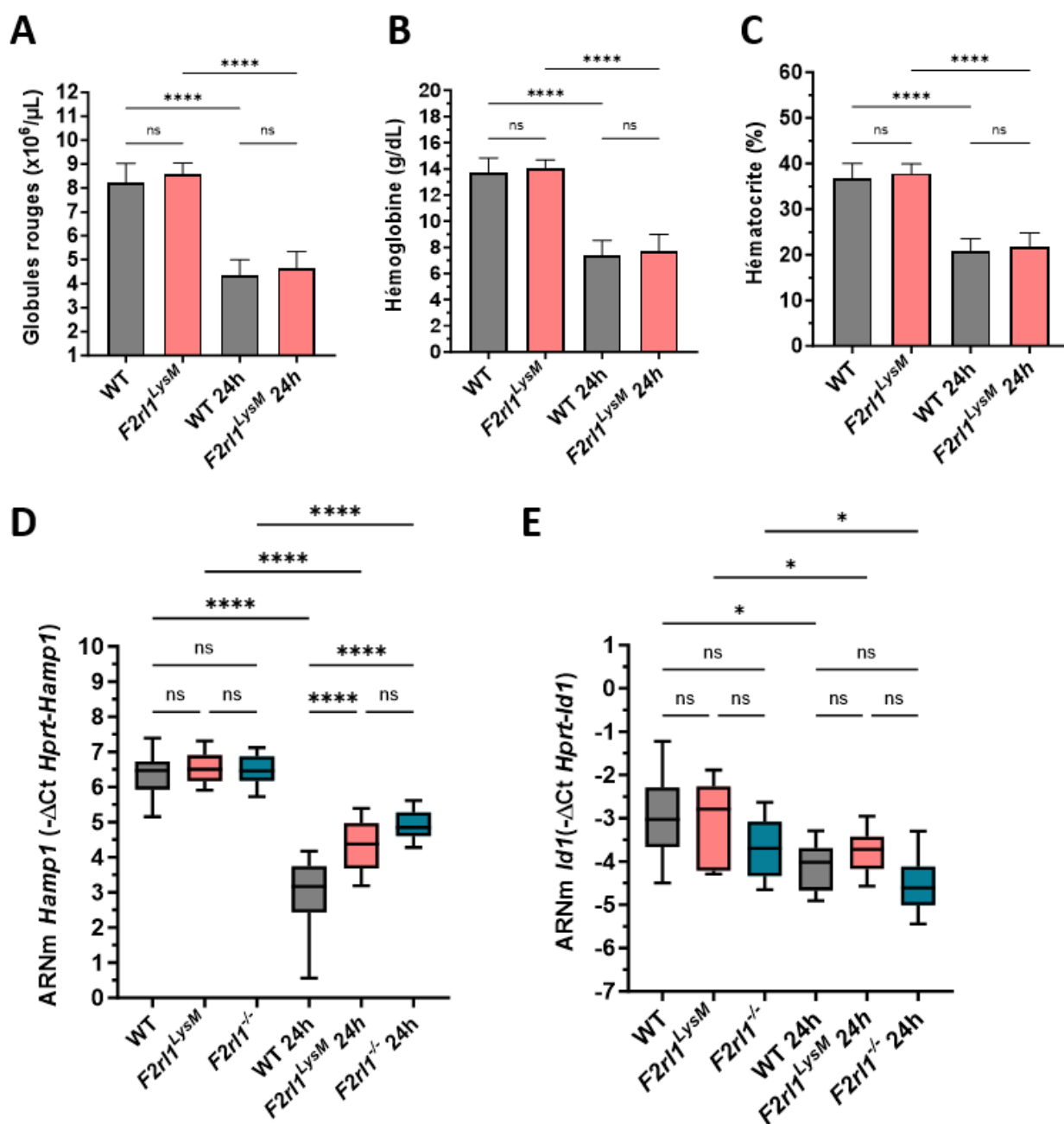


Figure 26 : Les souris $F2r11^{LysM}$ récapitulent le phénotype du KO total en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie

(A-C) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges, taux d'hémoglobine et hématocrite) avec un analyseur d'hématologie. (D-E) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Hamp1* et *Id1* dans le foie.

Les moyennes des valeurs des paramètres sanguins et de $-\Delta\text{Ct}$ de PCRq des souris $F2r11^{LysM}$, $F2r11^{-/-}$ et WT ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - **** : $p < 0.0001$]

4. La délétion de PAR₂ dans les macrophages n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie

Nous avons expliqué précédemment que les macrophages ont un rôle prépondérant au sein de la rate et la moelle osseuse lors de l'érythropoïèse. Nous avons également vu que ces compartiments érythroïdes, parallèlement à la fabrication de nouveaux globules rouges en réponse à l'anémie, peuvent induire des signaux inhibiteurs de l'hepcidine. Pour s'assurer que la différence observée dans les niveaux d'hepcidine entre souris KO et WT n'était pas liée à une altération du fonctionnement de ces macrophages lors de l'érythropoïèse, nous avons étudié la différenciation érythroïde par cytométrie en flux dans la rate et la MO des deux groupes de souris.

Dans un premier temps, nous pouvons voir que le pourcentage de cellules TER119+ dans la MO et la rate était identique entre les deux groupes, en condition physiologique et après phlébotomies (**Figure 27A et B**).

Ensuite, nous avons analysé et quantifié les différentes populations de progéniteurs érythroïdes dans les deux groupes d'animaux. Comme attendu, nous pouvons voir que la phlébotomie a bien engendré une augmentation significative des populations de progéniteurs précoces et une diminution de la population de globules rouges plus matures (population V). Ce phénomène a été observé dans la MO et dans la rate des deux lots de souris (**Figure 27C et D**). Par ailleurs, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les souris *F2r1^{LysM}* et leurs homologues WT en absence ou après traitement (**Figure 27C et D**). Enfin l'expression du gène de l'érythroferrone produite par les érythroblastes de la MO a bien été induite de manière significative dans les deux groupes de souris mais sans observer de différence dans l'amplitude de réponse (**Figure 27E**).

Collectivement, ces données suggèrent que la différence de suppression de l'hepcidine observée entre les souris WT et *F2r1^{LysM}* ne semble pas être liée à une altération de l'érythropoïèse suite à l'anémie induite par la phlébotomie.

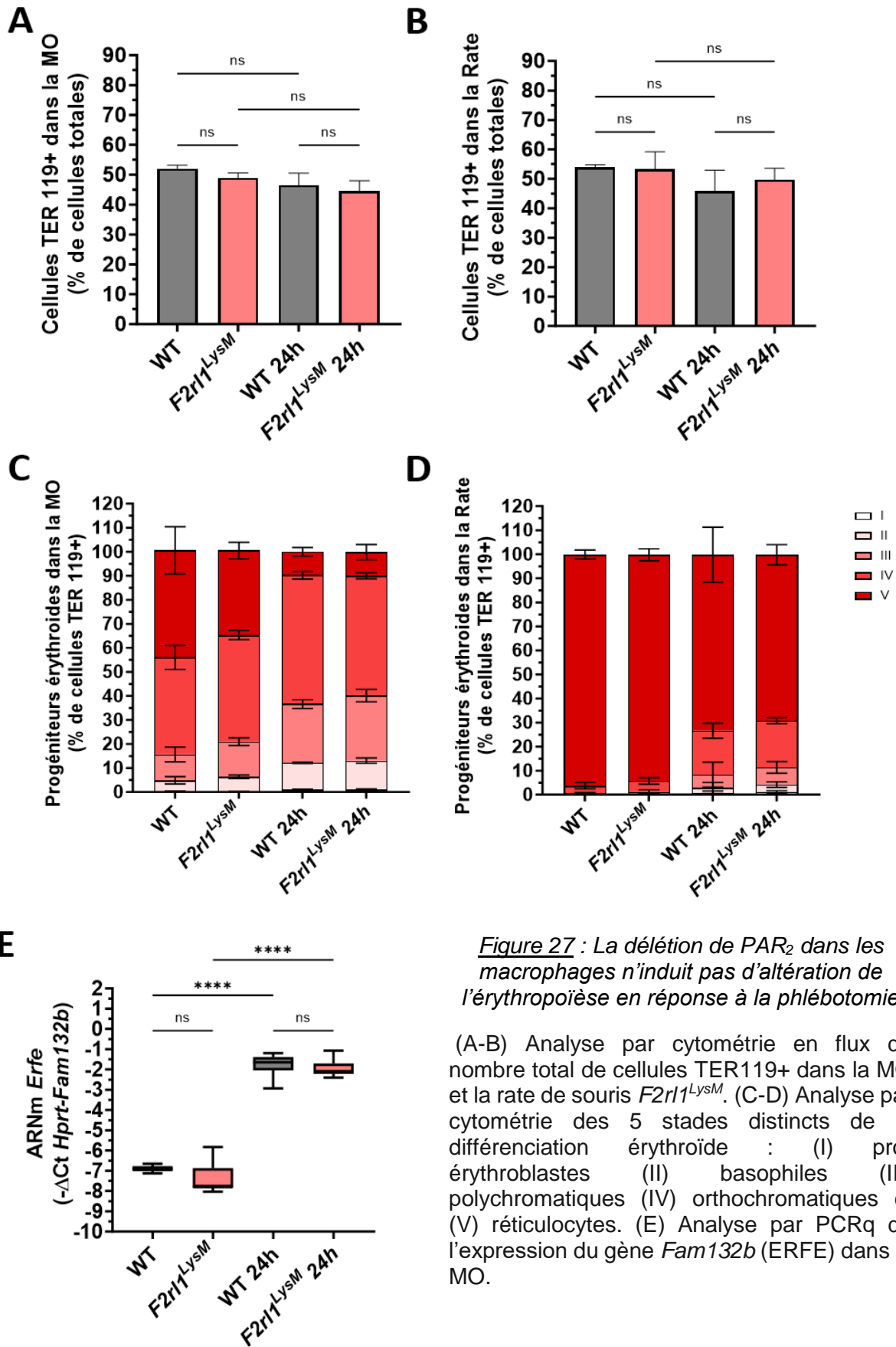


Figure 27 : La délétion de PAR₂ dans les macrophages n'induit pas d'altération de l'érythropoïèse en réponse à la phlébotomie

(A-B) Analyse par cytométrie en flux du nombre total de cellules TER119+ dans la MO et la rate de souris *F2r11^{LysM}*. (C-D) Analyse par cytométrie des 5 stades distincts de la différenciation érythroïde : (I) pro-érythroblastes (II) basophiles (III) polychromatiques (IV) orthochromatiques et (V) réticulocytes. (E) Analyse par PCRq de l'expression du gène *Fam132b* (ERFE) dans la MO.

Les moyennes des pourcentages des cellules TER119+ et de $-\Delta Ct$ de PCRq des souris *F2r11^{LysM}* et WT ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [**** : $p < 0.0001$]. Les résultats du pourcentage des différentes populations érythroïdes sont présentés sous forme de graphiques empilés avec la moyenne \pm SD de n=3-6 souris/groupes.

IV. Conclusion

Cette étude visait à évaluer si le récepteur PAR₂ est impliqué dans la régulation du métabolisme du fer. Basé sur des observations faites sur des embryons *F2r11^{-/-}* qui surexpriment l'hepcidine, nous avons émis l'hypothèse que le récepteur activé par les protéases est impliqué dans la régulation négative de l'hormone hépatique. Nous avons alors étudié cette hypothèse sur des souris adultes mais n'avons pas pu confirmer d'effet du récepteur dans des conditions d'équilibres homéostatiques. Nous avons donc bousculé cet équilibre en appliquant un protocole visant à rendre les individus anémiques et ainsi observer s'il existait une régulation PAR₂ dépendante de l'hepcidine en condition physiopathologique qui requiert la production de nouveaux globules rouges.

Dans ce contexte nous avons démontré que l'anémie induite par phlébotomies provoque une diminution de l'hepcidine par un mécanisme en partie dépendant du récepteur PAR₂. Nous avons alors montré, via l'utilisation du modèle murin *F2r11^{LysM}*, que ce mécanisme d'inhibition de l'hepcidine dans lequel PAR₂ est impliqué dépend de son expression dans les macrophages.

En conclusion de cette section, l'ensemble de nos résultats démontre qu'en condition de stress érythroïde induit par la phlébotomie, les macrophages sont impliqués dans la production de signaux inhibiteurs de l'hepcidine par un mécanisme en partie dépendant du récepteur PAR₂.

Partie 2 : Etude de l'impact de l'anémie induite par la phlébotomie sur les populations de macrophages hépatiques

I. Introduction, hypothèses et axes de recherche

L'ensemble des résultats, qui ont été générés durant la première année de ces travaux (**Partie 1**), nous a poussés à nous interroger quant au rôle des cellules myéloïdes hépatiques dans la régulation de l'hepcidine systémique. Basé sur un modèle de délétion de PAR₂ dans toutes les cellules dont le promoteur du gène *LysM* est actif, nous avons fait le choix d'investiguer l'implication de ces cellules sur la régulation de l'expression de l'hepcidine. Parmi les cellules exprimant le lysozyme M peuvent être citées : les macrophages, les monocytes ou encore les neutrophiles. Divers éléments ont soulevé l'hypothèse que les macrophages hépatiques, représentés en grande partie par les cellules de Kupffer, pourraient être impliqués dans le mécanisme de suppression de l'hepcidine que nous étudions.

Premièrement, les macrophages tissulaires résidents du foie présentent une identité leur permettant d'assurer des fonctions spécifiques sur la régulation du métabolisme du fer. En effet, nous avons vu dans le chapitre introductif de ce manuscrit que ces derniers acquièrent, notamment grâce aux signaux de l'environnement, une signature transcriptionnelle démontrant leur implication dans les mécanismes de recyclage du fer dans le foie.

Deuxièmement, il a également été montré que dans certaines conditions d'anémies associées à une hémolyse intra vasculaire ou une infection, des monocytes peuvent infiltrer le foie et se différencier en macrophages aux fonctions spécialisées dans le recyclage des érythrocytes stressés sénescents (Theurl 2018). Il apparaît donc intéressant de questionner si ce phénomène est également observable dans des conditions d'anémie sévère comme la phlébotomie.

Par ailleurs, les résultats obtenus précédemment dans le modèle *F2rl1^{LysM}* sur la fonction de PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine suggèrent une implication des macrophages. De plus, il est également connu que PAR₂ peut exercer des fonctions liées à l'attraction de cellules immunitaires, notamment de monocytes (qui se différencient en macrophages) par un mécanisme CCL2 dépendant.

Ainsi, dans cette **partie 2**, nous nous sommes interrogés sur la possibilité que l'anémie engendrée par la phlébotomie puisse induire des signaux de stress provenant du foie et entraîner un recrutement transitoire de macrophages dérivés de monocytes, lesquels pourraient assurer des fonctions de régulation de l'hepcidine. Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de la phlébotomie sur les diverses populations myéloïdes du foie. Pour cela, en nous basant sur notre méthode d'isolement des cellules non parenchymateuses, nous avons développé un panel de cytométrie composé d'anticorps ciblant spécifiquement les différentes populations de cellules du foie. Les résultats obtenus sont présentés dans les sections B et C qui suivent.

Dans un second temps, nous avons étudié ces mêmes populations, dans le foie des souris *F2rl1^{LysM}* afin de déterminer si la délétion de PAR₂ dans les macrophages affecte d'une quelconque manière les populations myéloïdes en réponse à la phlébotomie. Cela pourrait expliquer la différence de suppression de l'hepcidine entre *F2rl1^{LysM}* et *F2rl1^{+/+}*, décrite dans la **partie 1** de ces résultats. Les résultats autour de cette hypothèse font l'objet de la dernière section de ce chapitre (**section III.4**).

II. Résultats : Identification des populations myéloïdes hépatiques par cytométrie en flux

1. Développement d'un panel d'anticorps et d'une méthode d'analyse pour étudier les populations myéloïdes LysM+ du foie par cytométrie en flux

Afin de caractériser les populations de monocytes et macrophages dans le foie, nous avons mis au point une méthode adaptée pour étudier les diverses cellules hépatiques non parenchymateuses. Pour cela, nous avons développé un panel de cytométrie en flux basé sur l'utilisation d'anticorps permettant la reconnaissance d'antigènes spécifiques des différentes cellules. Les anticorps ciblant ces protéines sont regroupés dans le **tableau 3**, retrouvé dans la section méthodologie du manuscrit. Certains de ces antigènes ont été utilisés pour cibler des cellules à éliminer de l'analyse et d'autres ont été utilisés pour quantifier les populations d'intérêt (monocytes/macrophages hépatiques). Cette méthode d'analyse permettant d'exclure ou cibler différents types cellulaires en se basant sur l'utilisation de cellules négatives ou positives pour un antigène est appelée « stratégie de gating ».

Pour déterminer précisément les proportions de cellules myéloïdes hépatiques, nous avons dans un premier temps exclu de l'analyse, l'ensemble des cellules apoptotiques. Pour ce faire, nous avons sélectionné les cellules vivantes en utilisant un marqueur de viabilité (Zombie-NIR) qui se fixe aux cellules mortes, les cellules d'intérêt encore vivantes étaient celles négatives pour ce marqueur (**Figure 28A**). Ensuite, nous avons d'une part sélectionné les cellules positives pour le marqueur CD45, une glycoprotéine transmembranaire principalement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique, et d'autre part les cellules négatives pour le « linéage ». Ce linéage regroupe des anticorps couplés à un même fluorochrome qui permettent de cibler spécifiquement l'ensemble des populations immunitaires non désirées parmi lesquelles les lymphocytes B et T, les cellules Natural Killer (NK) ou encore les cellules dendritiques (**Figure 28B et C**). Notons également, que durant ces deux étapes successives, nous avons également exclu les cellules endothéliales via l'utilisation du marqueur CD31.

Par la suite, la stratégie d'analyse a permis d'identifier les différents types de cellules myéloïdes d'intérêt. Nous avons pour cela utilisé les marqueurs CD11b, Ly6C et Ly6G. Ainsi, les neutrophiles ont été sélectionnés en utilisant un anticorps ciblant l'antigène Ly6G tandis que la stratégie d'étude des monocytes reposait sur l'expression des antigènes CD11b et Ly6C (**Figure 28D et E**).

Enfin, dans la dernière partie de l'analyse, nous avons pu mettre en évidence d'une part une petite population de monocytes exprimant fortement l'antigène Ly6C++ et d'autre part une population de cellules de Kupffer positives à la fois pour les marqueurs F4/80 et Timd4 (**Figure 28F et G**). Puis, l'utilisation en combinaison, des anticorps ciblant Ly6C et F4/80, a permis d'étudier les cellules doubles positives pour ces marqueurs. Ces dernières correspondent aux macrophages transitoires, c'est-à-dire des monocytes exprimant l'antigène Ly6C qui ont subi un processus de différenciation et ainsi acquis le marqueur F4/80, présent à la surface de tous les macrophages. Rappelons que ces cellules ont été au centre de notre problématique car nous avons cherché à déterminer si une infiltration hépatique de ces macrophages dérivés des monocytes, survenait en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie. Sur la figure, cette population n'est pas présente, cela est attendu en condition physiologique (**Figure 28H**).

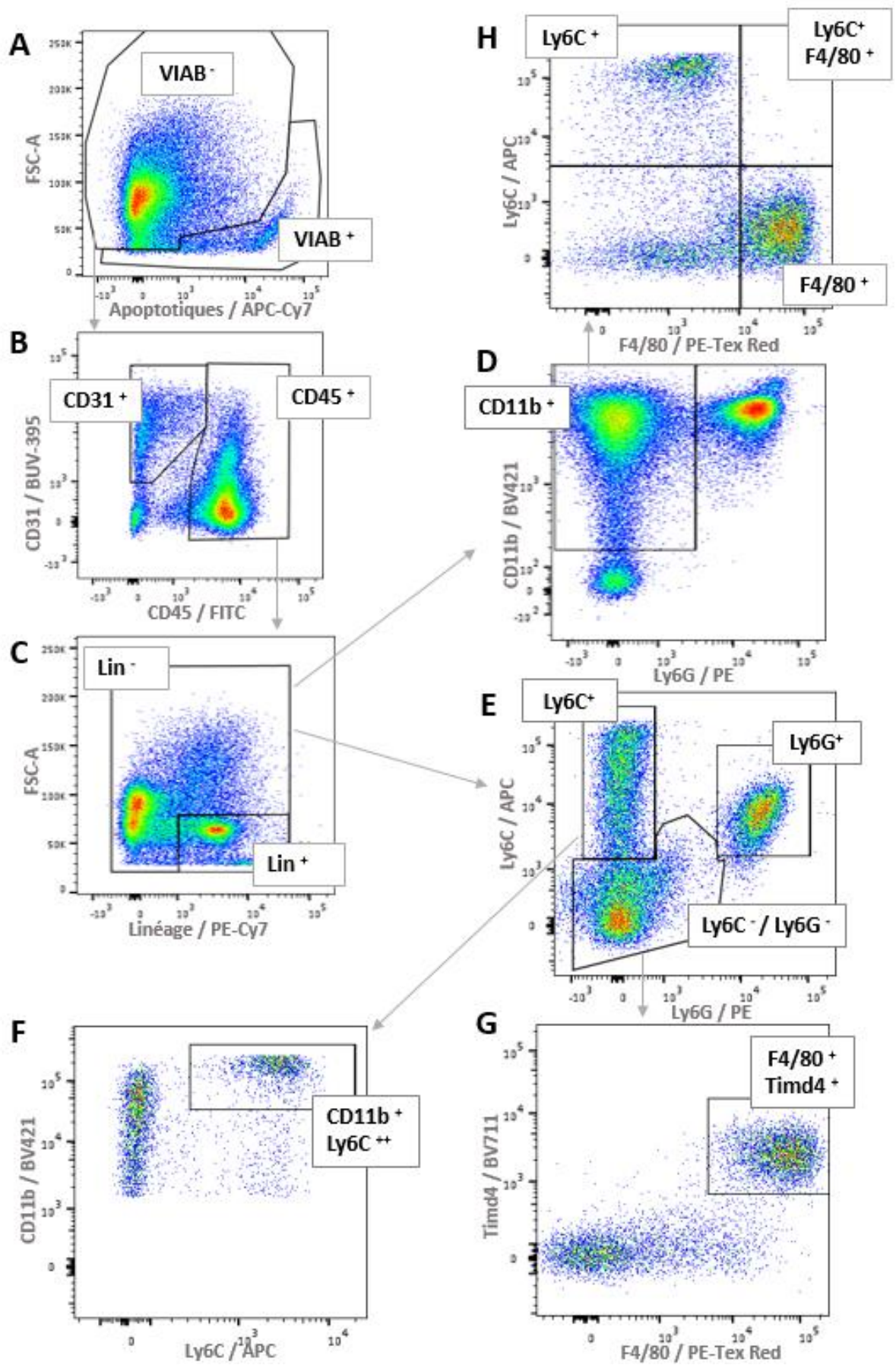


Figure 28 : Méthode d'analyse informatique des populations myéloïdes hépatiques étudiées par cytométrie en flux

(A-G) Représentation graphique des NPC issues d'une souris C57Bl/6J WT et analysées avec le logiciel FlowJo montrant (A) les cellules viables, (B) les cellules endothéliales CD31+ ou hématopoïétiques CD45+, (C) les cellules lymphoïdes Lin-, (D) les cellules myéloïdes CD11b+, (E) les monocytes Ly6C+ et neutrophiles Ly6G+, (F) les monocytes Ly6C ++, (G) les KC F4/80+ / Timd4+ ,et (H) les macrophages dérivés des monocytes Ly6C+ / F4/80+.

2. Différentes populations de cellules myéloïdes cohabitent dans le foie

Nous avons vu dans la partie précédente que le développement d'un panel et d'une stratégie de cytométrie a permis d'identifier spécifiquement les différentes populations myéloïdes du foie. La suite de nos travaux s'articule autour de l'étude de ces cellules dans un contexte d'anémie induite par la phlébotomie. Dans ce contexte, nous avons fait un focus tout particulier sur les populations de macrophages. Nous pouvons alors voir que différentes populations de cellules myéloïdes cohabitent dans le foie (**Figure 29A et B**).

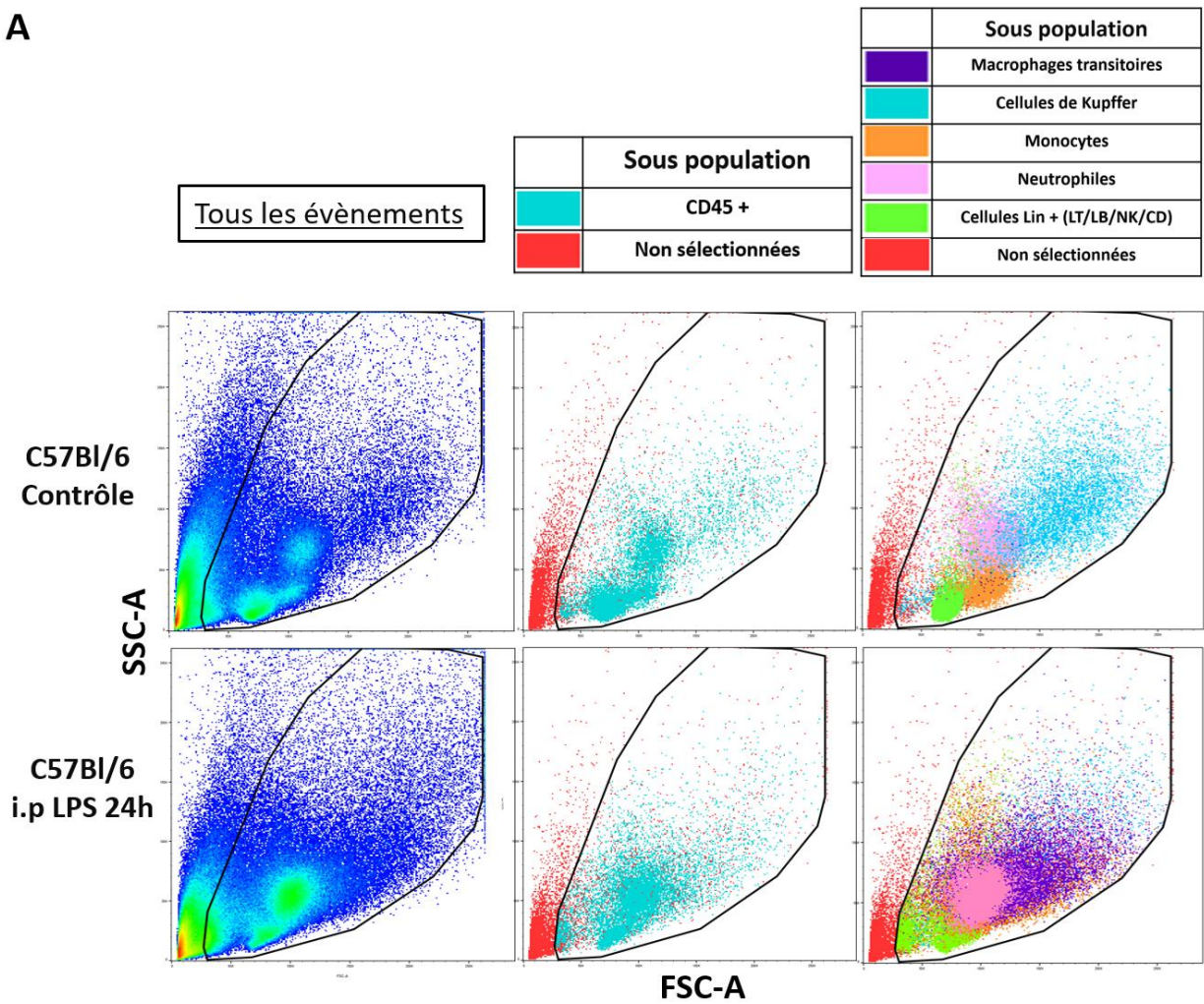
Dans un premier temps, pour identifier précisément l'ensemble de ces cellules, nous avons utilisé des souris ayant subi une injection de LPS 24h avant prélèvement. Cela a permis d'établir un contrôle positif puisqu'il est connu que lors de l'inflammation induite par des injections intrapéritonéales de LPS, s'établit un mécanisme d'attraction de plusieurs types de cellules myéloïdes dans le foie (notamment de monocytes/macrophages dérivés des monocytes et neutrophiles). Comme attendu, nous pouvons voir que le traitement a bien induit une augmentation de plusieurs types cellulaires en réponse aux injections IP de LPS (quantifications non montrées), validant ainsi notre modèle d'étude (**figure 29A**).

Dans un second temps, il est important de préciser que nous avons rencontré des difficultés à obtenir des niveaux homogènes des divers types cellulaires myéloïdes dans notre groupe de souris contrôle, rendant les résultats de cette étude plus compliqués à interpréter. En effet, les niveaux de neutrophiles étaient variables et extrêmement élevés dans les différents lots de souris WT non traitées par rapport à ce qui était attendu (**Figure 29B**). Nous verrons d'ailleurs, dans la partie D de ce chapitre

2 de résultats, que les niveaux de neutrophiles des souris WT de la cohorte *F2r1^{LysM}* provenant d'une autre zootechnie d'expérimentation étaient nettement plus bas.

Toutefois, nous pouvons tout de même conclure sur la validité de notre approche par cytométrie en flux qui montre que différentes populations myéloïdes cohabitent dans le foie. Nous avons ainsi pu quantifier les niveaux de base de ces cellules. La suite de ces travaux vise à déterminer si l'anémie induite par la phlébotomie entraîne le recrutement de macrophages dérivés des monocytes, qui pourraient exercer des fonctions régulatrices sur l'hepcidine.

A



B

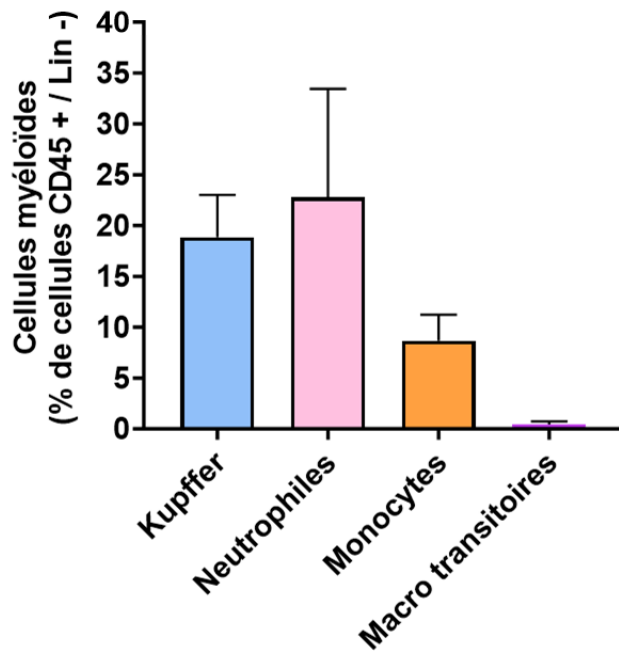


Figure 29 : Mesure par cytométrie en flux des différentes populations de cellules myéloïdes dans le foie de souris C57Bl/6J WT

(A) Représentation graphique des cellules myéloïdes dans le foie de souris C57Bl/6J WT discriminées selon les paramètres de taille (FSC-A) et de granulosité (SSC-A), en condition physiologique ou après une injection i.p de LPS 24h avant analyse. (B) Quantification du pourcentage des cellules myéloïdes dans le foie des souris C57Bl/6J WT en condition physiologique.

III. Résultats : Effet de l'anémie induite par la phlébotomie sur les populations de macrophages dans le foie

1. L'anémie induite par la phlébotomie induit une légère infiltration de monocytes dans le foie des souris C57Bl/6J

Tout d'abord, afin d'étudier l'infiltration de macrophages en réponse à la phlébotomie, nous avons dans un premier temps réalisé les mêmes expériences de phlébotomies que celles décrites en partie 1. Comme attendu, nous avons bien observé une diminution du nombre de globules rouges, de la concentration en hémoglobine, ainsi que de l'hématocrite, en réponse à la phlébotomie (**Figure 30A B et C**). De plus, les souris ont supprimé significativement l'hepcidine à des niveaux attendus (**Figure 30D**). Notons que les niveaux des différents paramètres hématologiques et d'expression génique de l'hepcidine des souris ayant reçu une dose de LPS 24h avant sacrifice étaient identiques au groupe des souris contrôles non traitées.

Dans un second temps, en nous appuyant sur notre hypothèse selon laquelle des macrophages dérivés des monocytes peuvent réguler l'hepcidine en réponse à la phlébotomie, nous avons quantifié le pourcentage de monocytes dans le foie des différents groupes de souris. Pour cela, nous nous sommes basés sur la stratégie d'analyse développée précédemment et avons quantifié les monocytes de deux façons différentes. Nous avons ainsi observé une tendance à l'augmentation des monocytes dits « classiques », exprimant fortement l'antigène Ly6C (« Ly6C++ »), dans le foie des souris phlébotomisées. Cette augmentation était plus forte dans le groupe d'individus traités au LPS (**Figure 30E**). Nous avons également quantifié l'ensemble des monocytes, doublement positifs pour les antigènes CD11b et Ly6C+ afin d'établir un pourcentage de monocytes totaux. Dans ce contexte, nous avons également observé une augmentation significative de ces cellules, à un niveau presque équivalent entre les groupes phlébotomie et LPS par rapport au groupe WT. (**Figure 30F**).

Collectivement, ces données indiquent qu'en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie survient une légère infiltration de monocytes dans le foie des souris.

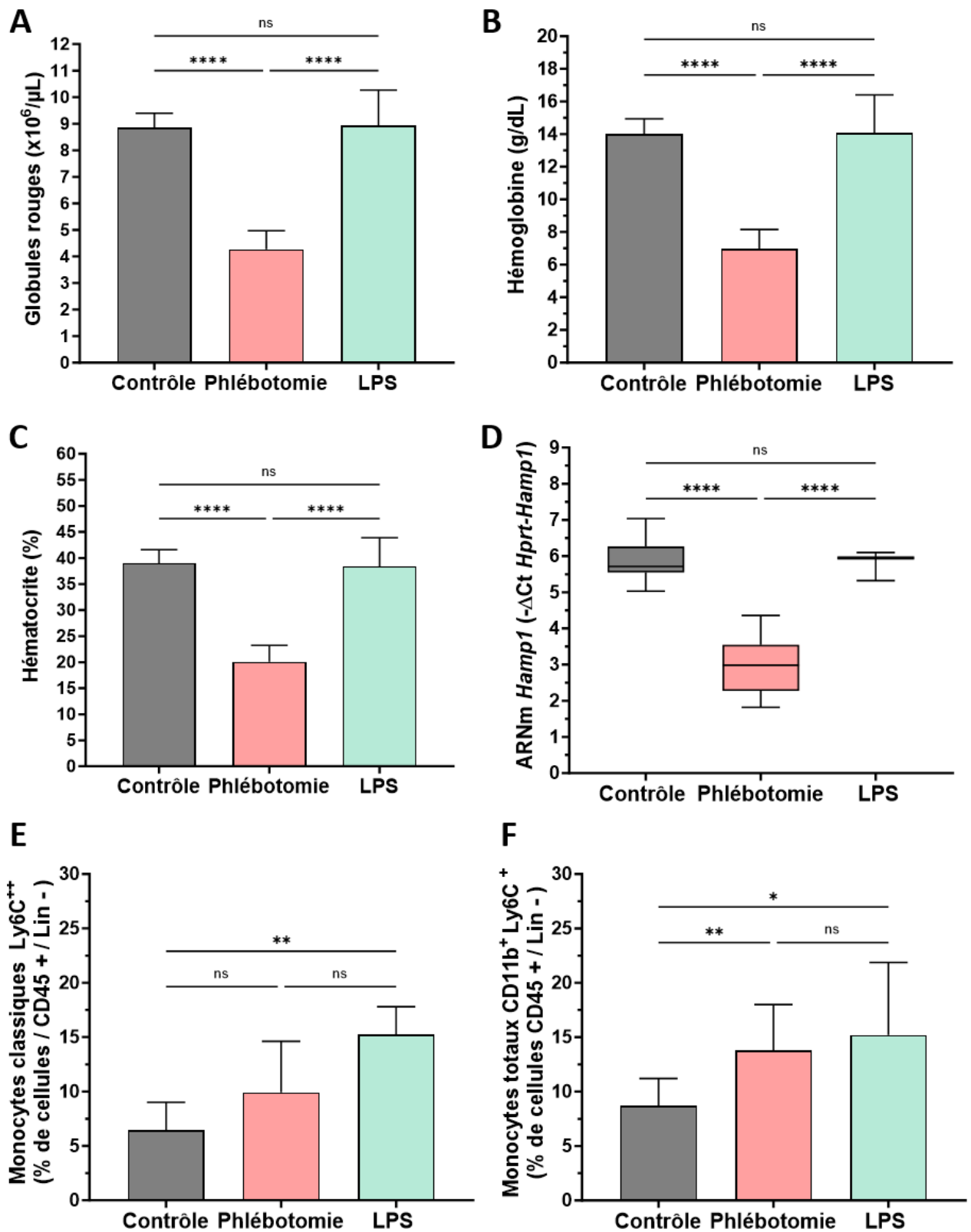


Figure 30 : La phlébotomie induit une légère infiltration de monocytes dans le foie des souris C57Bl/6J

(A-C) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges, taux d'hémoglobine et hématocrite) avec un analyseur d'hématologie. (D) Analyse par PCRq de l'expression d'*Hamp1* dans le foie. (F-G) Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de monocytes classiques Ly6C++ ainsi que du pourcentage de monocyte totaux CD11b+ /Ly6C+ dans le foie des souris C57Bl/6J.

Les moyennes des valeurs des paramètres sanguins, de $-\Delta\text{Ct}$ de PCRq, et des pourcentages de monocytes des groupes de souris C57Bl/6J ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - ** : $p < 0.005$ - **** : $p < 0.0001$]

2. L'anémie induite par la phlébotomie n'entraîne pas d'augmentation de macrophages transitoires dans le foie

Nous avons vu dans la partie précédente que l'anémie induite par la phlébotomie a entraîné une baisse majeure de l'expression de l'hepcidine dans le foie. Dans ce contexte, nous avons pu observer une légère augmentation des niveaux de monocytes dans le foie suggérant que l'anémie induite par la phlébotomie entraîne une infiltration de monocytes dans le foie. De ce fait, nous avons cherché à caractériser le devenir de ces monocytes et mesurer la proportion de macrophages transitoires qui ont pu être générés à partir de ces monocytes et *in fine* potentiellement agir sur l'expression de l'hepcidine.

Comme expliqué en amont, ces macrophages transitoires sont des monocytes Ly6C+ en cours de différenciation en macrophages F4/80+. Ainsi, l'analyse par cytométrie en flux des cellules doublement positives pour ces marqueurs a permis d'étudier précisément ce type cellulaire. Comme attendu, nous avons d'abord constaté qu'en condition physiologique, la présence de ces macrophages est indétectable dans le foie des souris (**Figure 31A**). Nous avons également observé que le LPS a induit une forte augmentation de ces cellules dans le foie des souris traitées. Enfin, aucune augmentation de cette population de macrophages dérivés des monocytes n'a pu être mise en évidence dans le foie des souris phlébotomisées. Ces données suggèrent que la baisse de l'hepcidine induite par la phlébotomie n'est pas dépendante d'un tel mécanisme. Par ailleurs, en accord avec ce résultat, nous n'avons pas non plus été capables de mettre en évidence une augmentation de la chimiokine CCL2, après phlébotomies. Les niveaux de transcrits codant pour cette protéine, responsable de la chimio-attraction des monocytes, ont été augmentés uniquement dans le lot de souris

injectées au LPS (**Figure 31B**). De plus, nous n'avons pas non plus observé de variation de l'expression des gènes codant pour les récepteurs aux chimiokines mono attractantes : *Ccr2* et *Cx3cr1* dans les NPC après phlébotomies par rapport aux contrôles (**Figure 31C et D**).

Collectivement, ces données indiquent que la phlébotomie n'induit pas de signaux hépatiques entraînant l'attraction et l'infiltration d'une population de macrophages transitoires vers le foie. Notre hypothèse selon laquelle l'hepcidine des hépatocytes est régulée par ces cellules après infiltration dans le foie a donc été réfutée.

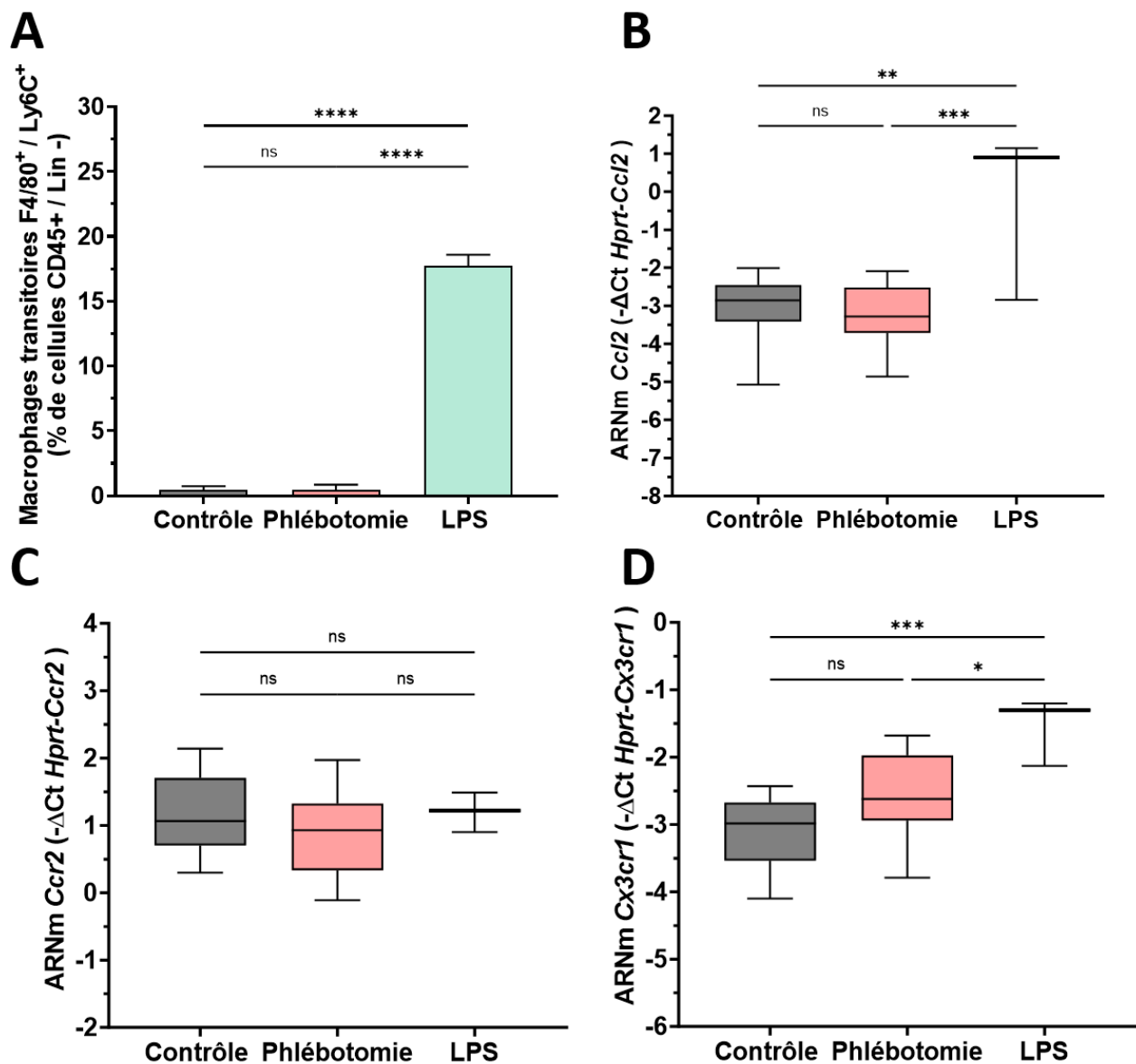


Figure 31 : La phlébotomie n'induit pas d'infiltration de macrophages transitoires dans le foie

(A) Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de macrophages transitoires Ly6C⁺/F4/80⁺. (B-D) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Ccl2*, *Ccr2* et *Cx3cr1* dans le foie des souris C57Bl/6J.

Les moyennes des valeurs des pourcentages de macrophages et de $-\Delta\text{Ct}$ de PCRq des groupes de souris C57Bl/6J ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - ** : $p < 0.005$ - *** : $p < 0.0005$ - **** : $p < 0.0001$]

Bien que la phlébotomie ne semble pas entraîner d'augmentation des macrophages transitoires au temps 24h après la seconde phlébotomie, nous avons tout de même quantifié le reste des populations myéloïdes en réponse à la phlébotomie. Nous nous sommes donc intéressés aux KC, qui représentent la

population majoritaire de macrophages hépatiques. Nous avons alors observé que la phlébotomie a induit une diminution significative du pourcentage de cellules de Kupffer. Néanmoins, cette diminution était moins forte que celle observée lors du stress inflammatoire provoqué par le LPS (**Figure 32A**). De plus, étant donné que les résultats des expériences de cytométrie en flux sont exprimés en pourcentage (% des cellules myéloïdes totales CD45+ / Lin -), il est difficile de raisonner en nombre absolu initial dans l'organe et ainsi conclure précisément que la diminution observée correspond bien à une baisse du nombre de ces cellules. En effet, il est également possible que la baisse observée du pourcentage des cellules de Kupffer soit uniquement liée à une dilution due à l'augmentation des monocytes que nous avons décrite en amont.

De façon intéressante, la légère baisse des KC, observée dans le groupe phlébotomie par cytométrie, était corrélée à une baisse de la quantité des transcrits codant pour le marqueur F4/80 présent dans tous les macrophages (**Figure 32B**). Notons que malgré une baisse plus importante du pourcentage de KC dans le groupe LPS, nous n'avons pas fait état d'une diminution du nombre de transcrits *F4/80* dans ce même groupe, cela peut être expliqué par une compensation du nombre de transcrits provenant de l'augmentation du pourcentage des macrophages dérivés des monocytes que nous avons observée précédemment. Pour étudier plus précisément la variation des cellules KC, nous avons également quantifié les transcrits *Clec4f* et *Vsig4* en réponse à la phlébotomie (**Figure 32C et D**). Ces derniers codent pour des protéines retrouvées spécifiquement dans ces macrophages résidents du foie. Nous avons alors observé une légère diminution de ces deux marqueurs dans le groupe phlébotomie ainsi qu'une forte diminution dans le groupe LPS, ces résultats sont en corrélation avec ceux générés par cytométrie en flux.

En conclusion, en comparaison avec le stress inflammatoire induit par le traitement des souris au LPS, l'anémie induite par la phlébotomie n'a pas eu d'impact majeur sur les niveaux de cellules de Kupffer.

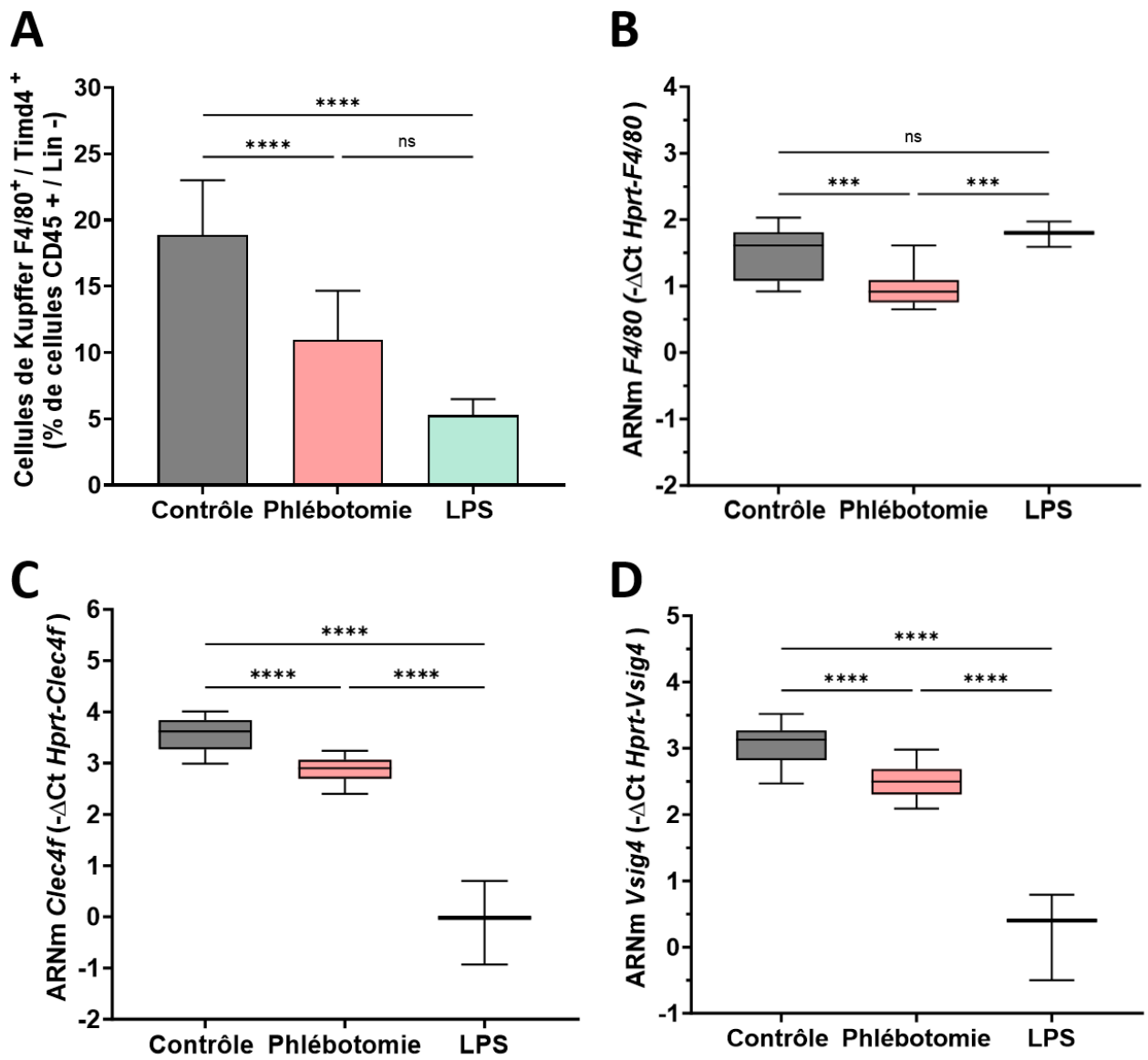


Figure 32 : Une diminution du pourcentage de KC est observée dans le foie en réponse à la phlébotomie

(A) Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de KC F4/80⁺ / Timd4⁺. (B-D) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *F4/80*, *Clec4f* et *Vsig4* dans le foie des souris C57Bl/6J.

Les moyennes des valeurs des pourcentages de KC et de -ΔCt de PCRq des groupes de souris C57Bl/6J ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [*** : p<0.0005 - **** : p<0.0001]

3. Les niveaux de neutrophiles hépatiques témoignent d'un statut sanitaire altéré qui a constitué un biais pour l'analyse des populations hépatiques

Nous avons quantifié précédemment les niveaux de monocytes et macrophages présents dans le foie, ainsi que l'effet de la phlébotomie sur ces cellules. Nous avons alors infirmé notre hypothèse selon laquelle des macrophages transitoires infiltraient le foie en réponse à la phlébotomie. Ces cellules, dérivées de monocytes infiltrants ne sont donc pas impliquées dans la régulation de l'hepcidine lors d'un stress de l'érythropoïèse. Cependant, il est très important de préciser que certains paramètres physiologiques relatifs à l'inflammation étaient anormalement différents et témoignent d'un statut sanitaire altéré dans cette cohorte de souris C57Bl/6J, hébergées dans la zootechnie de notre laboratoire. En conséquence, les résultats bien qu'assez clairs, étaient donc partiellement biaisés puisqu'il est connu que, lors de différents stress inflammatoires, des infiltrats de cellules immunitaires peuvent survenir dans le foie. Ainsi, nous relatons dans cette partie nos observations concernant le statut sanitaire des souris, ces éléments ont ensuite été pris en compte pour conclure de la façon la plus prudente possible vis-à-vis de notre hypothèse de départ.

Dans un premier temps, nous avons observé que le pourcentage de polynucléaires neutrophiles, exprimant spécifiquement l'antigène Ly6G, était anormalement élevé dans le foie des souris. En effet, celui-ci était supérieur à 20% (% des cellules myéloïdes totales CD45+ / Lin -) dans les différents groupes d'individus (**Figure 33A**). Rappelons qu'en condition physiologique, les niveaux de neutrophiles dans le foie des souris « saines » sont normalement très bas, c'est-à-dire inférieurs à 5% des cellule myéloïdes. De plus, si l'on se réfère aux données du pourcentage des différentes cellules myéloïdes des souris C57Bl/6J WT étudiées dans la section 1 de ce chapitre, nous pouvons voir que le pourcentage de neutrophiles de certains individus était également très élevé (**Figure 33B**). Parallèlement à la détection des neutrophiles par des approches au niveau protéique, nous nous sommes également appuyés sur des approches au niveau moléculaire en mesurant les transcrits de *S100a9* par PCR quantitative. Ce dernier, spécifique des neutrophiles dans le foie, était très variable et de nombreuses souris des groupes contrôle et phlébotomie

présentaient une expression élevée de ce marqueur à des niveaux identiques au groupe LPS, utilisé comme contrôle positif de l'inflammation (**Figure 33B**).

Pour aller plus loin, nous avons également mesuré l'expression des gènes *Socs3* et *Saa3*. Nous avons étudié d'une part l'expression de *Socs3*, un gène cible de la voie pro-inflammatoire JAK/STAT. Nous n'avons pas observé de différences entre les trois groupes de souris (**Figure 33C**). En revanche, nous pouvons voir que la variabilité de l'expression au sein de chaque groupe était élevée ce qui, en parallèle avec les données observées sur les niveaux de neutrophiles, suggère que certaines souris présentaient une inflammation. De plus, l'étude de l'expression du gène *Saa3*, un autre gène utilisé comme marqueur d'inflammation hépatique, montrait que ce dernier était fortement induit en réponse au LPS par rapport aux deux autres groupes. Cependant, nous pouvons également constater que la variabilité au sein des groupes contrôle et phlébotomie était très forte (**Figure 33D**).

En conclusion, l'analyse du foie des souris a mis en évidence une possible inflammation dans les différents groupes incluant le groupe de souris contrôles. À la lumière de ces informations, il est évident que cela a constitué un biais qui a pu entraver une partie de nos travaux. Cependant, les contrôles que nous avons mis en place et les résultats obtenus nous ont quand même permis de conclure quant à notre hypothèse de départ. Ainsi, il est clair que l'anémie provoquée par la phlébotomie n'induit pas le recrutement de macrophages transitoires dans le foie.

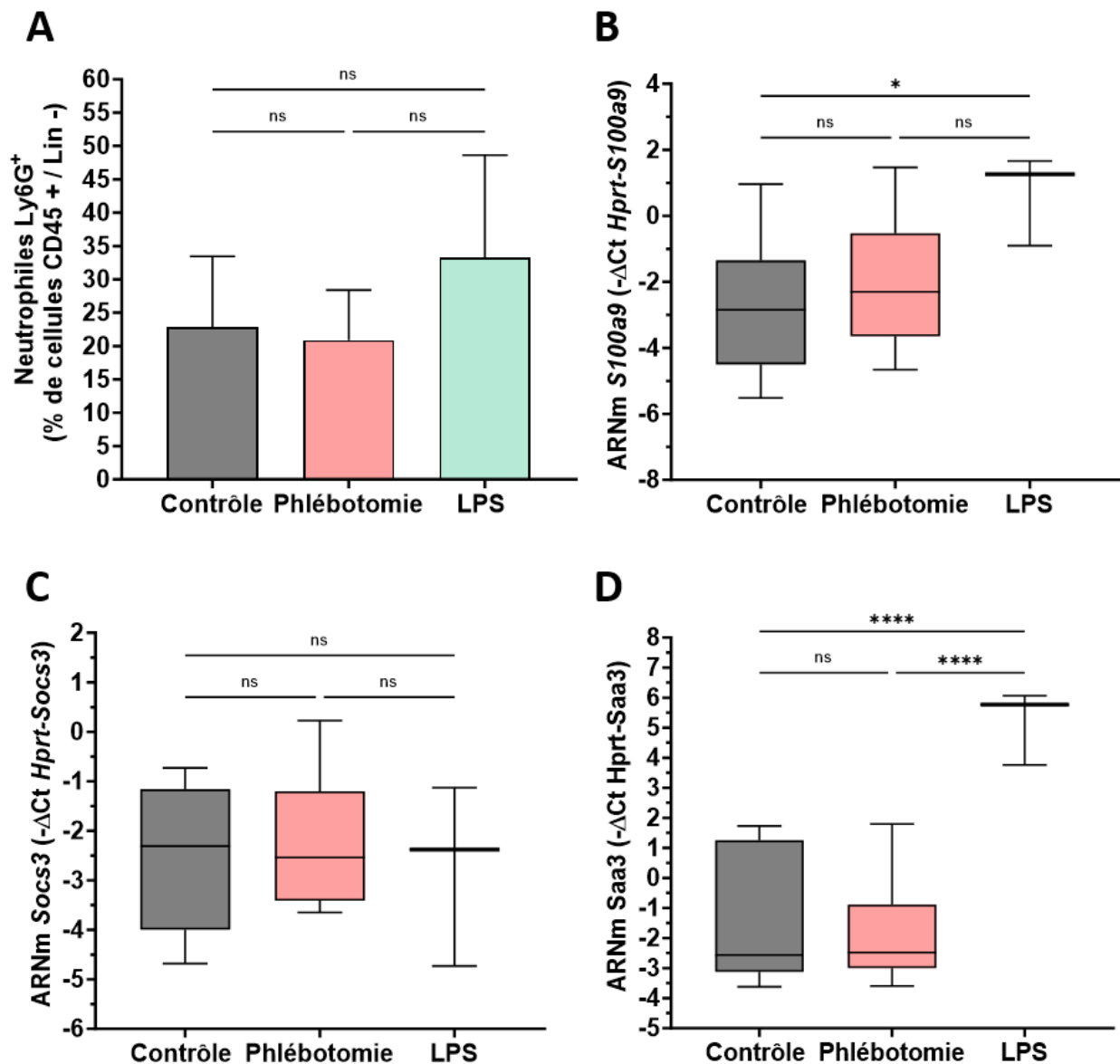


Figure 33 : Quantification de l'infiltration de neutrophiles et mesure de marqueurs inflammatoires dans le foie en réponse à la phlébotomie

(A) Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de neutrophiles Ly6G+. (B-D) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *S100a9*, *Socs3* et *Saa3* dans le foie des souris C57Bl/6J. Les moyennes des valeurs des pourcentages de neutrophiles et de Δ Ct de PCRq des groupes de souris C57Bl/6J ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - **** : $p < 0.0001$]

4. Effet d'une délétion de PAR₂ dans les macrophages sur les populations myéloïdes hépatiques en réponse à la phlébotomie

Comme vu dans l'introduction de ce manuscrit, il est décrit dans la littérature que l'activation de PAR₂ dans diverses situations physiopathologiques peut induire la production de CCL2 et engendrer le recrutement de cellules immunitaires et tout particulièrement de monocytes. Bien que mineure, nous avons précédemment mis en évidence une infiltration de monocytes dans le foie des souris C57Bl/6J WT en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie. Nous avons donc étudié le comportement des cellules myéloïdes hépatiques dans le foie des souris *F2r1^{LysM}* en réponse au stress induit par la phlébotomie. Pour cela, nous avons réalisé la même étude par cytométrie en flux.

Afin d'évaluer l'effet de la délétion spécifique de PAR₂ dans les macrophages sur les populations myéloïdes du foie, en réponse à la phlébotomie, il est important de préciser que les souris *F2r1^{LysM}* ainsi que leurs homologues WT littermate, étaient hébergées dans une zootechnie d'expérimentation différente de celle utilisée pour héberger la cohorte de B6 étudiée précédemment. Ainsi, nous avons dans un premier temps comparé le statut sanitaire des souris *F2r1^{LysM}* avec la cohorte de souris C57Bl/6J WT, en se basant sur les mêmes paramètres. Dans ce contexte, Il est frappant de voir que les niveaux de neutrophiles étaient significativement plus bas dans la cohorte *F2r1^{LysM}* (**Figure 34A**). Nous avons ensuite analysé les niveaux de transcrits des gènes *Socs3* et *Saa3* pouvant être utilisés comme témoin d'une inflammation hépatique (**Figure 34B et C**). Nous avons alors observé une tendance plus faible de l'expression des deux gènes dans les lots de souris issues de la cohorte *F2r1^{LysM}* comparés aux B6 WT. Ces résultats suggèrent que les souris *F2r1^{+/+}* et KO, hébergées dans une zootechnie indépendante de notre laboratoire, étaient en meilleure santé. Cela a d'ailleurs été confirmé par d'autres équipes de notre institut, qui ont également constaté des anomalies dans leurs cohortes de souris, décrivant notamment des problèmes inflammatoires dans l'intestin et les poumons, y compris chez des individus témoins (données non disponibles).

Ensuite, nous avons effectué les mêmes expériences de phlébotomie sur les souris de cette cohorte *F2r1^{LysM}* et nous avons mesuré les niveaux d'hepcidine dans

le foie. Comme attendu, l'inhibition de l'hepcidine était réduite dans le foie des individus *F2rl1^{LysM}* par rapport aux WT (**Figure 34D**). Nous avons alors quantifié les niveaux de monocytes et macrophages dans le foie de ces souris par cytométrie en flux. Une légère tendance à l'augmentation du pourcentage de monocytes a été mise en évidence en réponse à la phlébotomie dans les groupes WT et KO (**Figure 34E**). A l'inverse, le pourcentage de KC était aussi légèrement modifié avec une baisse de ces cellules après phlébotomie dans les deux groupes (**Figure 34F**).

Collectivement, ces données démontrent que le récepteur PAR₂ n'est pas responsable de l'attraction de monocytes dans le foie en réponse à l'anémie induite par phlébotomie. La délétion de PAR₂ n'affecte pas le pourcentage des populations de monocytes et macrophages en réponse à la phlébotomie.

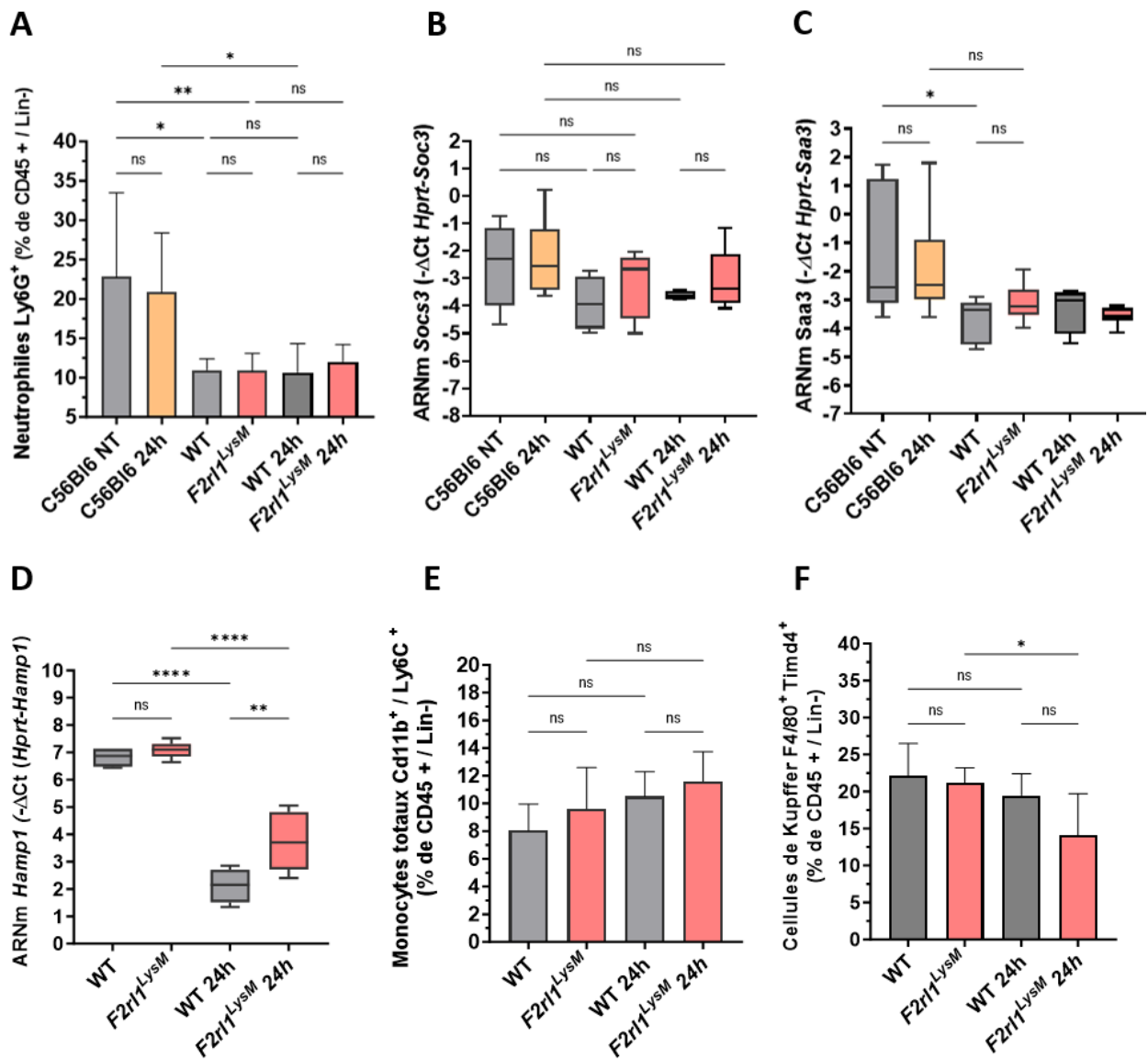


Figure 34 : Effet d'une délétion de PAR_2 dans les macrophages sur les populations myéloïdes hépatiques en réponse à la phlébotomie

(A) Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de neutrophiles Ly6G+ dans le foie des groupes de souris C57Bl/6J et $F2r11^{LysM}$. (B-D) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Socs3*, *Saa3* et *Hamp1*, dans le foie de la cohorte de souris $F2r11^{LysM}$. (E-F). Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de monocytes totaux et des KC dans le foie de la cohorte de souris $F2r11^{LysM}$.

Les moyennes des valeurs des pourcentages des différentes cellules myéloïdes et de ΔCt de PCRq des groupes de souris C57Bl/6J et $F2r11^{LysM}$ ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - ** : $p < 0.005$ - **** : $p < 0.0001$]

IV. Conclusion

Dans cette deuxième partie de résultats, nous avons émis l'hypothèse que la phlébotomie induit un mécanisme d'attraction des monocytes vers le foie. Nous avons ainsi cherché à déterminer si ces derniers, qui se différencient *in situ* en macrophages transitoires, pouvaient participer à la régulation négative de l'hepcidine en réponse au stress érythroïde (liée à la phlébotomie). Dans ce contexte, nous avons testé si une ablation de PAR₂ dans les macrophages était susceptible de bloquer ce mécanisme, expliquant peut-être ainsi la différence d'expression d'hepcidine des *F2r1^{LysM}* vis-à-vis des WT, observée après phlébotomie.

Nos résultats ont démontré qu'une légère infiltration de monocytes dans le foie, survient en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie. Cependant, les données obtenues décrivent que ces monocytes ne se différencient pas en macrophages, au temps 24h après la deuxième phlébotomie. Ces cellules ne sont donc pas responsables de la suppression de l'hepcidine, observée dans ce contexte.

Enfin, les expériences réalisées sur les souris *PAR2^{LysM}*, hébergées dans une zooteknique différente (et dont l'état sanitaire semblait meilleur) démontrent que le récepteur PAR₂, exprimé dans les macrophages, ne participe pas à la régulation de l'hepcidine par un mécanisme dépendant de l'attraction des monocytes.

En conclusion, la phlébotomie n'induit pas d'attraction de macrophages dérivés des monocytes dans le foie. Le mécanisme de régulation de l'hepcidine par PAR₂ depuis les macrophages est donc indépendant d'un tel mécanisme. Dans la partie suivante, nous avons cherché à mettre en évidence le rôle des macrophages dans la régulation de l'hepcidine.

Partie 3 : Caractérisation du rôle des macrophages dans la régulation de l'hepcidine

I. Introduction et hypothèses de recherche

Dans la partie précédente, nous avons exploré l'hypothèse qu'en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie survient une infiltration de monocytes dans le foie se différenciant ensuite en macrophages dits transitoires. Nous avons alors montré qu'une petite infiltration de monocytes survient en réponse à la phlébotomie mais celle-ci reste tout de même mineure et nous n'avons pas montré d'augmentation d'une population de macrophages dérivés de ces monocytes. En conséquence, ces éléments ont infirmé notre hypothèse suggérant que si les macrophages sont impliqués dans la régulation de l'hepcidine en réponse à la phlébotomie, cela est indépendant d'un mécanisme d'attraction des monocytes vers le foie. Ainsi, nous avons cherché à démontrer le rôle direct des macrophages sur la régulation de l'expression de l'hepcidine.

Comme expliqué dans l'introduction, il a déjà été montré que l'ablation des macrophages hépatiques, par des expériences d'injections de clodronate, entraîne une augmentation de l'hepcidine systémique. Nous avons donc émis l'hypothèse que les macrophages tissulaires résidents du foie pourraient être impliqués dans la régulation négative de l'hepcidine en réponse à la phlébotomie. Ces cellules, qui participent déjà à la régulation du métabolisme du fer en recyclant les globules rouges, sont en contact étroit avec les cellules endothéliales et les hépatocytes. Il a été montré que les cellules endothéliales peuvent réguler l'hepcidine par la sécrétion de BMP. Nous avons donc voulu déterminer si un dialogue entre les macrophages et les hépatocytes pourrait également être responsable d'une régulation de l'hepcidine.

De plus, les résultats obtenus avec les souris *F2rl1^{LysM}* suggèrent que PAR₂ régule l'hepcidine via un rôle dans les macrophages. Pour aller plus loin dans l'étude

du rôle des macrophages et confirmer leur implication dans la régulation de l'hepcidine, nous avons utilisé un modèle murin d'ablation des macrophages. Ainsi nous avons opté pour un modèle génétique : le modèle *LysM-Cre / iDTR-Flox*. Le principe détaillé de ce modèle sera développé dans la partie suivante mais notons déjà que son intérêt principal est d'induire une déplétion spécifique des macrophages.

Ainsi, la première partie de nos résultats s'attache à caractériser l'effet de la déplétion des macrophages et l'impact sur l'expression hépatique de l'hepcidine. Dans un second temps, nous avons voulu déterminer comment l'hepcidine pourrait être régulée par les macrophages. Enfin, la dernière partie de ces résultats s'articule autour de la caractérisation des mécanismes par lesquels des signaux négatifs provenant des macrophages pourraient agir sur l'hepcidine hépatocytaire.

II. Résultats : Effets et conséquences de la déplétion des macrophages sur la régulation de l'expression de l'hepcidine

1. L'injection de la DTX aux souris *LysM^{iDTR}* supprime efficacement les cellules de Kupffer dans le foie

Dans le but de supprimer spécifiquement les macrophages, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique permettant l'expression conditionnelle du récepteur à la toxine diphtérique (DTR) dans un type cellulaire d'intérêt. En effet, contrairement aux cellules humaines, les cellules murines sont résistantes aux effets de la toxine diphtérique (DTX) car elles n'expriment pas le récepteur permettant sa pénétration dans les cellules. L'objectif de ce modèle est donc d'induire l'expression du récepteur DTR dans un type de cellule, où une injection de DTX permet d'éliminer sélectivement la population cellulaire présentant le récepteur.

Nous avons donc généré une souris KI (« Knock-in ») transgénique exprimant le DTR uniquement dans les macrophages (souris *LysM^{Cre}; iDTR^{flox}*). Pour cela, nous

avons utilisé les souris *LysM^{Cre}*, qui expriment l'enzyme CRE recombinase sous la dépendance du promoteur du gène murin *LysM* qui est exprimé de manière sélective dans les macrophages chez la souris. Notons que ces souris *LysM^{Cre}* avaient été utilisées pour induire un KO du gène de PAR₂ de façon spécifique dans les macrophages. Puis, ces souris ont été croisées avec une lignée de souris chez laquelle l'expression du DTR humain peut être induite par la CRE recombinase (les souris *iDTR^{fl/fl}*). Nous avons obtenu ainsi une lignée exprimant le DTR dans les macrophages (souris *LysM^{Cre}; iDTR^{flox}*) que nous avons nommée *LysM^{DTR}* (**Figure 35A**).

Pour détruire les macrophages, un protocole basé sur trois injections consécutives de DTX en i.p. à 24h d'intervalle a été mis au point. Les souris ont été sacrifiées 12h après la dernière injection pour effectuer nos différentes analyses (**Figure 35B**).

Pour valider notre protocole et confirmer la suppression des macrophages, nous avons quantifié les différentes populations myéloïdes du foie par cytométrie en flux. Nous avons également évalué l'impact de la déplétion en mesurant par PCR quantitative les niveaux de transcrits de gènes exprimés spécifiquement dans les macrophages. Comme attendu, nous avons observé une diminution significative des populations de KC, identifiées comme CD45+ / Lin- ; Ly6C- ; F480+ ; Timd4+ (**Figure 35C et D**). De plus, nous avons également pu détecter la suppression des macrophages par PCRq puisque l'expression des gènes spécifiques codant pour les protéines F4/80 et Timd4 était également fortement diminuée par rapport au groupe de souris de contrôle NI (non injectées) (**Figure 35E**).

En conclusion, nos résultats révèlent que ce modèle est efficace pour supprimer de façon spécifique les macrophages hépatiques.

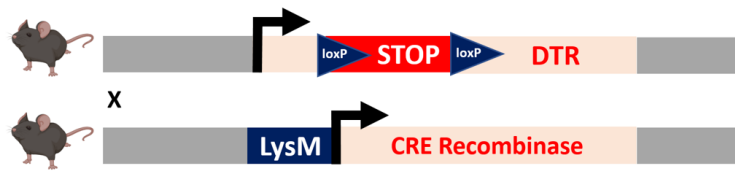
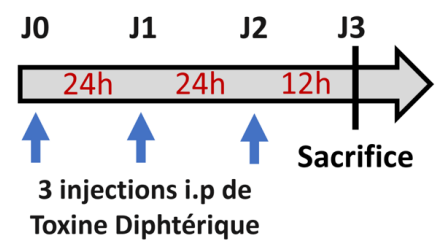
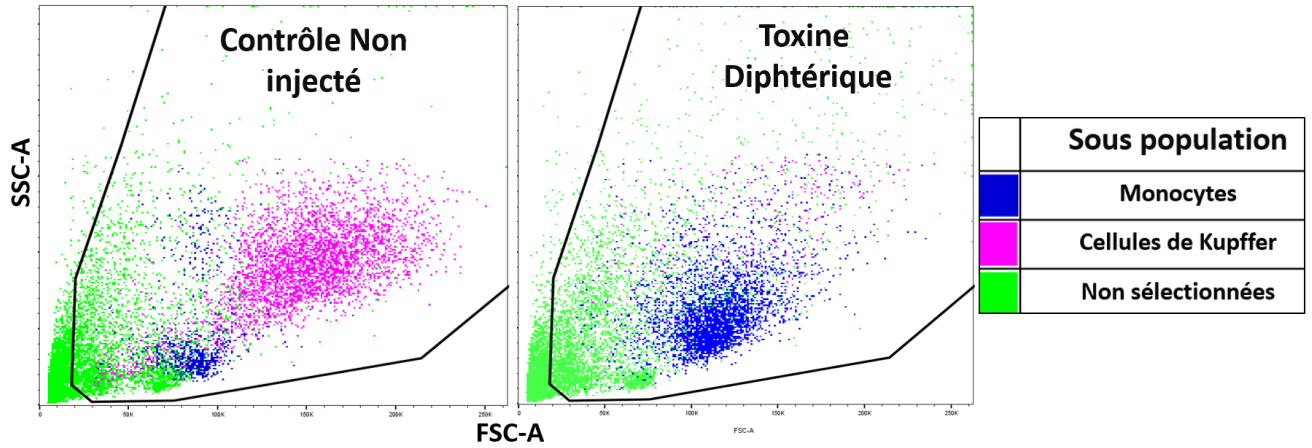
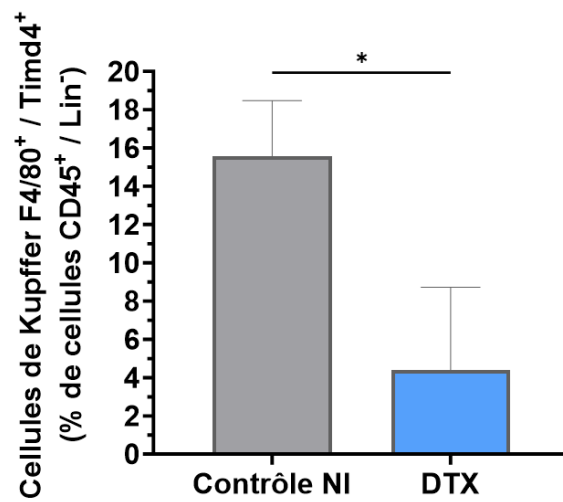
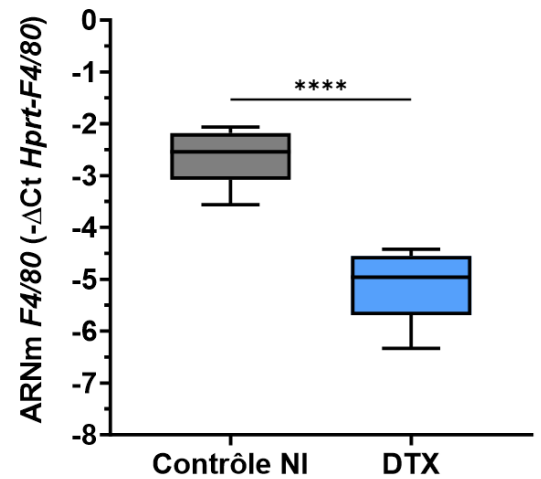
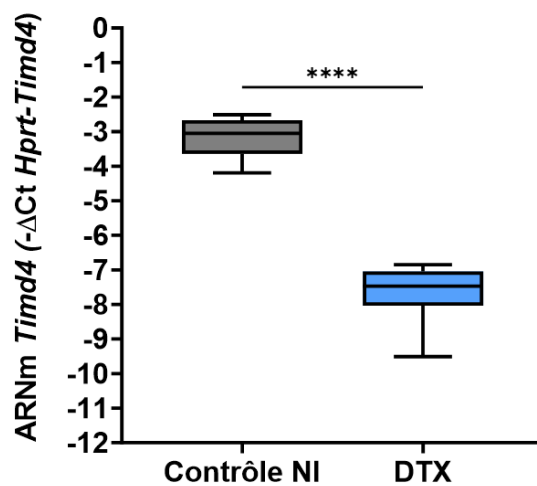
A**B****C****D****E****F**

Figure 35 : Développement d'un modèle de suppression inductible des macrophages

(A) Construction génique des souris KI DTR : $LysM^{DTR}$: Les souris $LysM^{Cre}$ qui expriment la Cre-Recombinase sous le contrôle du promoteur $LysM$ ont été croisées avec les souris $DTR^{lox/lox}$ qui expriment des séquences LoxP bornant une cassette « stop » insérée dans le gène codant pour le récepteur à la toxine diphtérique. Le croisement des souris conduit à l'induction de l'expression du DTR dans les macrophages. (B) Plan de l'expérience de déplétion des macrophages par la DTX : 500ng de DTX ont été injectés pendant 3 jours à 24h d'intervalle et les organes ont été collectés 12h après la dernière injection. (C) Représentation graphique de l'étude par cytométrie en flux de l'ablation des KC par la DTX dans le foie des souris $LysM^{DTR}$. (D) Quantification de la suppression des KC par cytométrie en flux. (E-F) Mesure par PCRq des gènes $F4/80$ et $Timd4$ dans le foie des souris $LysM^{DTR}$ après injection de DTX.

Les moyennes des valeurs des pourcentages de KC et de ΔCt de PCRq des souris $LysM^{DTR}$ ont été comparées par test t de student. [* : $p < 0.05$ - **** : $p < 0.0001$]

2. La déplétion des macrophages par la toxine diphtérique induit une forte augmentation de l'hepcidine

Après validation du protocole expérimental, nous avons évalué l'effet de la déplétion des macrophages sur l'expression de l'hepcidine. Nous avons mesuré divers paramètres hématologiques pour s'assurer que les injections de toxines n'ont pas d'effets délétères sur les globules rouges, qui pourraient indirectement faire varier l'expression de l'hepcidine et biaiser nos interprétations. Dans ce contexte, nous n'avons pas observé des différences majeures du nombre de globules rouges ainsi que des niveaux d'hémoglobine et de l'hématocrite (**Figure 36A, B et C**).

De façon tout à fait intéressante, la suppression des macrophages a induit une augmentation majeure de l'expression de l'hepcidine (**Figure 36D**). Il est important de préciser que cette augmentation était seulement la conséquence de l'ablation des macrophages et non d'une réaction immunitaire liée aux injections de toxines. En effet, nous pouvons observer que les injections de DTX aux souris C57Bl/6J WT (qui n'expriment pas le DTR) n'ont pas entraîné d'augmentation de l'expression de l'hepcidine, suggérant que la toxine seule n'a pas d'effet. Par ailleurs, en parallèle à l'augmentation d'*Hamp1*, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes induits par l'activation de la voie BMP-SMAD : *id1* et *Smad7* (**Figure 36E et F**). Ces données suggèrent que la suppression des macrophages pourrait avoir entraîné

une suractivation de la voie BMP-SMAD à l'origine de l'augmentation des niveaux d'expression de l'hepcidine dans le foie des souris *LysM^{iDTR}* traitées.

Puis, nous avons également mesuré l'expression des gènes *Bmp6* et *Tfr1* dont l'expression est induite par l'augmentation du fer sérique. Nous avons alors observé une légère augmentation des transcrits codant pour le ligand BMP6 ainsi qu'une tendance à la diminution pour *Tfr1* (**Figure 36G et H**). Ces résultats indiquent que la déplétion des macrophages par la DTX a pu entraîner une petite libération de fer dans l'organisme, entraînant alors une légère variation de la transcription de ces gènes. Cependant, cette augmentation de *Bmp6* ne peut expliquer une surexpression aussi forte du gène de l'hepcidine.

En conclusion, nos données démontrent que la suppression spécifique des macrophages pourrait avoir levé un mécanisme inhibiteur de l'hepcidine dans les hépatocytes, entraînant une surexpression de l'hormone. Pour aller plus loin, nous avons évalué l'implication des macrophages dans la régulation de l'hepcidine, lors d'un stress érythropoïétique. Les résultats sont présentés dans la section suivante.

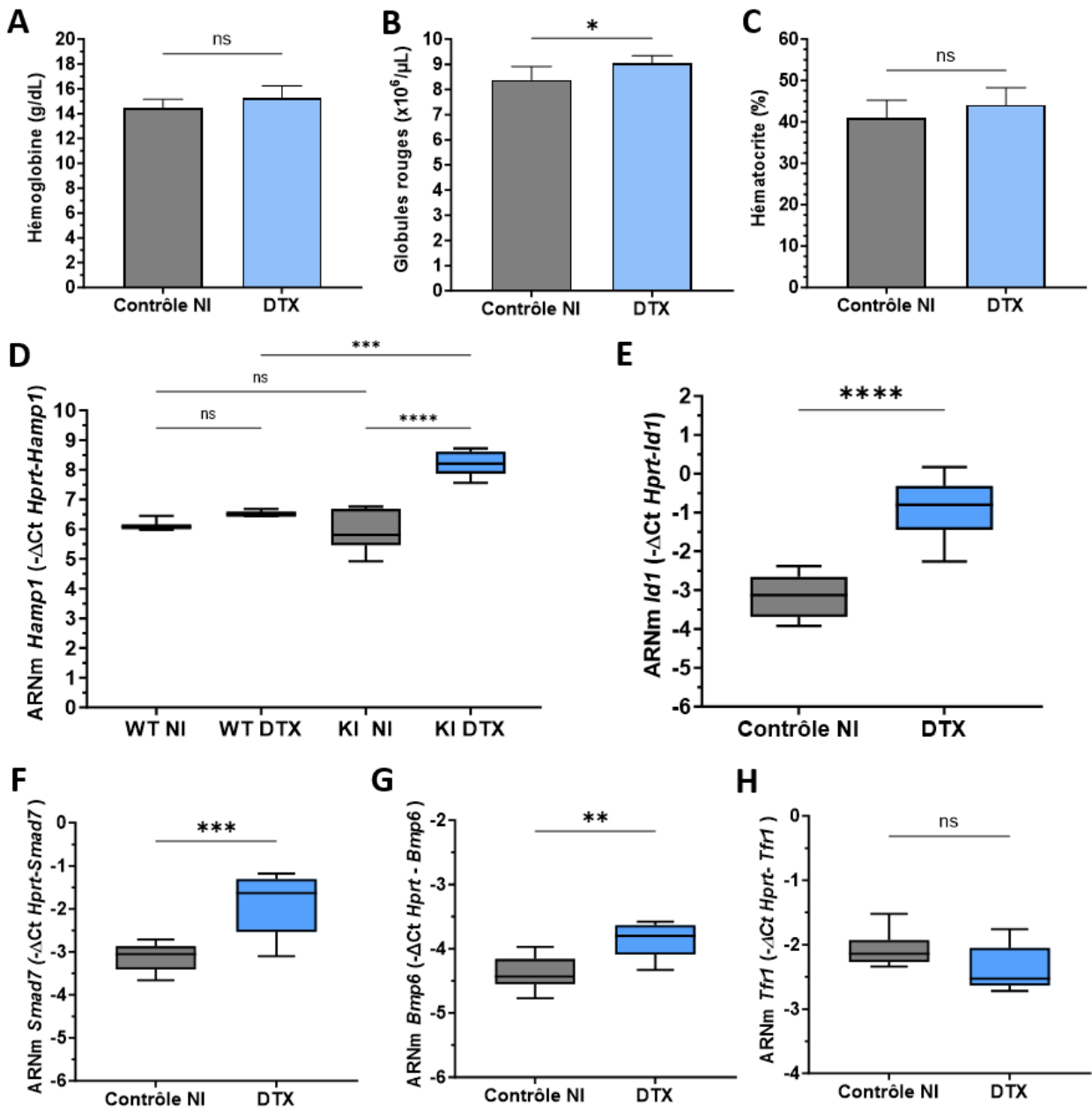


Figure 36 : La déplétion des macrophages par la DTX a induit une très forte surexpression du gène de l'hepcidine dans le foie des souris $LysM^{DTR}$

(A-C) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges, taux d'hémoglobine et hématocrite) avec un analyseur d'hématologie. (D-H) Mesure par PCRq de l'expression des gènes *Hamp1*, *Id1*, *Smad7*, *Bmp6* et *Tfr1* dans le foie des souris $LysM^{DTR}$.

Les moyennes des valeurs des paramètres hématologiques et de ΔCt de PCRq des souris $LysM^{DTR}$ ont été comparées par test t de student. [* : $p < 0.05$ - ** : $p < 0.005$ - *** : $p < 0.0005$ - **** : $p < 0.0001$]

III. Résultats : Effet de la déplétion des macrophages sur la régulation de l'hepcidine hépatique en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie

1. La combinaison des injections de DTX avec les phlébotomies n'altère pas la suppression des macrophages ni l'anémie induite aux souris *LysM^{iDTR}*

Nous avons précédemment caractérisé l'effet de la déplétion des macrophages par la toxine diphtérique sur l'expression de l'hepcidine. Nos résultats décrivent que les macrophages semblent inhiber l'expression de l'hepcidine. Dans ce contexte, nous nous sommes questionnés sur l'implication des macrophages dans la régulation négative de l'hepcidine en réponse au stress érythroïde induit par la phlébotomie. Pour tester cette hypothèse, nous avons appliqué notre protocole de phlébotomie aux souris *LysM^{iDTR}* âgées de 10 à 12 semaines conjointement aux injections de toxine.

Dans un premier temps, nous avons mesuré les différents paramètres hématologiques. Comme attendu, le nombre de globules rouges ainsi que la concentration en hémoglobine étaient diminués en réponse à la phlébotomie (**Figure 37A, B**). Notons que la suppression des macrophages par la DTX, en combinaison avec la phlébotomie, n'a pas généré de différences pour chacun de ces paramètres par rapport au groupe contrôle phlébotomie.

Dans un second temps, nous avons mesuré dans le foie, l'expression de divers gènes exprimés dans les macrophages afin d'évaluer l'efficacité de la suppression de ces derniers lorsque deux phlébotomies étaient effectuées en parallèle. Dans ce contexte, les niveaux de transcrits des gènes *F4/80* et *Timd4* étaient significativement réduits dans le foie des souris ayant reçu la DTX, validant ainsi l'efficacité du modèle (**Figure 37C, D**). De plus, nous avons observé que la combinaison des phlébotomies avec les injections de DTX n'a pas altéré les effets de la toxine puisque l'efficacité de la déplétion était identique entre les groupes « Toxine » et « Phlébotomie + Toxine ».

En conclusion, les injections de DTX, associées aux phlébotomies, n'ont pas d'effet cumulatif sur l'efficacité de la déplétion des macrophages ni sur l'anémie induite.

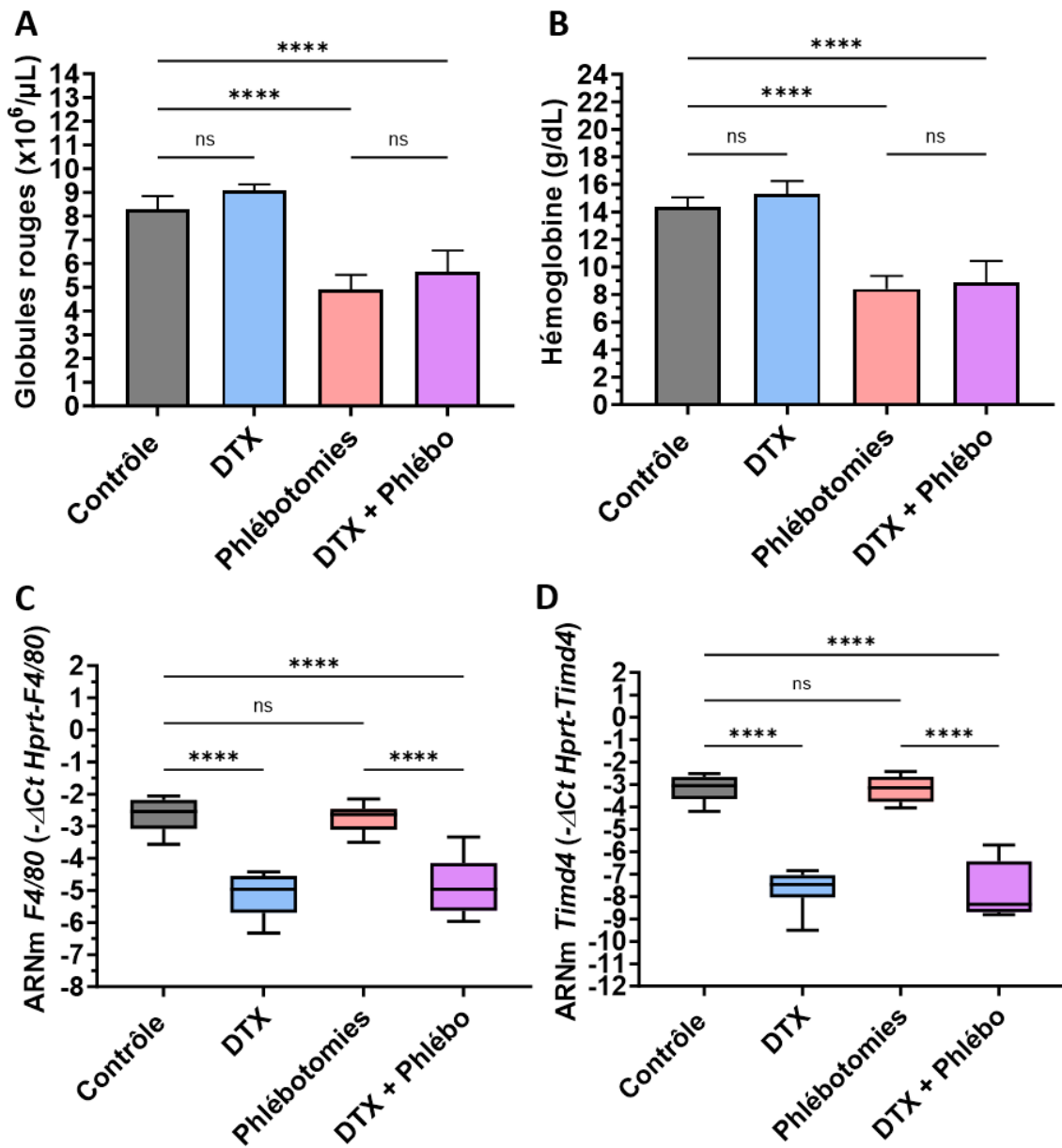


Figure 37 : La déplétion des macrophages n'a pas d'incidence sur les paramètres hématologiques après phlébotomie

(A-B) Mesure des paramètres sanguins (nombre de globules rouges et taux d'hémoglobine) avec un analyseur d'hématologie. (C-D) Analyse par PCRq de l'expression des ARNm des gènes *F4/80* et *Timd4* dans le foie.

Les moyennes des valeurs des paramètres hématologiques et de ΔCt de PCRq des souris *LysM^{DTR}* ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [**** : $p < 0.0001$]

2. La suppression de l'hepcidine par les hépatocytes en réponse à la phlébotomie est totalement abolie en l'absence de macrophages

Afin d'explorer l'implication des macrophages dans la régulation de l'hepcidine en réponse au stress érythroïde, nous avons conjointement réalisé les expériences d'injections de DTX et de phlébotomies, puis mesuré l'expression d'*Hamp1* dans le foie de souris âgées de 10 à 12 semaines. Comme observée précédemment, l'expression de l'hepcidine était augmentée après déplétion des macrophages par la DTX et diminuée en réponse à la phlébotomie (**Figure 38A**). De façon tout à fait intéressante, la combinaison des deux traitements a induit une surexpression de l'hepcidine équivalente à celle observée dans le groupe toxine seule. En effet, les souris ont été incapables d'inhiber l'hepcidine dans un contexte où les macrophages étaient absents. Ces données confirment notre hypothèse selon laquelle les macrophages sont impliqués dans la régulation de l'hormone hépatique, en condition de stress érythroïde.

Nous avons observé les mêmes variations en étudiant l'expression des gènes reflétant l'activité de la voie BMP-SMAD : *id1* et *smad7* (**Figure 38B et C**). En effet, la combinaison des deux traitements a induit une augmentation de ces derniers par rapport au groupe de souris *LysM^{DTR}* non traitées.

Collectivement, ces données démontrent que les macrophages assurent une fonction majeure dans la régulation négative de l'hepcidine lors d'un stress de l'érythropoïèse (induit par les phlébotomies).

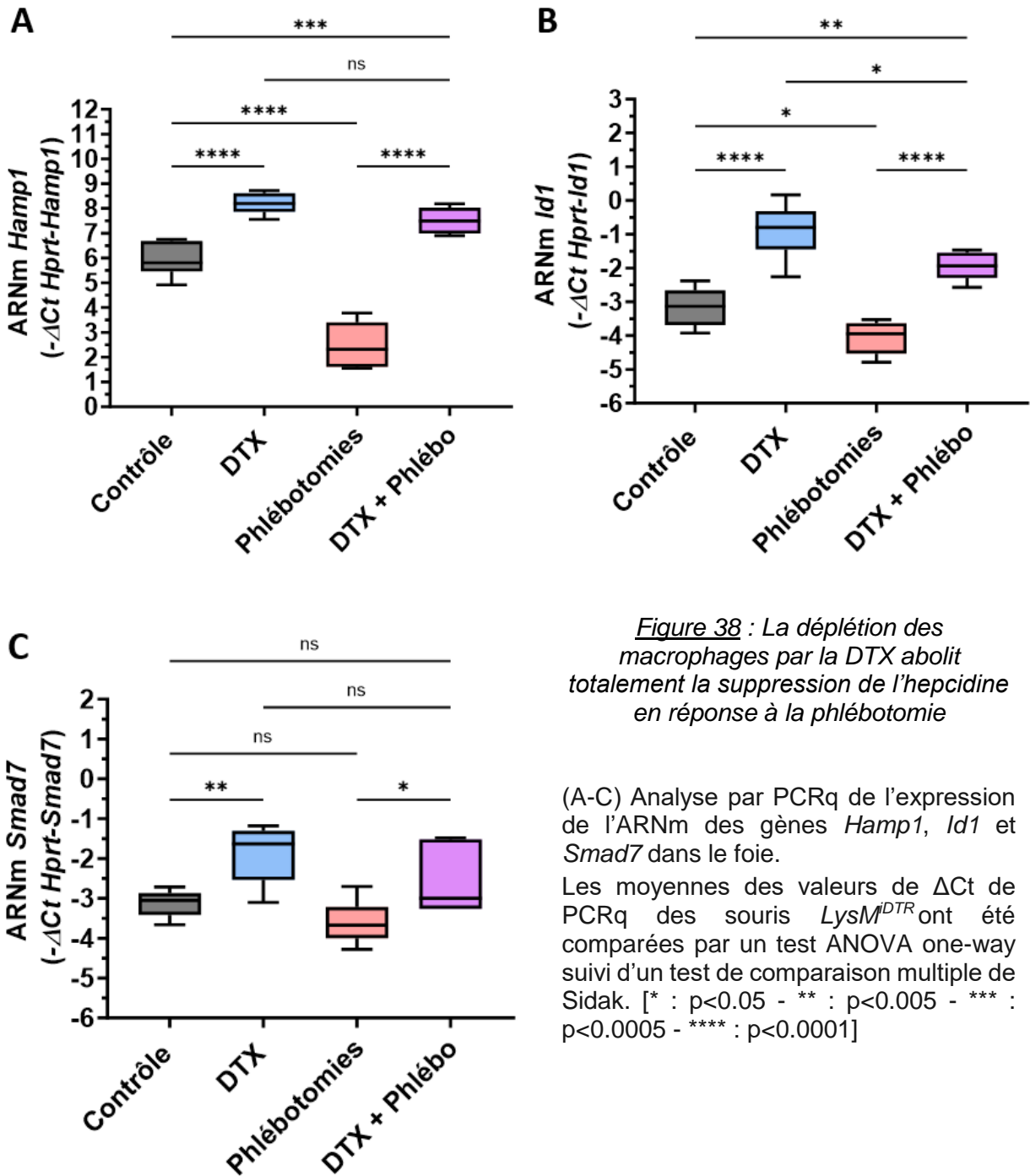


Figure 38 : La déplétion des macrophages par la DTX abolit totalement la suppression de l'hepcidine en réponse à la phlébotomie

(A-C) Analyse par PCRq de l'expression de l'ARNm des gènes *Hamp1*, *Id1* et *Smad7* dans le foie.

Les moyennes des valeurs de ΔCt de PCRq des souris *LysM^{DTR}* ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [* : $p < 0.05$ - ** : $p < 0.005$ - *** : $p < 0.0005$ - **** : $p < 0.0001$]

IV. Résultats : Etude d'un biais inflammatoire associé à la déplétion des macrophages dans le modèle *LysM^{iDTR}*

1. La déplétion des macrophages hépatiques par la DTX induit le recrutement de monocytes pouvant produire des signaux inflammatoires dans le tissu hépatique

Nous avons vu précédemment que les souris *LysM^{iDTR}* surexpriment l'hepcidine en réponse à la déplétion des macrophages. A la lumière de ces résultats, il est possible que les macrophages puissent induire des signaux inhibiteurs de l'expression de l'hepcidine dans le foie et que ces signaux aient été abolis avec la mort de ces cellules, entraînant ainsi cette surexpression. Cependant, il est connu que l'hepcidine peut être stimulée dans des conditions inflammatoires, par une voie dépendante de la signalisation JAK-STAT. Il est également connu qu'une augmentation de la mort cellulaire dans un tissu est associée à la libération de débris moléculaires appelés DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns). Ces molécules agissent alors comme des signaux d'alarme qui peuvent entraîner une réponse immunitaire innée.

Dans ce contexte, afin de valider totalement nos conclusions sur l'inhibition de l'hepcidine hépatique par les macrophages, nous avons dû évaluer si les injections de DTX peuvent induire une inflammation locale dans le tissu. Pour cela, nous avons étudié divers paramètres en se basant sur des analyses moléculaires et protéiques par des approches de PCR quantitative, western blot et cytométrie en flux.

Tout d'abord, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de monocytes classiques (identifiés comme CD45+ ; Lin- ; Cd11b+ ; Ly6C++) dans le foie des souris *LysM^{iDTR}*, 12h après les injections de la toxine (**Figure 39A**). Cette infiltration était associée à la production de la molécule chimio-attractante CCL2 puisque nous avons également observé une augmentation significative de l'expression du gène codant pour la chimiokine dans le foie (**Figure 39B**). Ces données témoignent que la suppression des macrophages hépatiques par la DTX a activé un mécanisme induisant la production de la chimiokine CCL2 pour recruter des

monocytes dans le foie, ce qui pourrait également expliquer l'augmentation des niveaux de transcrits *Ly6C* et *CD11b* (**Figure 39C et D**).

D'autre part, pour évaluer une possible inflammation associée à l'infiltration de monocytes, nous avons quantifié l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans le tissu hépatique des souris. Nous avons alors observé une augmentation des niveaux de *Tnfa* et une diminution de l'*Il1b*. L'expression de l'*Il6* était inchangée (**Figure 39E, F et G**).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats démontre que la déplétion des macrophages par la DTX a induit la production de signaux entraînant le recrutement de monocytes classiques dans le foie des souris associée à la production de TNF α . Dans la partie suivante nous avons évalué plus précisément les conséquences de cette légère inflammation sur l'expression de l'hepcidine.

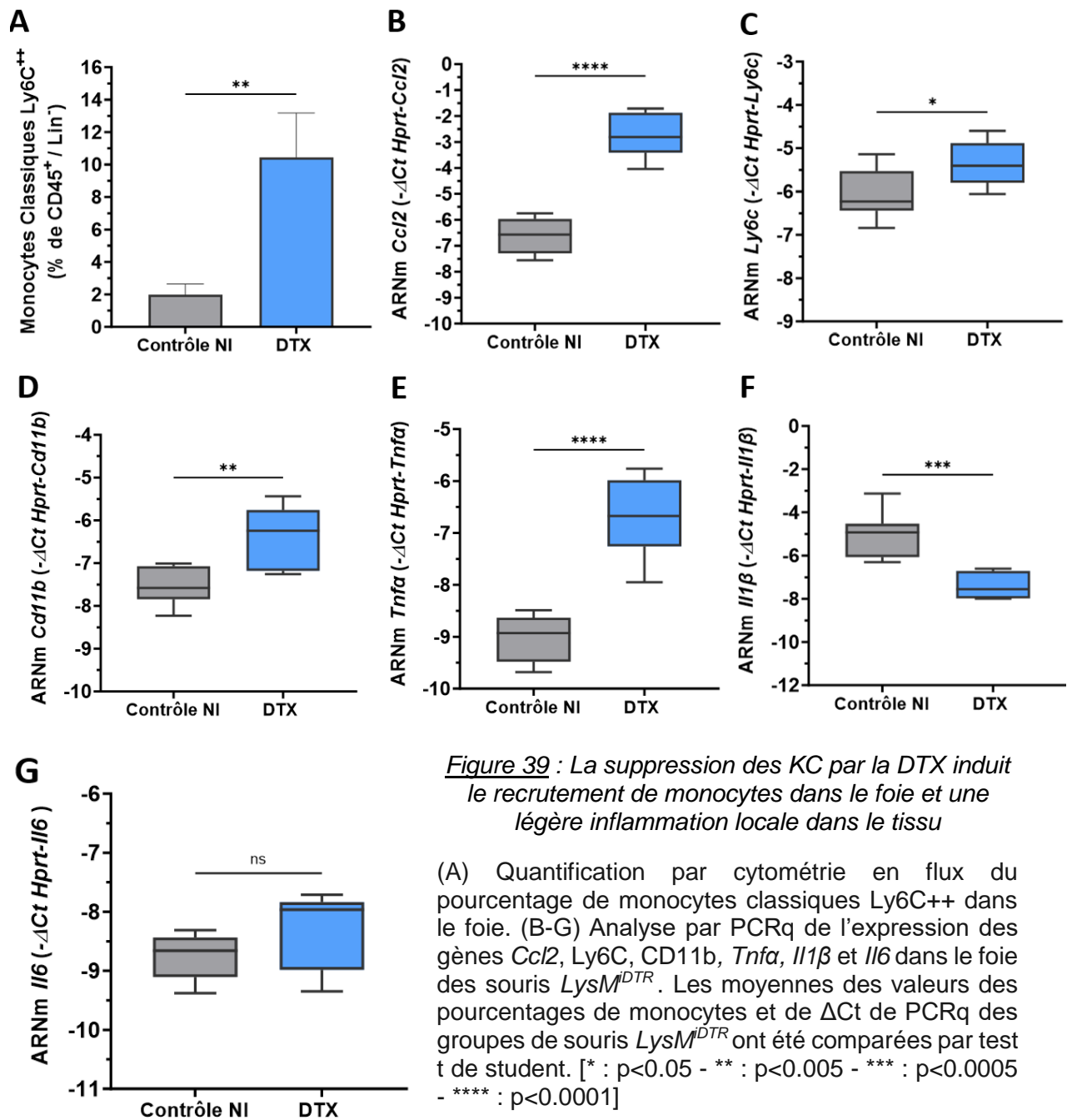


Figure 39 : La suppression des KC par la DTX induit le recrutement de monocytes dans le foie et une légère inflammation locale dans le tissu

(A) Quantification par cytométrie en flux du pourcentage de monocytes classiques Ly6C⁺⁺ dans le foie. (B-G) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Ccl2*, *Ly6c*, *CD11b*, *Tnfa*, *Il1β* et *Il6* dans le foie des souris *LysM^{DTR}*. Les moyennes des valeurs des pourcentages de monocytes et de $\Delta\Delta\text{Ct}$ de PCRq des groupes de souris *LysM^{DTR}* ont été comparées par test t de student. [* : $p < 0.05$ - ** : $p < 0.005$ - *** : $p < 0.0005$ - **** : $p < 0.0001$]

2. L'inflammation associée à la déplétion des macrophages ne peut expliquer une augmentation aussi importante de l'expression de l'hepcidine hépatique

Pour évaluer l'effet de la DTX sur la stimulation de l'expression de l'hepcidine par l'inflammation, nous avons mesuré les niveaux de phosphorylation de la protéine STAT3. Cette dernière est un facteur de transcription de la voie de signalisation JAK/STAT qui induit la transcription de l'hepcidine en réponse à un stimulus inflammatoire. Afin d'obtenir un contrôle positif d'inflammation et ainsi établir un point de comparaison, nous avons réalisé des injections de LPS à des souris WT à différents temps avant sacrifice. Nous avons utilisé cette approche car il est connu que le LPS stimule l'expression de l'hepcidine par STAT3.

Ainsi, le foie des souris a été prélevé après injection de DTX et les protéines ont été extraites. Nous avons alors quantifié les niveaux de P-STAT3. Dans ce contexte, nous avons observé que les niveaux de P-STAT3 des souris *LysM^{iDTR}* étaient augmentés après injection de DTX (**Figure 40A**). Cependant, ces niveaux étaient toutefois bien moins importants en comparaison de ceux observés après injection de LPS, 2h ou 15h avant sacrifice.

Il est intéressant de préciser que c'est à 4 heures que le pic d'induction de l'expression de l'hepcidine par le LPS est observé²⁵⁹. A ce temps précis, la phosphorylation de STAT3 dans le foie des souris LPS est beaucoup plus forte que dans les conditions d'injections de DTX (données non présentées). Toujours à ce point précis (LPS 4h), l'expression de l'hepcidine n'a jamais été aussi élevée en comparaison avec l'expression observée en réponse à la DTX. Cela suggère une fois de plus, que l'augmentation de l'hepcidine observée après administration de DTX, ne peut pas être expliquée par l'inflammation.

Toutefois, nous avons voulu évaluer plus précisément l'impact de la DTX sur l'activation de la voie JAK-STAT et l'expression de l'hepcidine. Nous avons remarqué que les niveaux de P-STAT3 semblait équivalents à ceux observés dans le foie des souris injectées avec du LPS 24h avant prélèvement. De ce fait, nous avons décidé

de mener différentes expériences en gardant la condition « LPS 24h » comme élément de comparaison pour la suite de nos analyses.

Nous avons ensuite mesuré l'expression du gène cible de la voie pro-inflammatoire JAK/STAT : *Socs3*, celui-ci était augmenté dans des proportions similaires dans les conditions toxine ou LPS 24h par rapport au groupe contrôle (**Figure 40B**). En revanche, l'expression du gène *Saa3* était bien plus induite après LPS par rapport à la DTX suggérant que les stimuli inflammatoires entre les deux groupes n'étaient pas du même niveau (**Figure 40C**).

Enfin, nous avons comparé les niveaux d'hepcidine entre les groupes « toxine » et « LPS 24h ». Nous avons observé que l'expression d'*hamp1* était nettement supérieure dans le groupe de souris dont les macrophages ont été supprimés par rapport au groupe de souris injectées au LPS (**Figure 40D**). Les mêmes résultats ont été obtenus en mesurant l'expression d'*id1* (**Figure 40E**).

Collectivement, l'ensemble de ces données indique que la surexpression de l'hepcidine en réponse à la DTX ne peut être expliquée par un mécanisme inflammatoire et qu'il pourrait exister un mécanisme inhibiteur provenant des macrophages.

Dans la suite de nos travaux, nous avons cherché à comprendre comment ces macrophages pourraient réguler l'hepcidine afin de mettre en évidence ce mécanisme d'inhibition. Ainsi, nous avons posé l'hypothèse qu'un facteur inhibiteur pourrait être sécrété par les macrophages pour induire une baisse de l'hepcidine dans les hépatocytes.

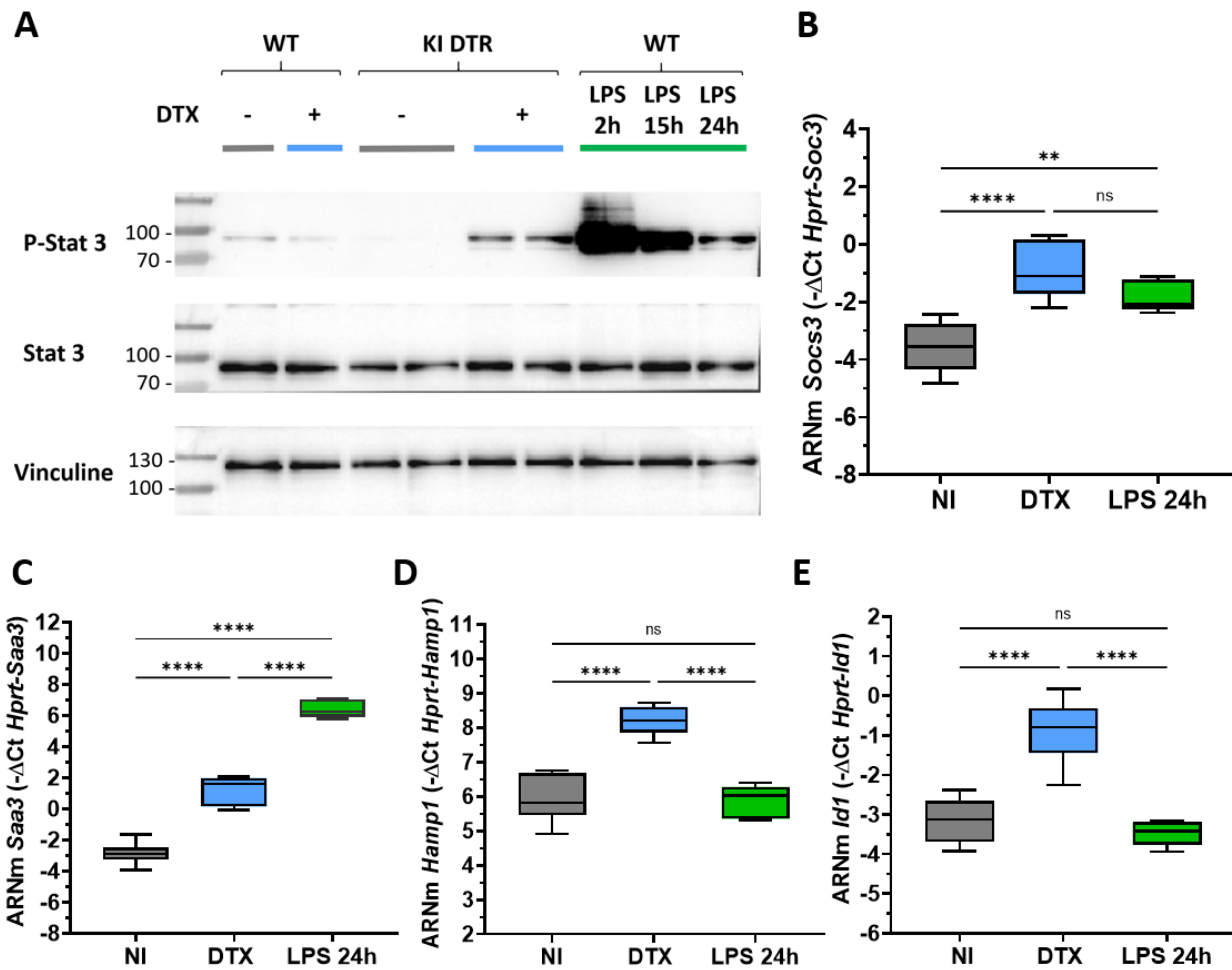


Figure 40 : L'inflammation associée à la suppression des cellules de Kupffer ne peut expliquer une augmentation aussi importante de l'expression de l'hepcidine hépatique

(A) Analyse par western blot de la phosphorylation de la protéine STAT3 dans le foie des souris $LysM^{DTR}$ WT et KI, après injections de DTX et dans le foie de souris WT après une injection i.p de LPS (1 μ g/g) à différents temps avant prélèvement des organes. (B) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Socs3*, *Saa3*, *Hamp1* et *Id1* dans le foie des souris $LysM^{DTR}$ WT et KI.

Les moyennes des valeurs de Δ Ct de PCRq des souris de la cohorte $LysM^{DTR}$ ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [** : p<0.005 - **** : p<0.0001]

V. Résultats préliminaires : Effet des macrophages sur la régulation de l'hepcidine hépatocytaire : mise en évidence *in vitro* de la sécrétion de signaux inhibiteurs

1. Stratégie *in vitro* pour étudier la sécrétion d'une molécule inhibitrice par les macrophages

Nous avons émis l'hypothèse qu'un facteur pourrait être sécrété par les macrophages, exerçant alors une action inhibitrice de manière paracrine sur l'hepcidine hépatocytaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à développer un modèle *in vitro* basé sur des cultures de macrophages dérivés de la moelle osseuse ou BMDM et d'hépatocytes primaires (HP). Ces cultures sont décrites dans la section méthodologie de ce manuscrit. Pour des raisons techniques, nous avons d'abord décidé de réaliser des cultures cellulaires séparées.

Le principe de l'expérience repose sur la culture de BMDM afin de prélever leur surnageant et ainsi utiliser ce milieu conditionné pour stimuler des hépatocytes primaires. Plus précisément, des BMDM ont été cultivés pendant 6 jours puis nous avons changé le milieu et cultivé ces macrophages 24h de plus dans un milieu contenant alors 0,1% SVF. Nous avons choisi de travailler dans un milieu pauvre en SVF car ce dernier, qui est ensuite utilisé pour stimuler des hépatocytes, contient des molécules pouvant agir sur l'expression de l'hepcidine et donc créer un biais expérimental. Au bout des 24h, nous avons prélevé le milieu conditionné de ces BMDM afin de stimuler les hépatocytes pendant 12h, avec deux stratégies possibles (**Figure 41A et B**).

Ainsi, nous avons d'une part, stimulé directement les hépatocytes avec le surnageant des BMDM (**Figure 41A**) ou d'autre part stimulé les hépatocytes après avoir préalablement concentré le surnageant et ajouté celui-ci à du milieu frais (**Figure 41B**). Le surnageant concentré a été ajouté dans du milieu comparable aux milieux utilisés comme contrôle contenant 0,1% ou 10% de SVF. De cette façon, cela permet de conserver l'ensemble des molécules potentiellement produites par les macrophages tout en maintenant les mêmes concentrations de molécules présentes

dans le SVF qui auraient pu être consommées par les BMDM et faire artificiellement varier l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes.

Notons également que dans les deux approches expérimentales, nous avons ajouté une dose de protéine BMP2 dans le milieu de culture afin d'explorer un mécanisme dépendant d'une inhibition de la voie BMP-SMAD.

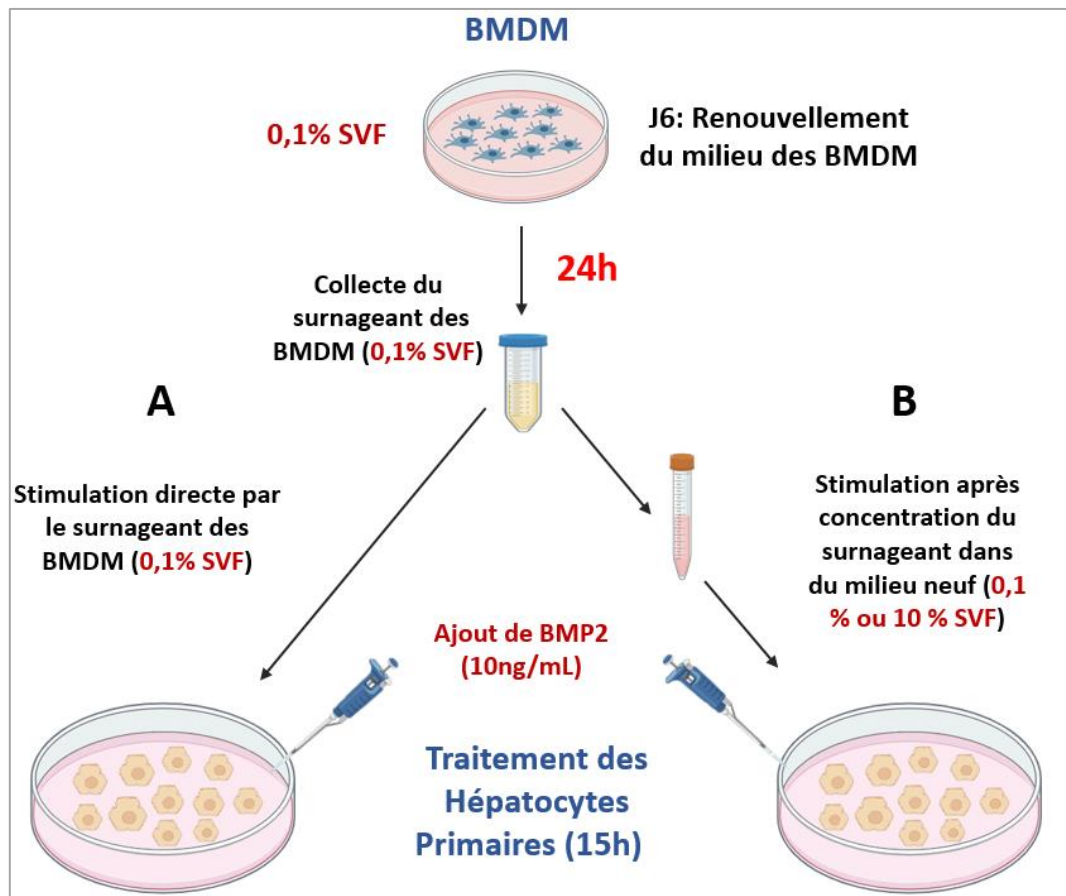


Figure 41 : Modèle in vitro permettant d'étudier la production d'un inhibiteur de l'hepcidine des hépatocytes par les macrophages (BMDM)

Le milieu de culture des BMDM a été renouvelé à J6 de culture avec 0,1% de SVF pendant 24h puis collecté et (A) utilisé pour stimuler directement les HP avec ajout ou non de 10ng/mL de BMP2 ou (B) concentré et re-suspendu dans du milieu DMEM neuf contenant 0,1% ou 10% de SVF avant d'être utilisé pour stimuler les HP avec ajout ou non de 10ng/mL de BMP2 recombinant. Dans les deux conditions les HP ont été stimulés pendant toute une nuit avec les milieux conditionnés de BMDM.

2. Les macrophages produisent une molécule qui inhibe l'expression de l'hepcidine

Tout d'abord, nous avons mesuré les niveaux d'expression des gènes *Hamp1* et *id1* en réponse aux stimulations par les différents milieux et surnageants de culture. Comme attendu, la mise en culture des hépatocytes dans du milieu contrôle, contenant 10% de SVF, a induit une augmentation significative de l'expression de l'hepcidine (**Figure 42A**). Cette expression était encore plus élevée lorsque le milieu contenait 0,1% de SVF et 10ng/mL de BMP2 (**Figure 42A**). Nous avons fait les mêmes observations concernant les niveaux de transcrits du gène *id1* (**Figure 42B**).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes après stimulation de ces derniers par du surnageant de BMDM. Nous avons d'abord étudié les niveaux d'hepcidine des hépatocytes stimulés par du surnageant de macrophages qui contenait 0,1% de SVF. Nous avons alors observé que dans les deux conditions de stimulation (directe ou après concentration dans du milieu frais), l'expression d'*hamp1* et d'*id1* était identique au groupe stimulé par du milieu contrôle (**Figure 42A et B**).

Puis, nous avons étudié l'expression de l'hepcidine après stimulation par du surnageant de BMDM concentré dans du milieu riche en SVF (10%). De façon tout à fait intéressante, nous avons alors observé que l'induction de l'expression de l'hepcidine était réduite par rapport au groupe traité avec du milieu SVF 10% contrôle (**Figure 42A**). De plus, nous avons fait la même observation en mesurant les transcrits codant pour *id1* (**Figure 42B**). Ces données suggèrent qu'une molécule a pu être sécrétée par les macrophages et inhibe l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes en agissant sur la voie des BMP.

Enfin, pour confirmer l'effet inhibiteur du milieu des BMDM par une voie dépendante des BMP, nous avons étudié l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes primaires après traitement par du surnageant de BMDM appauvri en SVF mais supplémenté en BMP2. Dans ce contexte, nous avons alors observé que l'induction de l'expression d'*Hamp1* dans les HP était significativement réduite par rapport au groupe contrôle (**Figure 42A**). Notons que cette diminution de la réponse

des HP a été observée dans les deux conditions de stimulation. De plus, nous avons fait les mêmes observations pour le gène d'*id1* (**Figure 42B**). Ces données confirment que le facteur inhibiteur agit sur l'axe BMP2 / BMPR-SMAD.

En conclusion, nos données démontrent que les macrophages pourraient inhiber l'expression de l'hepcidine en sécrétant une molécule qui agit sur la voie de signalisation BMP-SMAD des hépatocytes. Notons que ces résultats restent préliminaires et demandent à être confirmés en répliquant les expérimentations.

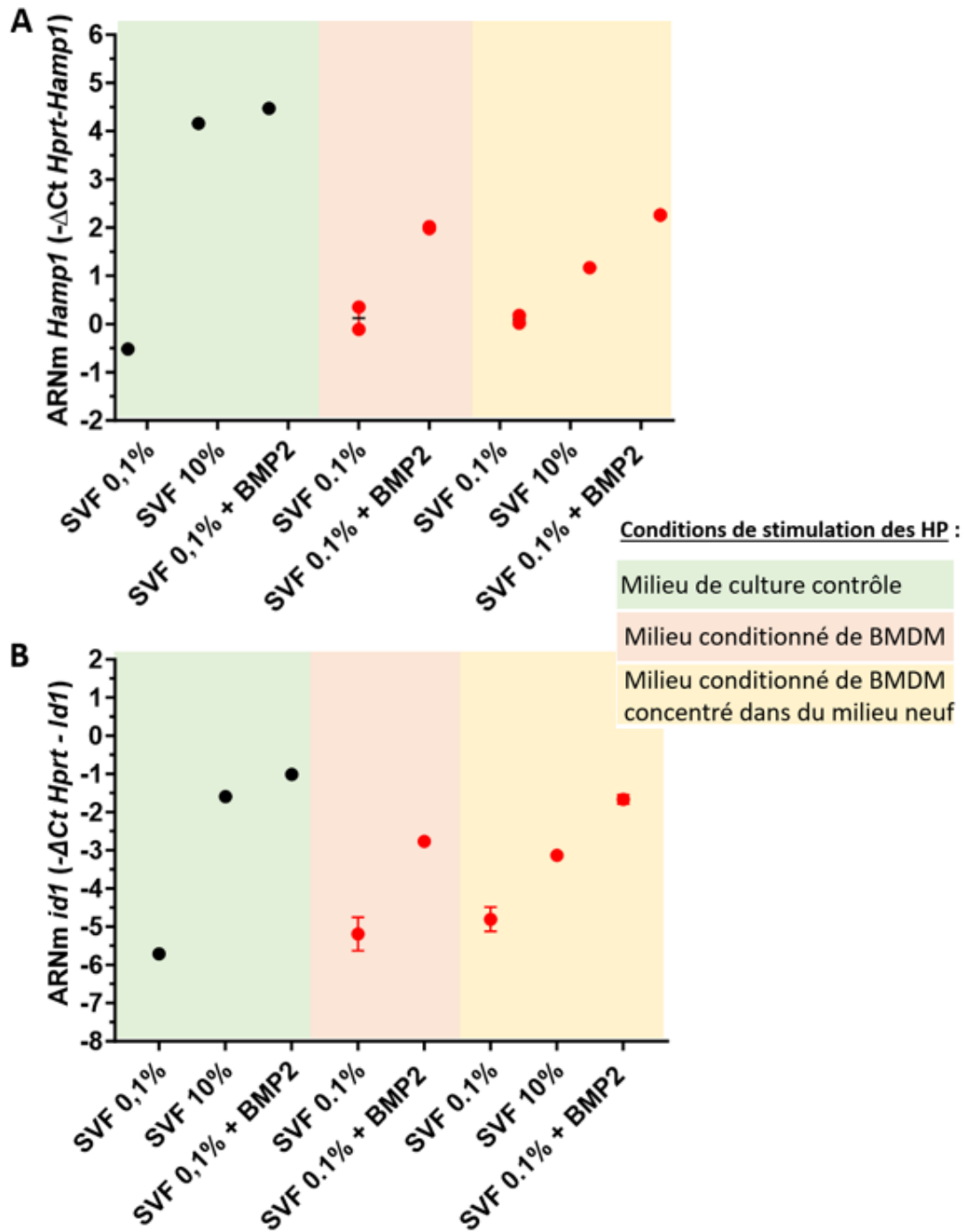


Figure 42 : La stimulation des hépatocytes par du surnageant de culture de BMDM inhibe l'expression de l'hepcidine par une voie qui semble dépendante de la signalisation BMP-SMAD

(A-B) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Hamp1* et *Id1* dans les HP après traitement de ces derniers par du milieu conditionné issu de la culture de BMDM et ajout d'une dose de BMP2.

VI. Conclusion

Les travaux présentés dans cette section portaient sur l'étude du rôle des macrophages dans la régulation de l'hepcidine. Nos résultats, obtenus à partir de la cohorte de souris PAR₂ flox /LysM Cre, avaient soulevé la question de l'implication des macrophages sur le contrôle de l'hepcidine systémique.

Ainsi, nous avons alors émis l'hypothèse que ces cellules phagocytaires pourraient être directement impliquées dans la régulation de l'hepcidine dans le foie. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle permettant de supprimer spécifiquement les macrophages de façon inductible, sans affecter les autres cellules : le modèle de souris *LysM^{flDTR}*

Nos résultats ont alors démontré que la suppression des macrophages a induit une surexpression très forte de l'hepcidine. Nous avons ensuite évalué que cette augmentation n'était pas liée à une activation de la voie pro-inflammatoire de l'hepcidine, confirmant alors le rôle majeur des macrophages dans la régulation de l'hepcidine.

Pour aller plus loin, nous avons alors voulu tester l'implication des macrophages sur la régulation de l'hepcidine lors d'un stress érythroïde. Dans ce contexte, nous avons montré le rôle fondamental de ces cellules dans la régulation négative de l'hormone hépatique car une absence totale d'inhibition a été observée en réponse aux phlébotomies.

Enfin, nous avons cherché à caractériser ce mécanisme d'inhibition. Pour cela, nous avons cherché à évaluer si un facteur pouvait être produit par les macrophages et agir de façon paracrine sur les hépatocytes. Nos résultats préliminaires *in vitro* montrent que les macrophages semblent sécréter une molécule qui inhibe l'hepcidine hépatocytaire en agissant sur la voie de signalisation BMP-SMAD.

En conclusion, l'ensemble de nos données démontre l'implication majeure des macrophages dans la régulation de l'hepcidine systémique via un mécanisme sécrétoire

Partie 4 (Projet secondaire) : Exploration du rôle de la Matriptase-2 hépatocytaire dans la régulation de l'hepcidine

I. Introduction, hypothèse et axes de recherches

En parallèle de mon projet principal portant sur la caractérisation du rôle de PAR2 et des macrophages dans la régulation de l'hepcidine, un projet secondaire a été conduit pour explorer le rôle précis de la matriptase-2 hépatocytaire dans la régulation de l'hepcidine systémique. La matriptase-2 est une sérine protéase exprimée principalement dans le foie. Son action inhibitrice sur l'hepcidine via l'inhibition de la voie BMP-SMAD a déjà été décrite dans la littérature et des mutations de cette dernière provoquent une anémie ferriprive appelée IRIDA (Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia) chez l'Homme. Aujourd'hui, le mécanisme précis par lequel la MT2 inhibe l'hepcidine est encore mal compris et bien que plusieurs hypothèses aient été testées, aucune réponse précise sur son mode de fonctionnement n'a pu clairement être apportée. Certaines données suggèrent même que son mode d'action est indépendant de son activité catalytique²⁶⁰. Par ailleurs, la matriptase-2 n'est pas exclusivement exprimée dans les hépatocytes et des traces peuvent être retrouvées dans d'autres tissus notamment dans le rein ou le cerveau. À ce jour, il n'a donc toujours pas été montré clairement que la régulation négative de l'hepcidine systémique par la MT2 soit contrôlée principalement par sa localisation hépatocytaire.

Dans cette dernière partie, nous posons l'hypothèse que l'inhibition de la voie BMP-SMAD par la MT2 s'effectue depuis son expression dans les hépatocytes. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle *in vivo* où la MT2 est spécifiquement supprimée des cellules parenchymateuses du foie (les souris *Tmprss6^{Alb}*). Nous avons alors comparé les résultats obtenus sur les souris *Tmprss6^{Alb}* avec ceux issus des *Tmprss6^{-/-}* pour déterminer si une délétion spécifique de la MT2 dans les hépatocytes suffit à récapituler entièrement celui du KO ubiquitaire.

Le premier axe de résultats porte sur la caractérisation de l'impact d'une telle délétion sur le phénotype des souris *Tmprss6^{Alb}*. L'étude de divers paramètres associés au métabolisme du fer a permis de conclure que la délétion de *Tmprss6* dans les hépatocytes engendre une anémie ferriprive à un degré identique aux souris *Tmprss6^{-/-}*.

Dans un second temps, nous avons analysé la régulation de l'hepcidine en réponse à une dose d'EPO. En effet, Il est connu que l'hepcidine est inhibée par les facteurs érythroïdes tels que l'érythroferrone, en réponse à l'EPO produite par les reins. Il est aussi connu que la déficience en MT2 abolit l'inhibition de l'hepcidine en réponse à une injection d'EPO suggérant que l'hyper activation de la voie BMP-SMAD rend inefficace le rôle d'ERFE. Nous avons donc comparé les niveaux d'hepcidine et la production d'*Erfe* des souris *Tmprss6^{Alb}* avec ceux des *Tmprss6^{-/-}*.

En résumé, nous montrons dans cette partie que la matriptase-2 régule le métabolisme du fer via l'inhibition de l'hepcidine, depuis sa localisation hépatocytaire.

II. Résultats : Effet d'une délétion spécifique du gène *Tmprss6* dans les hépatocytes

1. La délétion spécifique de *Tmprss6* dans les hépatocytes induit une surexpression de l'hepcidine à des niveaux identiques aux souris KO total

Les souris *Tmprss6^{flx/flx}* ont été croisées avec des souris exprimant l'enzyme CRE-Recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine (*Alb*), qui permet la délétion du gène spécifiquement dans les hépatocytes. Ce croisement a donc permis de générer les souris *Tmprss6^{Alb}* (**Figure 43A**). Ces dernières, âgées de 9 à 12 semaines, ont été étudiées et comparées aux littermates *Tmprss6^{+/+}* du même âge. Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de la délétion en mesurant les niveaux de transcrits du gène *Tmprss6* dans le foie. Nous avons alors observé une diminution significative des niveaux d'expression du gène dans les souris *Tmprss6^{Alb}* par rapport à leurs homologues WT (**Figure 43B**). La baisse des niveaux de transcrits du gène de la MT2 était corrélée avec le phénotype d'alopécie chez les souris *Tmprss6^{Alb}* suggérant qu'une déplétion hépatocytaire de la MT2 est suffisante pour induire le même phénotype macroscopique observé dans la cohorte *Tmprss6^{-/-}* (**Figure 43C**). Il est connu que l'alopécie peut-être la conséquence d'une anémie, en raison du manque d'oxygène nécessaire à la croissance du follicule pileux. Ainsi nous avons donc cherché à caractériser celle-ci dans la partie suivante.

Les niveaux d'hepcidine hépatique ont ensuite été mesurés dans le foie des souris. La délétion de la MT2 dans les hépatocytes a induit une surexpression de l'hepcidine à des niveaux identiques aux souris *Tmprss6^{-/-}* (**Figure 43D**). Nous avons fait la même observation en quantifiant les transcrits du gène *Id1* (**Figure 43E**).

Collectivement, ces données indiquent qu'une délétion spécifique de la MT2 dans les hépatocytes induit le même phénotype de surproduction de l'hepcidine, et une activité anormalement plus élevée de la voie BMP-SMAD dans le foie des souris.

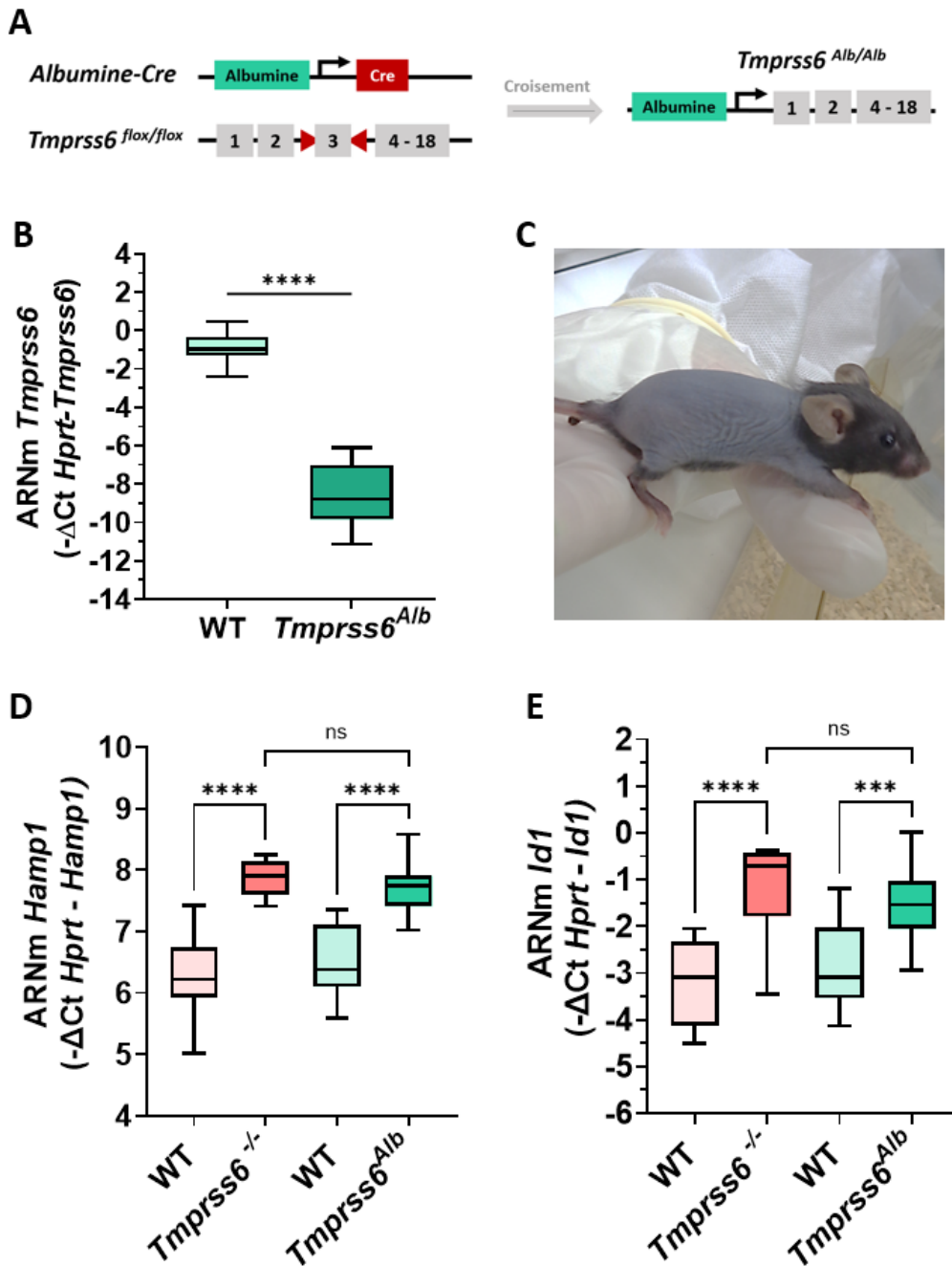


Figure 43 : Les souris *Tmprss6^{Alb}* surexpriment l'hepcidine à des niveaux identiques au KO total

(A) Construction génique des souris *Tmprss6^{Alb}*. Les souris *Alb^{Cre}* qui expriment la Cre-Recombinase sous le contrôle du promoteur du gène de l'albumine ont été croisées avec les souris *Tmprss6^{flox/flox}* qui expriment des séquences LoxP bornant l'exon 3 du gène *Tmprss6*. Le croisement des souris conduit à la délétion de l'exon 3 et à l'inactivation de *Tmprss6* dans les hépatocytes. (B) Validation par PCRq de la délétion de *Tmprss6* dans le foie des souris *Tmprss6^{Alb}*. (C) Cliché d'une souris *Tmprss6^{Alb}* souffrant d'alopecie. (D-E) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Hamp1* et *Id1* dans le foie des souris *Tmprss6^{Alb}* et *Tmprss6^{-/-}*.

Les moyennes des valeurs de ΔCt de PCRq des souris de la cohorte *Tmprss6^{Alb}* ont été comparées par un test t de student et celles des valeurs de ΔCt de PCRq des souris *Tmprss6^{Alb}* et *Tmprss6^{-/-}* par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. [**** : p<0.0001]

2. La délétion spécifique de *Tmprss6* dans les hépatocytes récapitule en totalité le phénotype d'anémie ferriprive, décrit chez les KO total

Nous avons vu précédemment que les niveaux des transcrits d'hepcidine étaient anormalement élevés dans le foie des souris *Tmprss6^{Alb}*. Nous n'avons cependant pas mesuré les niveaux sériques de l'hormone dans les différents groupes de souris. Il était donc important d'effectuer des analyses supplémentaires pour caractériser les conséquences de cette surexpression vis-à-vis des deux modèles. Dans les deux cas, ces souris souffraient d'alopecie, ce qui comme expliqué précédemment, est un témoin de l'anémie. Ainsi, pour mesurer cette anémie et caractériser son origine, nous avons mesuré les niveaux de fer dans l'organisme de ces souris, nous avons également quantifié divers paramètres hématologiques.

Tout d'abord, nous avons dosé la concentration en fer dans le sérum des souris, celle-ci était réduite à des niveaux extrêmement bas dans les deux groupes de souris (**Figure 44A**). Le contenu en fer hépatique a également été quantifié, nous avons observé une diminution très forte des niveaux de fer dans le foie des souris KO pour la MT2 (**Figure 44B**). Il est important de préciser que la diminution observée était identique entre les deux groupes de souris. Ces résultats sont en accord avec nos observations sur les niveaux d'expression d'hepcidine observés dans la partie précédente.

Conjointement aux dosages de concentration en fer, nous avons mesuré les paramètres hématologiques et avons observé une diminution significative de la concentration en hémoglobine, du volume moyen des globules rouges ainsi que de l'hématocrite, de façon équivalente dans les deux modèles de délétion de la MT2 (**Figure 44C, D et E**). Le nombre de globules rouges était inchangé (**Figure 44F**).

Collectivement, ces données suggèrent que la diminution de la biodisponibilité du fer liée à la surexpression de l'hepcidine a réduit la production d'hémoglobine

induisant en conséquence l'anémie et la diminution de la taille des globules rouges. Pris ensemble, nos résultats démontrent que la délétion de la MT2 dans les hépatocytes induit une anémie ferriprive microcytaire à un degré identique aux souris *Tmprss6*^{-/-}.

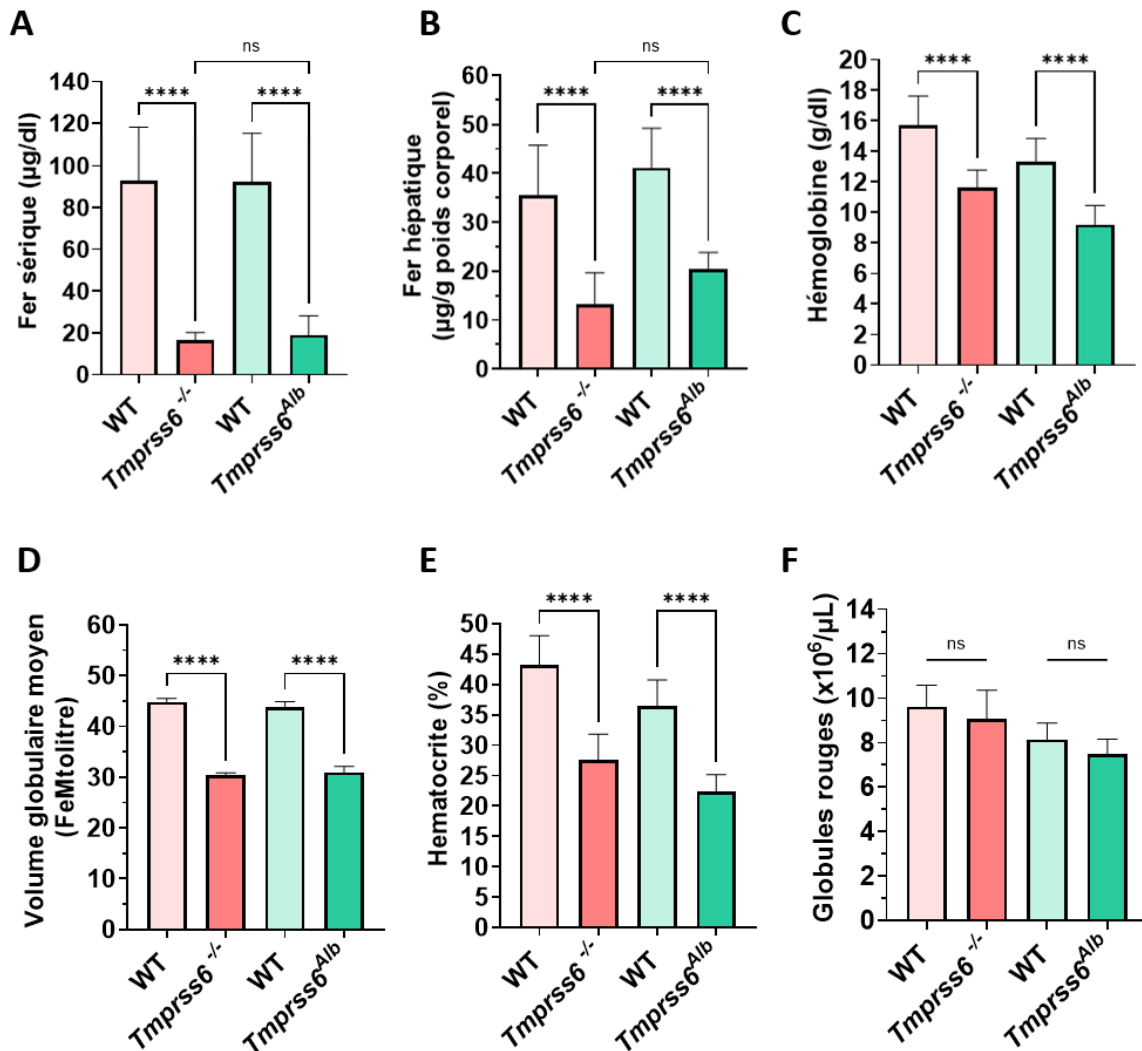


Figure 44 : La délétion de la MT2 dans les hépatocytes récapitule entièrement l'anémie ferriprive microcytaire du KO ubiquitaire

(A-B) Mesure du contenu en fer sérique et hépatique des souris *Tmprss6*^{Alb} et *Tmprss6*^{-/-}. (C-F) Mesure des paramètres sanguins (taux d'hémoglobine, volume globulaire moyen, hématocrite et nombre de globules rouges) avec un analyseur d'hématologie.

Les moyennes des valeurs du dosage du fer et des paramètres hématologiques ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak. [**** : p<0.0001]

3. La déficience en MT2 hépatocytaire des souris *Tmprss6^{Alb}* abolit la suppression de l'hepcidine médiée par l'EPO

Nous avons montré dans les parties précédentes que la surexpression de l'hepcidine dans le foie des souris *Tmprss6^{-/-}* et *Tmprss6^{Alb}* entraîne une anémie mycrocytaire ferriprive. Des données de la littératures décrivent qu'un KO ubiquitaire de la MT2 abolit totalement la suppression de l'hepcidine en réponse à l'EPO. De plus, les niveaux d'EPO sont augmentés chez les souris *Tmprss6^{-/-}*, suggérant que le mécanisme de détection de l'anémie reste efficace lorsque la MT2 est supprimée¹³⁵. Ainsi, nous avons réalisé les mêmes expériences de traitement à l'EPO dans notre modèle de délétion spécifique pour mesurer si l'absence de *Tmprss6* dans le parenchyme hépatique est suffisante pour abolir la suppression de l'hepcidine par l'axe EPO/ERFE. Pour cela, 200U d'EPO recombinante ont été injectées aux souris KO tissu-spécifique et KO total puis le foie des souris a été prélevé 15h après injection.

Dans un premier temps, nous avons mesuré les niveaux de transcrits du gène de l'hepcidine. Comme attendu, une surexpression a été observée chez les KO par rapport à leurs homologues WT (**Figure 45A**). Nous avons ensuite mesuré l'hepcidine après injection d'EPO et avons observé qu'en accord avec ce qui est connu, les souris *Tmprss6^{+/+}* présentent une forte diminution de l'expression de l'hepcidine en réponse à l'injection de l'hormone rénale. En revanche, de façon identique aux souris *Tmprss6^{-/-}*, les individus *Tmprss6^{Alb}* présentaient une absence totale de réponse à l'EPO puisqu'aucune diminution n'as été observée entre les groupes KO traités par rapport aux KO non traités.

Ensuite, nous avons également mesuré les niveaux d'expression du gène cible de la voie BMP-SMAD : *id1*. Comme attendu, l'expression du gène était augmentée dans les deux modèles de souris KO par rapport aux groupes « contrôles » suggérant une sur-activation de la voie BMP-SMAD lorsque la MT2 est absente. A l'inverse, nous avons observé une diminution de ce marqueur dans les souris WT après traitement à l'EPO, ce qui était également attendu (**Figure 45B**). Curieusement, une légère diminution a été observée dans le foie des souris *Tmprss6^{Alb}* après traitement par rapport au groupe non traité. Cette diminution n'était pas présente dans le lot *Tmprss6^{-/-}* après traitement (**Figure 45B**).

Enfin, l'expression du gène de l'érythroferrone a également été mesurée dans la moelle osseuse des différentes souris. Nous avons observé une augmentation significative d'*Erfe* dans les deux groupes de souris KO, suggérant que les individus sont bien capables de détecter l'anémie en l'absence de la MT2 (**Figure 45C**). De plus, une augmentation encore plus forte a été observée après traitement, à des niveaux équivalents entre les différents groupes WT et KO. Ces données indiquent que la réponse à l'EPO pour produire ERFE est maintenue dans des conditions d'anémie chronique liée au KO de *Tmprss6*.

En résumé, de façon similaire aux modèle *Tmprss6*^{-/-}, les souris *Tmprss6*^{Alb} sont capables de détecter l'anémie engendrée par le KO de la MT2 dans les hépatocytes. Cependant, l'hyper activité de la voie BMP-SMAD, responsable d'une surexpression de l'hepcidine abroge la suppression de l'hormone en réponse à l'EPO.

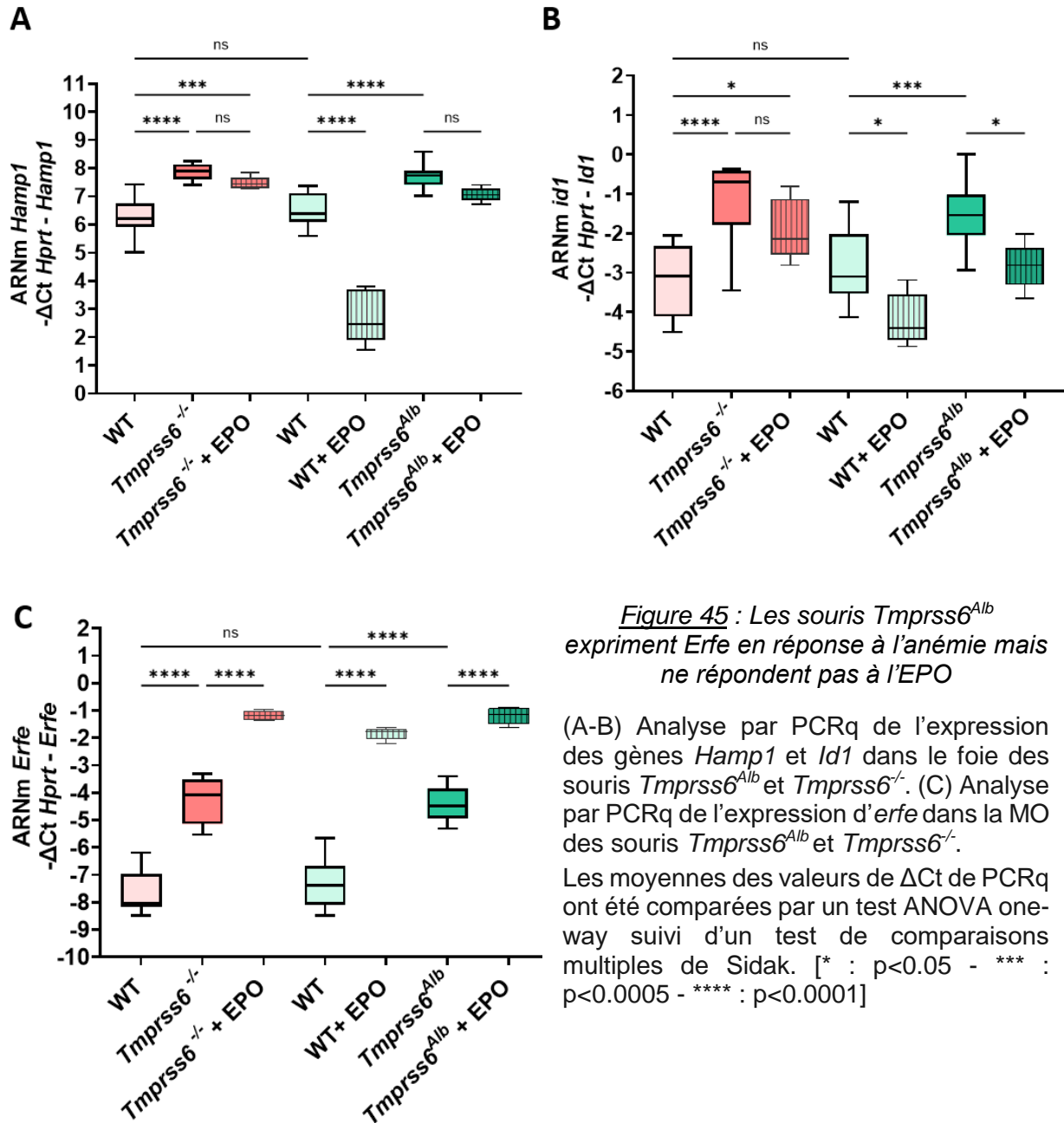


Figure 45 : Les souris *Tmprss6*^{Alb} expriment *Erfe* en réponse à l'anémie mais ne répondent pas à l'EPO

(A-B) Analyse par PCRq de l'expression des gènes *Hamp1* et *Id1* dans le foie des souris *Tmprss6*^{Alb} et *Tmprss6*^{-/-}. (C) Analyse par PCRq de l'expression d'*erfe* dans la MO des souris *Tmprss6*^{Alb} et *Tmprss6*^{-/-}. Les moyennes des valeurs de ΔCt de PCRq ont été comparées par un test ANOVA one-way suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak. [* : p<0.05 - *** : p<0.0005 - **** : p<0.0001]

III. Conclusion

Pour résumer, cette étude avait pour objectif d'étudier le rôle de la matriptase-2 hépatocytaire dans la régulation négative de l'hepcidine. Dans ce contexte, nous avons généré un modèle de souris dans lequel la protéase est exclusivement supprimée des hépatocytes : les souris *Tmprss6^{Alb}*. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'une délétion de la matriptase-2 dans le parenchyme hépatique suffit à récapituler le phénotype d'IRIDA chez la souris.

Nos résultats ont démontré que les souris *Tmprss6^{Alb}* présentent une anémie ferriprive microcytaire assez sévère et à un degré identique aux souris dont la MT2 est supprimée de façon ubiquitaire dans tout l'organisme (*Tmprss6^{-/-}*). Cette anémie est la conséquence d'une levée de l'inhibition de la MT2 hépatocytaire sur la voie BMP-SMAD entraînant en conséquence une surexpression de l'hepcidine. Nous avons également montré que l'axe EPO/ERFE restait fonctionnel suggérant qu'une délétion de la MT2 dans les hépatocytes n'avait pas d'impact sur la détection de l'anémie. En revanche cette délétion a suffi à abolir totalement la suppression de l'hepcidine en réponse à l'EPO (et ERFE en conséquence).

En conclusion, la régulation négative de l'hepcidine dans des conditions physiologiques et de stress érythroïde, par la matriptase-2, est contrôlée en totalité par la localisation hépatocytaire de cette dernière.

DISCUSSION GENERALE

Au cœur du maintien de l'homéostasie du fer, l'hepcidine est majoritairement produite par les hépatocytes, sous l'influence de divers signaux, induits dans différents contextes physiopathologiques. Ces deux dernières décennies de recherche ont fourni de nombreux éléments permettant d'améliorer la compréhension des mécanismes de régulation de l'hormone hépatique. Il a ainsi été montré que les réserves de fer sérique et hépatique, l'activité érythropoïétique ou encore l'inflammation, exercent des actions sur l'expression de l'hepcidine pour *in fine* réguler les niveaux de fer dans l'organisme. Dans cette thèse nous identifions et décrivons de nouveaux acteurs protéiques et cellulaires impliqués dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine.

Le premier axe de cette thèse aura été d'évaluer le rôle du récepteur PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine. Nous décrivons de façon inédite chez l'adulte, que le récepteur PAR₂ participe à la régulation négative de l'hepcidine en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie, depuis son expression dans les macrophages. De ce fait, nous avons exploré le rôle de ces macrophages dans l'inhibition de l'hepcidine et démontré l'implication majeure de ces cellules, tant en condition physiologique que dans des conditions de stress érythroïde.

Par ailleurs, nous avons également caractérisé la matriptase-2, qui inhibe l'hepcidine systémique et montré que cette régulation se fait par sa localisation hépatocytaire. En utilisant des souris *Tmprss6^{Alb}*, nous avons récapitulé en totalité le phénotype des souris *Tmprss6^{-/-}* suggérant que le mode d'action de la protéase est entièrement hépatocytaire.

Cette dernière partie du manuscrit est centrée sur la discussion du rôle des protéines PAR₂ et MT2, ainsi que sur la fonction des macrophages dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine. En reprenant les résultats obtenus durant les trois années de ce projet et les données de la littérature, nous discutons et proposons différentes hypothèses et modèles expérimentaux qui permettent d'élargir la compréhension des mécanismes sous-jacents à la régulation de l'hepcidine

I. Evaluation du rôle de PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine

1. Quel est l'effet de PAR₂ dans la régulation négative de l'hepcidine ?

Le récepteur PAR₂ régule diverses fonctions dans l'organisme, notamment dans les systèmes digestif, respiratoire et circulatoire¹⁵⁷. Dans la présente étude, nous fournissons des éléments démontrant que le récepteur PAR₂ est impliqué dans la régulation négative de l'hepcidine en réponse à l'anémie aiguë, induite par des phlébotomies. La délétion de PAR₂, d'abord de façon ubiquitaire, a entraîné un blocage partiel du mécanisme de suppression de l'hepcidine face à l'anémie, par rapport aux souris WT. Ce phénotype a été observé après deux phlébotomies successives, séparées de 24 heures, c'est-à-dire 48 heures après induction de l'anémie, suggérant que PAR₂ régule l'hepcidine à des stades plus tardifs de la réponse à l'anémie.

Aujourd'hui, il est bien établi que certains facteurs régulent négativement l'hepcidine dans les phases aiguës de l'anémie, comme l'érythroferrone, une hormone sécrétée par les progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse et de la rate, dont l'expression atteint son pic dans la moelle osseuse, environ 9 heures après phlébotomie, puis décroît à partir de 24h¹¹⁴. Plus récemment, le fibrinogène-like 1 a également été identifié comme régulateur négatif de l'hepcidine face à l'anémie, mais contrairement à l'érythroferrone, il est induit par des facteurs indépendants de l'EPO¹²⁵. Nous avons étudié la transcription de ces deux protéines 24 heures après la deuxième phlébotomie. À ce point précis, où la différence entre *F2r11^{-/-}* et *F2r11^{+/+}* a été observée, l'expression d'ERFE dans la moelle osseuse était toujours induite ainsi que celle de FGL1 dans le foie, mais à des niveaux plus faibles. Cependant, l'absence de différence entre les individus PAR₂ KO versus WT, concernant les niveaux d'expression de ces facteurs, indique que le phénotype observé dans le foie des souris PAR₂ KO est indépendant d'un effet de PAR₂ sur la production de ces derniers.

Toutefois, il pourrait être intéressant de quantifier les niveaux sériques de ces deux protéines afin d'évaluer précisément leurs effets au moment où nous avons étudié l'hepcidine dans le foie des individus PAR₂ KO. Les résultats de ces

expériences permettraient de clarifier plus précisément la fonction de PAR₂, car l'inhibition de l'hepcidine en réponse aux phlébotomies n'a été que partiellement bloquée par la suppression du gène *F2r11*. Deux hypothèses pourraient alors expliquer ce phénomène. D'une part, il est possible que des niveaux résiduels d'ERFE et de FGL1 soient encore présents dans le système circulant, permettant de maintenir partiellement l'inhibition de l'hepcidine dans le foie des souris PAR2 KO. D'autre part, il est envisageable que la fonction de PAR2 dans l'inhibition de l'hepcidine soit secondaire ou bien qu'une compensation puisse être opérée par un PAR de la même famille. Le développement de souris transgéniques double KO ERFE/PAR2 ou FGL1/PAR2 pourrait s'avérer intéressant pour caractériser plus précisément l'effet de PAR₂ vis-à-vis des autres inhibiteurs déjà décrits.

Ensuite, il est aujourd'hui bien établi que l'hepcidine est stimulée dans des conditions inflammatoires, afin d'activer un mécanisme de séquestration du fer, protecteur face à un pathogène²⁶¹. De plus, il est également connu que le récepteur PAR₂ peut favoriser des réactions pro- ou anti-inflammatoires selon le contexte physiopathologique^{186,262,263}. Ainsi, nous avons mesuré l'expression du gène *Socs3*, cible de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, dans notre modèle de phlébotomie, sans observer de variations significatives. Cela suggère que la différence d'expression de l'hepcidine entre les souris *F2r11*^{-/-} et les souris *F2r11*^{+/+} était indépendante d'une inflammation (données non présentées).

De la même façon que l'hepcidine est induite par l'inflammation, elle est également stimulée par le statut en fer⁴⁴. De ce fait, nous ne pouvons ignorer que la différence observée entre les souris WT et *F2r11*^{-/-} puisse être liée à des niveaux de fer différents entre les deux groupes. Des mesures des taux sériques et hépatiques de fer ont été réalisées pour répondre à cette question et étaient identiques entre les deux groupes. De plus, en accord avec ces données, nous avons également observé que les niveaux d'expression de BMP6, étaient inchangés entre les groupes de souris WT et KO, indiquant que la différence d'hepcidine observée dans les deux groupes, était indépendante de la concentration en fer chez ces souris (données non présentées).

La genèse de ce projet provient d'une réflexion autour du phénotype des embryons *F2r11*^{-/-}, qui présentent une surexpression de l'hepcidine et une létalité

accrue à la fin du stade embryonnaire. Le même phénotype est observé dans un modèle de souris dont le gène de PAR₂ a été supprimé spécifiquement dans les macrophages (*F2r11^{LysM}*)¹⁹¹. Ces dernières ont également des défauts d'érythropoïèse et une pénétrance plus élevée de la létalité embryonnaire. De façon tout à fait intéressante, les embryons *F2r11^{LysM}* manifestent un phénotype évoquant celui des souris transgéniques *Tmprss6^{-/-}* et du modèle Knock-in *Hamp1*, dans lesquels la surexpression de l'hepcidine entraînent une anémie associée à une létalité embryonnaire plus élevée^{46,264}. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les défauts d'érythropoïèse observés dans le foie fœtal des embryons *F2r11^{LysM}* sont peut-être la conséquence indirecte d'une surexpression de l'hepcidine provoquée par la délétion de PAR₂ dans les macrophages.

Chez l'adulte, la délétion de PAR₂ de façon ubiquitaire ou spécifique aux macrophages n'a pas induit d'altération de l'érythropoïèse en condition physiologique. De plus, aucune différence dans la différenciation des progéniteurs érythroïdes, en réponse aux phlébotomies, n'a été observée chez les *F2r11^{LysM}* par rapport aux individus WT, indiquant que les mécanismes impliquant PAR₂ lors de l'érythropoïèse embryonnaire dans le foie fœtal sont différents de ceux à l'âge adulte, lorsque l'érythropoïèse a lieu dans la moelle osseuse (et la rate).

En conclusion le récepteur PAR₂ participe à la régulation de l'hepcidine, en réponse à l'anémie, par un mode d'action qui semble indépendant d'un mécanisme lié à l'inflammation, au fer ou à un effet direct sur la différenciation érythroïde.

2. Quel est le mécanisme activateur de PAR₂ lors de l'anémie induite par la phlébotomie, permettant l'inhibition de l'hepcidine ?

Les données développées précédemment quant à l'implication de PAR₂ dans la régulation de l'hepcidine interrogent sur les mécanismes par lesquels la phlébotomie entraîne l'activation du récepteur, participant *in fine* à la régulation négative de l'expression de l'hormone hépatique.

Afin d'éclaircir les mécanismes autour de l'activation spécifique de PAR₂, il était d'abord important de déterminer la localisation du récepteur dans le foie pour ainsi permettre d'établir des hypothèses fonctionnelles. Cependant, la difficulté à valider un anticorps spécifique du récepteur a rendu complexe la caractérisation de son expression. Nous avons testé différents lots d'anticorps mais ces derniers ont été invalidés à cause de la détection d'un signal non spécifique sur des coupes de tissus issues de souris *F2r11*^{-/-}. C'est notamment pour cette raison que la littérature regorge de données démontrant l'expression hépatocytaire de PAR₂, bien que cela ne semble pas être correct. En effet, en nous basant finalement sur des approches de biologie moléculaire, nos résultats concernant la transcription de PAR₂ dans le foie ont révélé que le récepteur n'est pas exprimé dans les hépatocytes, mais plutôt dans les cellules non parenchymateuses. Cette information a alors soulevé deux points très importants.

Le premier point concerne l'exploration d'un lien mécanistique entre PAR₂ et la matriptase-2. En effet, rappelons que PAR₂ est un récepteur cible de nombreuses protéases, particulièrement des protéases à sérine telles que la trypsine¹⁵⁶, la tryptase¹⁴⁷, les protéases de la coagulation TF/VIIa et Xa¹⁶¹, ou encore la matriptase-1²⁶⁵. Notre hypothèse initiale sur le mécanisme reliant PAR₂ à l'inhibition de l'hepcidine reposait sur le clivage protéolytique du récepteur par la matriptase-2 (qui est une protéase à sérine connue pour inhiber l'hepcidine), lors d'un stress érythropoïétique. Cette hypothèse était appuyée par le fait que le gène *Tmprss6* est régulé positivement durant l'hypoxie^{124,139}, une condition engendrée dans notre modèle d'anémie inducible par la phlébotomie. La MT2 représentait donc un candidat intéressant pour expliquer le mécanisme fonctionnel derrière cette régulation. Cependant, nous avons dû réfuter cette hypothèse, car PAR₂ n'est pas exprimé dans les hépatocytes, ce qui réduit fortement les probabilités d'interactions avec la MT2. De plus, chez l'adulte dans des conditions physiologiques, nos résultats révèlent que la délétion de PAR₂ n'a aucun effet sur les niveaux d'hepcidine, contrairement à la délétion de la MT2, qui entraîne une anémie microcytaire ferriprive¹³⁰. Nous avons ainsi conclu que la MT2 ne peut pas être le lien manquant qui permet le clivage protéolytique de PAR₂ en condition de stress érythropoïétique.

Le deuxième point important soulevé par l'absence de PAR₂ dans les hépatocytes est qu'un autre type cellulaire est impliqué dans cette régulation PAR₂-

dépendante de l'hepcidine. Dans ce contexte, nous révélons par des expériences de tri cellulaire du foie, que PAR₂ est exprimé dans les NPC. Parmi ces NPC sont retrouvés environ 25 à 35% de macrophages²⁶⁶, dans lesquels l'expression de PAR₂ est bien décrite dans la littérature, et dont la délétion spécifique dans ces cellules, entraîne un défaut d'érythropoïèse embryonnaire associée à une léthalité plus élevée¹⁹¹. Chez l'adulte, étant donné le rôle majeur de ces phagocytes dans l'homéostasie martiale^{14,41}, nous avons exploré un mécanisme dépendant de PAR₂ dans les macrophages. Nous montrons alors les souris *F2r11^{LysM}* récapitulent le phénotype observé dans les KO total en réponse à l'anémie, renforçant ainsi le lien entre macrophages et hépatocytes dans la régulation de l'hepcidine.

Dans le foie, les macrophages sont localisés dans les sinusoides hépatiques, un emplacement clé, en contact direct avec le sang, leur permettant de sonder en permanence leur environnement²⁶⁷. Si la délétion de PAR₂ dans les macrophages n'a pas d'effet en condition physiologique, celle-ci semble impacter la régulation de l'hepcidine en réponse au stress des phlébotomies. Cela signifie que des modifications de l'environnement des macrophages sont opérées lors de ces phlébotomies. Dans ces conditions, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer un tel mécanisme dans lequel PAR₂ est activé dans les macrophages. La plus évidente concerne les protéases, la nature biochimique de PAR₂ fait qu'il est activé/inactivé par diverses enzymes protéolytiques. De ce fait, l'activation du récepteur en condition d'anémie pourrait être expliquée par une variation de la quantité ou de la diversité des protéases, notamment de l'activité protéolytique dans le sang. Ceci est d'autant plus plausible qu'il a été montré que des embryons homozygotes « PAR₂ R38E » (*F2r11^{tm1.1Ruf}*), résistants au clivage protéolytique par les protéases canoniques, n'exhibent pas le phénotype embryonnaire observé dans les *F2r11^{LysM}*, suggérant que le mécanisme d'action est dépendant de la signalisation protéolytique de PAR₂¹⁹¹. Il est connu que PAR₂ est une cible pour certaines protéases de la coagulation en aval de la thrombine, c'est-à-dire le complexe TF-FVIIa et indirectement par le FXa. Pour résumer, le FVIIa se lie au TF, le complexe TF/FVIIa convertit le zymogène FX inactif en protéase active FXa, puis le FXa clive PAR₂ pour déclencher la signalisation transmembranaire^{161,268}. Ce sont donc de potentiels effecteurs qui seraient intéressants à étudier. Notons que c'est au sein du foie que les facteurs VII et X sont

synthétisés. L'étude de l'ensemble de ces enzymes représente donc une piste majeure pour élucider les mécanismes sous-jacents à la régulation de l'hepcidine dépendante de PAR₂. Précisons néanmoins qu'il est assez peu décrit dans la littérature si de telles protéases sont libérées/activées dans des conditions d'anémie.

Enfin, pour caractériser pleinement l'ensemble du mécanisme, plusieurs stimuli devront également être explorés pour expliquer une variation de l'activité protéolytique (et donc une activation de PAR₂) lors de l'anémie induite par les phlébotomies. Parmi ceux-ci pourraient être étudiés : un changement de la volémie liée à la perte sanguine, une modification de la tension artérielle, des variations de l'activité coagulatrice (et des protéases de la coagulation) ou encore des facteurs inductibles liés à l'hypoxie.

En conclusion, la contribution des protéases à la stimulation de PAR₂, en réponse aux phlébotomies, représente une piste importante pour caractériser totalement le mécanisme de régulation de l'hepcidine par PAR₂.

3. Cibler PAR₂ pour traiter des pathologies associées à une dérégulation du métabolisme du fer ?

Dans nos travaux, nous caractérisons une fonction du récepteur PAR₂ sur la régulation négative de l'hepcidine dans des conditions spécifiques au stress érythropoïétique. Chez l'adulte, l'implication de PAR₂ semble strictement liée à ce contexte. De ce fait, cibler PAR₂ pourrait s'avérer intéressant pour traiter certaines pathologies associées à une érythropoïèse inefficace et dans lesquelles l'hepcidine est dérégulée. C'est notamment le cas de certaines anémies hémolytiques²⁶⁹, des myélodysplasies²⁷⁰ ou encore de la β -thalassémie. Nous pouvons prendre l'exemple de cette dernière. Dans la forme intermédiaire de cette pathologie, qui est dite « non dépendante de la transfusion », l'activation continue des voies de réponse à l'anémie, comme la surproduction d'ERFE, entraînent une diminution chronique de l'hepcidine à l'origine d'une surcharge en fer secondaire et progressive¹⁴². Des approches thérapeutiques ciblant ERFE ont déjà été développées, améliorant légèrement les

niveaux d'hepcidine et l'accumulation de fer dans un modèle murin de β -thalassémie intermédiaire (souris *Hbb-th3*^{+/-})²⁷¹. Pour établir une preuve de concept que l'inhibition de PAR₂ permet d'augmenter les niveaux d'hepcidine des souris thalassémiques, des expériences de délétion de PAR₂ dans ces souris (*Hbb-th3*^{+/-} / *F2r11*^{-/-}) pourraient s'avérer intéressantes. Nous émettons l'hypothèse que la suppression de PAR₂ permettrait, en levant l'inhibition de l'expression de l'hepcidine, de réduire l'absorption du fer et ainsi prévenir la surcharge dans les souris β -thalassémiques.

II. Détermination de l'implication des macrophages dans la régulation de l'hepcidine

1. Quel est le mécanisme par lequel les macrophages participent à la régulation négative de l'hepcidine en réponse à la phlébotomie ?

Nos résultats expérimentaux soulignent toute l'importance des macrophages qui participent à la régulation PAR₂-dépendante, décrite lors de l'anémie induite. Dans ce contexte, nous avons alors exploré le comportement des monocytes/macrophages en réponse au stress des phlébotomies, dans le foie des souris *C57Bl/6J* WT.

Contrairement à ce qui a été démontré lors d'un stress hémolytique ou dans des conditions d'anémies inflammatoires⁴¹, nous révélons que le mécanisme de suppression de l'hepcidine impliquant les macrophages, n'est pas dépendant d'une infiltration transitoire de monocytes Ly6C⁺⁺, vers le foie. En effet, dans leurs travaux, les auteurs caractérisent la destinée de ces monocytes qui se différencient *in situ* en macrophages transitoires, dérivés des monocytes, afin de participer au recyclage des érythrocytes sénescents et ainsi maintenir l'homéostasie du fer. Si nous n'avons pas observé de senescence des érythrocytes après induction de notre modèle de phlébotomies (données non présentées), nous avons tout de même détecté une légère infiltration de monocytes dans le foie. Cependant, au point 24h post 2nd phlébotomie, correspondant au pic de suppression de l'hepcidine, aucun macrophages transitoires

n'a pu être identifié, démontrant que le mécanisme de suppression de l'hepcidine des hépatocytes par les macrophages est indépendant d'une infiltration transitoire de ces derniers. Il serait tout de même intéressant de comprendre pourquoi et comment la phlébotomie a induit un mécanisme d'attraction immunitaire de monocytes dans le foie et si ce phénomène est spécifique à cet organe. Une hypothèse expliquant ce phénomène pourrait être que le stress hypoxique induit par la phlébotomie a provoqué la mort d'un faible pourcentage de macrophages hépatiques, entraînant alors une infiltration de monocytes pour reconstruire le réservoir de ces cellules. Ce mécanisme est bien décrit dans la littérature puisqu'il est montré que l'épuisement des KC par un système iDTR induit le recrutement rapide de monocytes issus de la moelle osseuse qui se greffent dans le foie et acquièrent la capacité de s'auto-renouveler²⁰⁵. Une cinétique plus approfondie du comportement des monocytes/macrophages dans le foie pourrait être intéressante pour caractériser pleinement l'effet de l'anémie induite par la phlébotomie sur ces cellules myéloïdes.

Notre hypothèse de départ, basée sur un mécanisme d'infiltration de monocytes dans le foie était fondée sur des études concernant le pouvoir chimio attractant du récepteur PAR₂. En effet, dans diverses conditions pathologiques, le récepteur activé par les protéases participe au recrutement de cellules myéloïdes par un mécanisme impliquant la production, de chimiokines dont CCL2^{179,272}. Or, nous n'avons pas observé de différences dans l'expression de la chimiokine en réponse aux phlébotomies dans le foie de souris *F2r11^{LysM}* par rapport aux *F2r11^{+/+}*. Ces données sont en accord avec celles obtenues concernant les tests d'infiltrations de macrophages dérivés des monocytes.

En conclusion, nous révélons que le mécanisme de suppression de l'hepcidine dans lequel PAR₂ est impliqué est indépendant d'une attraction immunitaire de monocytes/macrophages dans le foie. Ces résultats soulèvent l'importance des macrophages tissulaires présents dans le foie, qui pourraient être activés dans nos conditions de phlébotomies.

2. Quelle est l'importance des macrophages dans la régulation négative de l'hepcidine ?

Pour évaluer pleinement l'importance des macrophages dans la régulation négative de l'hepcidine, nous avons développé le modèle murin *LysM^{iDTR}* afin d'établir une preuve directe du rôle de ces macrophages. Ainsi l'ablation des macrophages hépatiques par les injections de DTX a démontré le rôle majeur de ces cellules sur l'hepcidine des hépatocytes. En effet, de façon comparable aux expériences de déplétion des macrophages via des injections de clodronate encapsulé dans des liposomes²⁴², la suppression des macrophages dans le foie des souris *LysM^{iDTR}* a entraîné une surexpression très forte de l'hepcidine. De façon intéressante, des observations similaires ont été faites lors de mêmes expériences de traitement des macrophages avec du clodronate dans lesquelles une seule injection a entraîné une expression accrue de l'hepcidine dans le foie de souris β -thalassémique ainsi qu'une diminution des taux de fer sérique²⁷².

Il est important de rappeler que l'hepcidine est régulée positivement en fonction de plusieurs paramètres dont l'inflammation ainsi que le statut en fer de l'organisme. Dans notre modèle, nous montrons que la forte augmentation de l'hepcidine n'était ni liée à une augmentation de l'inflammation, ni à une augmentation du fer, potentiellement libéré par les macrophages lors de leur déplétion. Pour évaluer si un mécanisme inflammatoire a pu être activé par la suppression des macrophages, nous avons mesuré les niveaux de phosphorylation de la protéine STAT3 dans le foie des souris⁹¹. Ces niveaux ont alors été comparés avec ceux provenant de souris présentant une inflammation volontairement induite par des injections de LPS, à différents temps. Nous avons ainsi corrélé la quantité de P-STAT3 avec l'expression de l'hepcidine dans nos différents groupes de souris et montrons que pour des mêmes niveaux de P-STAT3 entre souris LPS 24h et DTX, l'hepcidine était fortement surexprimée uniquement dans le groupe DTX. Ces données suggèrent que l'augmentation de l'hormone hépatique n'est pas liée à l'inflammation mais est plutôt la conséquence d'une levée d'inhibition engendrée par la perte des macrophages. Pour caractériser plus précisément l'effet de la mort cellulaire sur l'induction de l'hepcidine par la voie inflammatoire, une approche *in vivo* intéressante aurait pu consister à utiliser un modèle de suppression inductible d'un autre type de cellules

NPC. En effet, nous aurions pu par exemple dépléter les cellules stellaires par le même système basé sur des injections de DTX (modèle murin *Lrat^{DTR}*)²⁷³ pour ainsi évaluer l'effet de la mort de ces cellules sur les niveaux d'expression de l'hepcidine.

Une autre approche intéressante pour évaluer l'effet de la délétion des macrophages sur l'expression de l'hepcidine tout en s'affranchissant d'une inflammation associée, serait d'utiliser des souris *Stat3^{-/-}* dont la voie d'activation de l'hepcidine par la cytokine pro-inflammatoire IL6 est éteinte. En effet, il est envisageable de croiser ces souris avec le modèle *LysM^{iDTR}* et ainsi évaluer l'impact de la suppression des macrophages sur l'hepcidine, indépendamment d'un mécanisme inflammatoire.

Par ailleurs, en plus du phénotype de surexpression de l'hepcidine, observée en conséquence de la suppression des macrophages, nous révélons également l'implication cruciale de ces cellules pour inhiber l'hepcidine en réponse à l'anémie induite par la phlébotomie. En effet, les souris dont les macrophages ont été éliminés, présentaient une absence totale de suppression de l'expression de l'hepcidine, qui est restée anormalement élevée. Cela suggère que la perte d'un signal inhibiteur provenant des macrophages a entraîné un emballement d'une voie d'activation de l'hepcidine, qui n'a pas été contrebalancée par les signaux régulateurs négatifs connus tels que ERFE ou encore FGL1^{114,125}.

De façon extrêmement intéressante, un phénotype assez proche impliquant les macrophages, a été décrit concernant le récepteur PIEZO1, dont la mutation GDF (gain de fonction) dans les phagocytes mononucléés induit une forte suppression de l'hepcidine. En effet, PIEZO1 est un canal ionique mécano-transducteur sensible à la pression, qui joue un rôle clé dans la signalisation calcique. Lorsqu'il est activé par des stimuli mécaniques, PIEZO1 change de conformation, entraînant son ouverture et permettant l'entrée de Ca²⁺ dans les cellules. Cette augmentation du calcium intracellulaire déclenche diverses voies de signalisation en aval²⁷⁴. Dans les expériences de surexpression de PIEZO1 de façon spécifique aux macrophages, il est démontré que l'augmentation du calcium dans ces cellules améliore leur activité d'érythrophagocytose, accélérant alors l'épuration des globules rouges. Parallèlement à l'augmentation du renouvellement des GR, les auteurs observent que l'hepcidine est

fortement supprimée²⁷⁵. Les auteurs justifient cette baisse de l'hepcidine par la production de l'érythroferrone lors de l'érythropoïèse, activée en réponse à l'augmentation de la phagocytose des globules rouges par les macrophages. Nous avons suggéré qu'un autre mécanisme inhibiteur de l'hepcidine pouvait être activé dans ces macrophages, sous l'influence de PIEZO1 et de la voie de signalisation calcique. En effet, il est connu que la signalisation calcique représente une voie importante en aval du récepteur PAR₂ dans les macrophages²⁷⁶. Ainsi, nous avons alors questionné l'existence d'un mécanisme fonctionnel permettant de relier les protéines PIEZO1 et PAR₂, dans la régulation de l'hepcidine par les macrophages. Pour tenter de comprendre ce mécanisme, nous nous sommes également appuyés sur des recherches qui montrent que l'augmentation de l'érythrophagocytose due à la mutation GDF de PIEZO1 était dépendante de l'activation de la protéine Rac1. Cette protéine, impliquée dans la réorganisation du cytosquelette²⁷⁷ a déjà été décrite comme effecteur candidat, en aval de PAR₂ dans un contexte de développement embryonnaire²⁷⁸. Par ailleurs, des expériences de stimulation de PAR₂ dans des macrophages péritonéaux établissent un lien entre PAR₂ et les mécanismes de phagocytose²⁶³.

Ainsi, en prenant l'ensemble des éléments décrits précédemment, nous avons émis l'hypothèse que l'environnement hypoxique généré dans notre modèle de phlébotomie, pouvait induire un stress aux globules rouges et en conséquence une augmentation de l'érythrophagocytose via un mécanisme dans lequel PAR₂ pourrait être impliqué. Cependant, des expériences préliminaires mises en place ont infirmé cette hypothèse car aucun marqueur de sénescence n'a été mis en évidence dans les globules rouges issus de souris phlébotomisées (données non présentées). De plus, des tests d'érythrophagocytose *in vitro* par des BMDM n'ont pas non plus montré d'augmentation de ce mécanisme lorsque ces derniers étaient traités avec du sang prélevé 24h après 2nd phlébotomie. Dans ce contexte, nous avons jugé qu'il était inutile de creuser cette hypothèse en testant le lien entre PAR₂ et l'érythrophagocytose. Cependant, Il reste important de déterminer le lien entre la signalisation calcique du macrophage et la régulation de l'hepcidine dans les hépatocytes.

Enfin, il est important de préciser que pour générer les souris *LysM^{ΔDTR}*, nous avons établi une construction génétique basée sur la recombinaison homologe via

l'enzyme CRE Recombinase, exprimée sous le contrôle du promoteur *LysM*. Or ce promoteur est actif dans tous les macrophages des souris. Bien que nous montrions une diminution très forte des cellules de Kupffer par la DTX, et que ces cellules représentent pratiquement 90% des macrophages de l'organisme²⁷⁹, nous ne pouvons négliger un effet lié à la suppression de macrophages présents dans d'autres tissus. De ce fait, utiliser un modèle de suppression inductible ciblant spécifiquement les KC serait intéressant. Il pourrait par exemple être envisagé d'utiliser des souris *Clec4f^{DTR}*, déjà caractérisées dans certains travaux²⁰⁵.

En conclusion, au-delà de leurs rôles dans le recyclage du fer, les macrophages hépatiques sont impliqués dans la régulation négative de l'expression de l'hepcidine en condition physiologique et en réponse à l'anémie.

3. Quel est donc le mécanisme inhibiteur de l'hepcidine hépatocytaire par les macrophages ?

L'ensemble de nos données *in vivo* suggère que les macrophages, notamment les cellules de Kupffer, induisent des signaux inhibiteurs sur l'hepcidine hépatocytaire. Un tel dialogue entre NPC et hépatocytes a déjà été démontré puisque les cellules endothéliales sécrètent des facteurs tels que BMP2/BMP6 pour réguler positivement l'hepcidine en réponse à l'augmentation des niveaux de fer dans l'organisme^{71,72}. Ainsi, nous nous sommes questionnés sur l'origine de ces signaux, qui pourraient s'établir de deux manières. D'une part, par contact direct entre les cellules. En effet, les cellules de Kupffer sont situées dans les sinusoides hépatiques, enchevêtrées entre les cellules endothéliales, et séparées en partie des hépatocytes par l'espace de Disse. Néanmoins, contrairement à ce qui a longtemps été décrit, les KC ne sont pas strictement localisés dans les sinusoides et une fraction de leurs corps cellulaires se situe dans l'espace perisinusoïdal, leur permettant d'interagir avec les hépatocytes²⁰⁴. D'autre part, il est très probable que les signaux proviennent d'un mécanisme sécrétoire. C'est ce mécanisme que nous avons décidé d'explorer par une approche *in vitro*. Nous montrons alors que la stimulation d'hépatocytes par du milieu

conditionné d'une culture de macrophages, induit une baisse de l'expression de l'hepcidine suggérant qu'un ou plusieurs facteurs sont sécrétés par ces macrophages pour inhiber l'hepcidine. De plus, ces résultats préliminaires révèlent un mode d'action qui semble dépendant d'un effet sur la voie BMP-SMAD, donnant ainsi des indices sur le fonctionnement de cet inhibiteur.

Il est aujourd'hui connu que diverses molécules inhibent l'hepcidine comme les régulateurs érythroïdes ERFE et l'hépatokine FGL1 dont nous avons déjà parlé en amont. Additionné à ces derniers peuvent également être cités le GDF15 ou encore TWSG1. Cependant ces molécules ne sont pas sécrétées par les macrophages. De plus, la délétion de ces facteurs dans divers modèles murins n'affecte pas l'expression de l'hepcidine en condition d'équilibre homéostatique, suggérant que ces facteurs ne sont les candidats recherchés produits par les macrophages

D'autres molécules appartenant à une famille de facteurs de croissance ont également été identifiées et décrits comme ayant un pouvoir répresseur sur l'hepcidine, telles que le PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB)²⁸⁰, le HGF (hepatocyte growth factor) et l'EGF (epidermal growth factor)²⁸¹. Parmi ces molécules, seule la sécrétion du PDGF-BB a été montrée dans macrophages. Toutefois, si le HGF et l'EGF agissent sur la voie BMP/SMAD pour inhiber l'hepcidine, ce n'est pas le cas du PDGF-BB²⁸¹. Par conséquent, il est également peu probable que ces facteurs de croissance soient les candidats recherchés.

Puis, il a aussi été décrit un ensemble de molécules endogènes capables d'inhiber la voie BMP/SMAD, parmi lesquelles sont retrouvées les protéines de type Noggin, Chordin et Gremlin. Ces protéines se lient directement aux BMP, empêchant leur interaction avec leurs récepteurs de surface, inhibant ainsi l'activation de la voie BMP/SMAD. Selon la littérature, seule la molécule Gremlin 1 est produite par les macrophages dans des conditions spécifiques d'activation par injection de LPS²⁸². Nous avons mesuré l'expression relative de cette molécule dans les macrophages de notre culture et avons obtenu des niveaux trop bas pour valider ce candidat.

Enfin, nous pouvons émettre d'autres hypothèses quant à la nature de cet inhibiteur. Par exemple, il pourrait s'agir d'une protéase sécrétée par les macrophages

pour dégrader les BMP ou le complexe de récepteurs aux BMP. Des approches de protéomique telles que la spectrométrie de masse sont prévues pour tenter d'identifier ce/ces candidats. Par ailleurs, il serait également intéressant d'utiliser des méthodes de séquençage sur cellule unique pour caractériser les molécules sécrétées dans le milieu conditionné de ces macrophages. Nous pourrions dans un premier temps réaliser ces expériences sur des macrophages cultivés *in vitro*, puis ensuite adopter une approche *in vivo* en isolant des cellules de Kupffer de souris auxquelles nous aurions préalablement induit un stress érythroïde par phlébotomie.

En conclusion, les macrophages inhibent l'hepcidine en produisant une molécule qui agit sur les hépatocytes. La découverte de cette molécule pourrait permettre d'identification d'une nouvelle cible thérapeutique pour traiter certaines maladies associées à une dérégulation de l'expression de l'hepcidine.

4. PAR₂ est-il impliqué de la production d'une molécule inhibitrice provenant des macrophages ?

Dans des perspectives futures, nous souhaitons évaluer si PAR₂ est impliqué dans la sécrétion de l'inhibiteur recherché. Dans un premier temps, nous souhaitons utiliser un modèle *in vitro*, deux approches sont alors possibles. L'une consisterait à stimuler des BMDM issus de cellules hématopoïétiques de souris C57Bl/6J WT, avec un agoniste du récepteur tel que le SLIRGL-NH₂ et ainsi tester si l'activation de PAR₂ entraîne la libération de cette molécule inhibitrice. Une autre façon serait de stimuler le récepteur par la protéase canonique de PAR₂ : la trypsine. Cependant, il faut tout de même rappeler que sur la base de nos résultats *in vivo* et *in vitro*, l'effet de cet inhibiteur sur l'hepcidine est déjà très fort, suggérant que ce dernier est produit en grosse quantité dans des conditions d'équilibre. En conséquence, cela pourrait masquer l'effet d'une molécule agoniste de PAR₂ sur la production de ce facteur. Ainsi, il pourrait être plus judicieux d'étudier l'effet de l'extinction de PAR₂. C'est-à-dire de mettre en culture des BMDM issus de cellules souches provenant de moelle osseuse de génotype *F2r11*^{-/-} pour évaluer si l'absence du récepteur dans les macrophages

affecte la production du signal inhibiteur. L'antagonisation du récepteur par des ligands exogènes est également à envisager, des études ont montré l'efficacité de telles molécules comme par exemple les molécules FSLLRY-NH₂, GB83 ou encore GB88¹⁴⁷.

Pour conclure, le développement de ces différents modèles et outils pharmacologiques permettraient d'établir le lien précis entre PAR₂ et les macrophages sur la régulation négative de l'hepcidine hépatocytaire. La mise en évidence de ce lien pourrait alors ouvrir de nouvelles perspectives de recherche comme la caractérisation de la signalisation cellulaire en aval du récepteur.

III. Caractérisation de l'implication de la matriptase-2 hépatocytaire dans la régulation de l'hepcidine

Dans ce projet secondaire, nous avons exploré le lien entre la matriptase-2 exprimée à la membrane des hépatocytes et l'inhibition de l'hepcidine systémique. La matriptase-2 est une protéase à sérine transmembranaire au rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie du fer puisque des mutations perte de fonction de cette dernière entraîne une surexpression de l'hepcidine et en conséquence une anémie microcytaire ferriprive.

Principalement exprimée dans les hépatocytes du foie, son expression est retrouvée dans d'autres tissus comme le rein, le cerveau ou encore les organes sexuels secondaires comme les testicules ou l'utérus²⁸³. Il est assez évident d'imaginer qu'une protéase transmembranaire exprimée à la surface des hépatocytes agisse en totalité depuis la membrane de ces cellules pour inhiber l'hepcidine, dont l'expression dans ce type cellulaire constitue la principale source protéique dans l'organisme. Cependant, bien qu'implicite, cela n'a jamais été clairement démontré. Dans ces travaux, nous établissons que la matriptase-2 des hépatocytes est la principale source d'inhibition de l'hepcidine. De la même façon qu'il a été montré que

l'hépcidine hépatocytaire suffit à réguler de façon systémique le métabolisme du fer⁶⁵, nous montrons que la délétion de la MT2 dans les hépatocytes, récapitule en totalité le phénotype d'IRIDA chez la souris¹²⁹. Ainsi, le phénotype des souris *Tmprss6^{Alb}* démontre que la MT2 régule l'homéostasie du fer systémique par sa localisation hépatocytaire.

Nous avons également décrit dans le chapitre introductif de ce manuscrit que la MT2 est un régulateur de la voie BMP-SMAD dans laquelle celle-ci interagit avec différents effecteurs protéiques. Bien que son mode d'action précis ne soit pas encore totalement compris, des données de la littérature décrivent l'implication de la protéine hémojuvéline dans son mode d'action^{128,284}. Par ailleurs, les récepteurs ALK2 et ALK3 de la signalisation BMP-SMAD font également partie du mécanisme fonctionnel de la MT2. En effet, des expériences au sein du laboratoire, menées par d'autres membres de l'équipe, ont démontré que l'inhibition spécifique de la MT2 par un anticorps monoclonal n'a pas d'effet sur la signalisation SMAD dans le foie des souris *ALK2^{-/-}* et *ALK3^{-/-}*. De façon intéressante, il a été décrit que l'hémojuvéline ainsi que les récepteurs ALK2 et ALK3, sont exprimés dans d'autres organes dans lesquels ils régulent diverses fonctions notamment dans le rein²⁸⁵. Ainsi, outre le contexte d'étude de la régulation du métabolisme du fer, l'utilisation du modèle murin *Tmprss6^{flox}* pourrait s'avérer intéressant pour étudier la signalisation BMP-SMAD dans les tissus extra-hépatiques dans lesquels la matriptase-2 est exprimée.

Par ailleurs, une étude publiée en 2018 dans le journal Nature communication décrit que les souris *Tmprss6^{-/-}* sont résistantes à l'obésité induite par un régime gras. Cette résistance est caractérisée par une augmentation de la sensibilité à l'insuline ainsi que de la tolérance au glucose²⁸⁶. Les auteurs concluent dans leurs travaux que les faibles niveaux de fer dans l'organisme des souris *Tmprss6^{-/-}* favorisent la fonction du tissu adipeux en cas de surcharge nutritionnelle comme par exemple une augmentation de la lipolyse des graisses lorsque ces dernières étaient nourries avec un régime riche en gras. Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser le niveau d'expression de la matriptase-2 dans les adipocytes dans laquelle la voie BMP/SMAD est active et permet de réguler la transcription de gènes impliqués dans la pathogénèse de l'obésité²⁸⁷. En effet, il n'est pas à exclure que la matriptase-2 agisse directement depuis les adipocytes et participe ainsi à une fonction

indépendante du fer dans les mécanismes de réponse à un régime gras. Ainsi, l'utilisation du modèle *Tmprss6^{flox}* serait un bon outil pour répondre à cette question.

Enfin, il a souvent été mentionné dans ce manuscrit que les hépatocytes ne sont pas les seules cellules présentes dans le foie. En effet les cellules non parenchymateuses constituent une niche environnementale pour les hépatocytes. Une étude plus approfondie de l'activité des protéines SMAD dans les NPC des souris *Tmprss6^{Alb}* pourraient être intéressante pour déterminer si la MT2 hépatocytaire peut réguler la voie SMAD dans ces NPC.

Pour conclure, le modèle de souris *Tmprss6^{Alb}* démontre que la matriptase-2 régule l'hepcidine depuis sa localisation dans les hépatocytes. Ces résultats sont assez cohérents compte tenu de la fonction protéolytique de cette serine protéase et de son adressage à la membrane des cellules hépatiques. Cependant, son mode d'action reste encore aujourd'hui assez imprécis, impliquant que d'autres études devront être menées pour pleinement caractériser le mécanisme par lequel l'enzyme réprime l'hepcidine dans les hépatocytes, en condition d'homéostasie. Par ailleurs, ce modèle de souris se révèle être un outil intéressant pour étudier le rôle de la matriptase-2 dans d'autres tissus, indépendamment de sa fonction sur la voie BMP-SMAD dans les cellules du parenchyme hépatique.

ANNEXES

Liste des communications publiques concernant ces travaux :



❖ EIC Juillet 2022 - OXFORD

Présentation d'un poster : "Questioning the extra-hepatic role of matriptase-2 in iron homeostasis"

❖ EIC Avril 2024 - TOULOUSE

Communication orale : "Role of PAR₂ and macrophages in hepcidin regulation"

Obtention du prix de la meilleure présentation orale

Outil utilisé pour la création des figures d'introduction :

Je remercie le site **Biorender.com** qui a été utilisé pour construire les différentes figures d'introduction.

Questioning the extra-hepatic role of Matriptase-2 in iron homeostasis

Mathieu BERGER, Anaïs PALIN, Céline BESSON, Chloé LATOUR, Hélène COPPIN, Marie-Paule ROTH, Delphine MEYNARD.
 Institut de Recherche en santé Digestive, Toulouse, France / Team : « Iron metabolism, from regulation to therapy »

I. INTRODUCTION

Matriptase-2 in iron regulation

In physiological conditions, matriptase-2 (MT2) is mainly expressed in hepatocytes and downregulates hepcidin expression leading to the inhibition of iron absorption and release from cells.

Consequences of *Tmprss6* deletion in mice

Mice lacking matriptase-2 (*Tmprss6*^{-/-}) display an iron deficiency and a microcytic anemia. This phenotype is due to inappropriately increased levels of liver *Hamp* expression, the gene encoding hepcidin.

Matriptase-2 is expressed in other tissues

Matriptase-2 is also located in other tissues such as kidneys, spleen, lungs or brain. However, we still don't know if iron balance is controlled from these tissues. This study aims to investigate a hypothetical role of extra hepatic matriptase-2 in iron homeostasis.

OBJECTIVE : To investigate the role of matriptase-2 expressed in hepatocytes in iron homeostasis regulation

II. EXPERIMENTAL STRATEGY

In vivo model

We generated a tissue-specific knockout mouse model in which *Tmprss6* is specifically deleted in hepatocytes, by breeding *Tmprss6*^{loxP/loxP} mice with *Alb-Cre* expressing mice. Like *Tmprss6*^{-/-} mice, *Tmprss6*^{Alb/Alb} mice have alopecia.

Basal analysis

- ❖ HEMATOLOGICAL PARAMETERS
Red blood cells count, hemoglobin, MCV, hematocrit...
- ❖ Genes expression (RT-qPCR)
Hamp, *Id1*, *Erf*, *Gypa*.

Characterization of *Tmprss6*^{Alb/Alb} mice in steady-state condition through the measurement of hematological parameters and mRNA expression in the liver and the bone marrow.

Erythropoietin injection

Analyses
Liver and bone marrow mRNA extraction, blood parameters

Background:

In 2016, we showed that a full deletion of MT2 prevents the inhibition of hepcidin in response to erythropoietin (EPO) injection. To decipher if it only depends on MT2 expressed in hepatocytes, we performed a similar experiment in *Tmprss6*^{Alb/Alb} mice and injected 200U of EPO 15 hours before collecting tissues samples.

III. RESULTS

Basal phenotype

Tmprss6^{Alb/Alb} mice display an alopecia such as the full *Tmprss6*^{-/-} mice.

Consequences of specific *Tmprss6* deletion in hepatocytes

Tmprss6^{Alb/Alb} mice display a high *Hamp* mRNA expression in the liver similar to full *Tmprss6*^{-/-} mice.

Similar to full *Tmprss6*^{-/-} mice, *Tmprss6*^{Alb/Alb} present a microcytic anemia as demonstrated by reduced hemoglobin concentration and mean cell volume.

This data suggest that in basal condition MT2 regulates *Hepcidin* expression through its hepatocytic location only.

EPO injection

Impact of EPO injection on iron regulation and anemia

In response to EPO injection, *Erf* is produced by the bone marrow similarly in WT, full *Tmprss6*^{-/-} and *Tmprss6*^{Alb/Alb} mice. As observed in full *Tmprss6*^{-/-} mice, in response to EPO injection, hepatocyte deletion of MT2 prevents the inhibition of hepcidin mRNA expression in the liver.

We studied the BMP-SMAD signaling pathway through the measurement of SMAD5 phosphorylation (P-SMADS).

As expected, EPO injection leads to an inhibition of P-SMADS in WT mice, and as observed in full *Tmprss6*^{-/-}, P-SMADS is increased in *Tmprss6*^{Alb/Alb}. Interestingly, we witnessed a decrease of P-SMADS in *Tmprss6*^{Alb/Alb} in response to EPO injection, despite the lack of hepcidin suppression in these conditions.

IV. CONCLUSION

Our results show that *Tmprss6*^{Alb/Alb} recapitulates the phenotype of full *Tmprss6* knock-out mice (alopecia, anemia, high hepcidin and no response to EPO injection), showing that the role of matriptase-2 in iron homeostasis regulation and in response to erythroid stress is due to hepatocytic matriptase-2. However, the decrease of P-SMAD-5 observed in the liver of *Tmprss6*^{Alb/Alb} mice, never observed in full *Tmprss6*^{-/-} mice, in response to EPO injection, questions the role of matriptase-2 in non-parenchymal liver cells.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) *Office of Dietary Supplements - Iron*. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/> (accessed 2024-07-12).
- (2) Galy, B.; Conrad, M.; Muckenthaler, M. Mechanisms Controlling Cellular and Systemic Iron Homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2024**, *25* (2), 133–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00648-1>.
- (3) Fujita, H. Molecular Mechanism of Heme Biosynthesis. *Tohoku J. Exp. Med.* **1997**, *183* (2), 83–99. <https://doi.org/10.1620/tjem.183.83>.
- (4) Read, A. D.; Bentley, R. ET.; Archer, S. L.; Dunham-Snary, K. J. Mitochondrial Iron–Sulfur Clusters: Structure, Function, and an Emerging Role in Vascular Biology. *Redox Biol.* **2021**, *47*, 102164. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>.
- (5) *Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control - PMC*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4180463/> (accessed 2024-07-11).
- (6) Gao, J.; Zhou, Q.; Wu, D.; Chen, L. Mitochondrial Iron Metabolism and Its Role in Diseases. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *513*, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.12.005>.
- (7) Kehrer, J. P. The Haber–Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity. *Toxicology* **2000**, *149* (1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6).
- (8) Lane, D. J. R.; Bae, D.-H.; Merlot, A. M.; Sahni, S.; Richardson, D. R. Duodenal Cytochrome b (DCYTb) in Iron Metabolism: An Update on Function and Regulation. *Nutrients* **2015**, *7* (4), 2274–2296. <https://doi.org/10.3390/nu7042274>.
- (9) Camaschella, C.; Nai, A.; Silvestri, L. Iron Metabolism and Iron Disorders Revisited in the Heparin Era. *Haematologica* **2020**, *105* (2), 260–272. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232124>.
- (10) Le Blanc, S.; Garrick, M. D.; Arredondo, M. Heme Carrier Protein 1 Transports Heme and Is Involved in Heme-Fe Metabolism. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2012**, *302* (12), C1780–C1785. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00080.2012>.
- (11) Abboud, S.; Haile, D. J. A Novel Mammalian Iron-Regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism *. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (26), 19906–19912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000713200>.

- (12) *Ferritin, cellular iron storage and regulation - Arosio - 2017 - IUBMB Life - Wiley Online Library*. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1621> (accessed 2024-07-11).
- (13) Mancias, J. D.; Wang, X.; Gygi, S. P.; Harper, J. W.; Kimmelman, A. C. Quantitative Proteomics Identifies NCOA4 as the Cargo Receptor Mediating Ferritinophagy. *Nature* **2014**, *509* (7498), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature13148>.
- (14) Ganz, T. Macrophages and Systemic Iron Homeostasis. *J. Innate Immun.* **2012**, *4* (5–6), 446–453. <https://doi.org/10.1159/000336423>.
- (15) *Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism: Cell*. [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(10\)00718-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741000718X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(10)00718-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741000718X%3Fshowall%3Dtrue) (accessed 2024-07-11).
- (16) Drakesmith, H.; Nemeth, E.; Ganz, T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* **2015**, *22* (5), 777–787. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>.
- (17) Gammella, E.; Buratti, P.; Cairo, G.; Recalcati, S. The Transferrin Receptor: The Cellular Iron Gate. *Metallomics* **2017**, *9* (10), 1367–1375. <https://doi.org/10.1039/c7mt00143f>.
- (18) Lamb, J. E.; Ray, F.; Ward, J. H.; Kushner, J. P.; Kaplan, J. Internalization and Subcellular Localization of Transferrin and Transferrin Receptors in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (14), 8751–8758. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32120-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32120-3).
- (19) Steere, A. N.; Byrne, S. L.; Chasteen, N. D.; Mason, A. B. Kinetics of Iron Release from Transferrin Bound to the Transferrin Receptor at Endosomal pH. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820* (3), 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.003>.
- (20) Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; Greer, E. L.; Antiochos, B.; McDonald, A.; Chen, J.; Sharp, J. J.; Fujiwara, Y.; Barker, J. E.; Fleming, M. D. Identification of a Ferrireductase Required for Efficient Transferrin-Dependent Iron Uptake in Erythroid Cells. *Nat. Genet.* **2005**, *37* (11), 1264–1269. <https://doi.org/10.1038/ng1658>.
- (21) Miyazawa, M.; Bogdan, A. R.; Hashimoto, K.; Tsuji, Y. Regulation of Transferrin Receptor-1 mRNA by the Interplay between IRE-Binding Proteins and miR-7/miR-141 in the 3'-IRE Stem-Loops. *RNA* **2018**, *24* (4), 468–479. <https://doi.org/10.1261/rna.063941.117>.
- (22) Kawabata, H.; Yang, R.; Hiramata, T.; Vuong, P. T.; Kawano, S.; Gombart, A. F.; Koeffler, H. P. Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2: A NEW MEMBER OF THE TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE FAMILY *. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (30), 20826–20832. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20826>.

- (23) Kleven, M. D.; Jue, S.; Enns, C. A. The Transferrin Receptors, TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry* **2018**, *57* (9), 1552–1559. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00006>.
- (24) Nai, A.; Lidonnici, M. R.; Rausa, M.; Mandelli, G.; Pagani, A.; Silvestri, L.; Ferrari, G.; Camaschella, C. The Second Transferrin Receptor Regulates Red Blood Cell Production in Mice. *Blood* **2015**, *125* (7), 1170–1179. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-596254>.
- (25) Rauner, M.; Baschant, U.; Roetto, A.; Pellegrino, R. M.; Rother, S.; Salbach-Hirsch, J.; Weidner, H.; Hintze, V.; Campbell, G.; Petzold, A.; Lemaitre, R.; Henry, I.; Bellido, T.; Theurl, I.; Altamura, S.; Colucci, S.; Muckenthaler, M. U.; Schett, G.; Komla Ebri, D.; Bassett, J. H. D.; Williams, G. R.; Platzbecker, U.; Hofbauer, L. C. Transferrin Receptor 2 Controls Bone Mass and Pathological Bone Formation via BMP and Wnt Signaling. *Nat. Metab.* **2019**, *1* (1), 111–124. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0005-8>.
- (26) Silvestri, L.; Nai, A.; Pagani, A.; Camaschella, C. The Extrahepatic Role of TFR2 in Iron Homeostasis. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 93. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00093>.
- (27) Knutson, M. D. Non-Transferrin-Bound Iron Transporters. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.413>.
- (28) Liuzzi, J. P.; Aydemir, F.; Nam, H.; Knutson, M. D.; Cousins, R. J. Zip14 (Slc39a14) Mediates Non-Transferrin-Bound Iron Uptake into Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (37), 13612–13617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606424103>.
- (29) Müller, S.; Sindikubwabo, F.; Cañeque, T.; Lafon, A.; Versini, A.; Lombard, B.; Loew, D.; Wu, T.-D.; Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Durand, A.; Vallot, C.; Baulande, S.; Servant, N.; Rodriguez, R. CD44 Regulates Epigenetic Plasticity by Mediating Iron Endocytosis. *Nat. Chem.* **2020**, *12* (10), 929–938. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0513-5>.
- (30) Slusarczyk, P.; Mleczko-Sanecka, K. The Multiple Facets of Iron Recycling. *Genes* **2021**, *12* (9), 1364. <https://doi.org/10.3390/genes12091364>.
- (31) Arashiki, N.; Kimata, N.; Manno, S.; Mohandas, N.; Takakuwa, Y. Membrane Peroxidation and Methemoglobin Formation Are Both Necessary for Band 3 Clustering: Mechanistic Insights into Human Erythrocyte Senescence. *Biochemistry* **2013**, *52* (34), 5760–5769. <https://doi.org/10.1021/bi400405p>.
- (32) Bratosin, D.; Mazurier, J.; Tissier, J. P.; Estaquier, J.; Huart, J. J.; Ameisen, J. C.; Aminoff, D.; Montreuil, J. Cellular and Molecular Mechanisms of Senescent Erythrocyte Phagocytosis by Macrophages. A Review. *Biochimie* **1998**, *80* (2), 173–195. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80024-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80024-2).

- (33) Oldenburg, P.-A.; Zheleznyak, A.; Fang, Y.-F.; Lagenaur, C. F.; Gresham, H. D.; Lindberg, F. P. Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. *Science* **2000**, *288* (5473), 2051–2054. <https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2051>.
- (34) Klei, T. R. L.; Meinderts, S. M.; van den Berg, T. K.; van Bruggen, R. From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 73. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00073>.
- (35) Sukhbaatar, N.; Weichhart, T. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (4), 137. <https://doi.org/10.3390/ph11040137>.
- (36) McKie, A. T.; Marciani, P.; Rolfs, A.; Brennan, K.; Wehr, K.; Barrow, D.; Miret, S.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Farzaneh, F.; Hediger, M. A.; Hentze, M. W.; Simpson, R. J. A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Mol. Cell* **2000**, *5* (2), 299–309. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80425-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80425-6).
- (37) Garby, L.; Noyes, W. D. STUDIES ON HEMOGLOBIN METABOLISM. I. THE KINETIC PROPERTIES OF THE PLASMA HEMOGLOBIN POOL IN NORMAL MAN*. *J. Clin. Invest.* **1959**, *38* (9), 1479–1483.
- (38) Schaer, D. J.; Vinchi, F.; Ingoglia, G.; Tolosano, E.; Buehler, P. W. Haptoglobin, Hemopexin, and Related Defense Pathways—Basic Science, Clinical Perspectives, and Drug Development. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 415. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00415>.
- (39) Hvidberg, V.; Maniecki, M. B.; Jacobsen, C.; Højrup, P.; Møller, H. J.; Moestrup, S. K. Identification of the Receptor Scavenging Hemopexin-Heme Complexes. *Blood* **2005**, *106* (7), 2572–2579. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1185>.
- (40) Kristiansen, M.; Graversen, J. H.; Jacobsen, C.; Sonne, O.; Hoffman, H. J.; Law, S. K.; Moestrup, S. K. Identification of the Haemoglobin Scavenger Receptor. *Nature* **2001**, *409* (6817), 198–201. <https://doi.org/10.1038/35051594>.
- (41) Theurl, I.; Hilgendorf, I.; Nairz, M.; Tymoszyk, P.; Haschka, D.; Asshoff, M.; He, S.; Gerhardt, L. M. S.; Holderried, T. A. W.; Seifert, M.; Sopper, S.; Fenn, A. M.; Anzai, A.; Rattik, S.; McAlpine, C.; Theurl, M.; Wieghofer, P.; Iwamoto, Y.; Weber, G. F.; Harder, N. K.; Chousterman, B. G.; Arvedson, T. L.; McKee, M.; Wang, F.; Lutz, O. M. D.; Rezoagli, E.; Babitt, J. L.; Berra, L.; Prinz, M.; Nahrendorf, M.; Weiss, G.; Weissleder, R.; Lin, H. Y.; Swirski, F. K. On-Demand Erythrocyte Disposal and Iron Recycling Requires Transient Macrophages in the Liver. *Nat. Med.* **2016**, *22* (8), 945–951. <https://doi.org/10.1038/nm.4146>.
- (42) Krause, A.; Neitz, S.; Mägert, H.-J.; Schulz, A.; Forssmann, W.-G.; Schulz-Knappe, P.; Adermann, K. LEAP-1, a Novel Highly Disulfide-Bonded Human Peptide, Exhibits Antimicrobial Activity. *FEBS Lett.* **2000**, *480* (2–3), 147–150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01920-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01920-7).

- (43) Park, C. H.; Valore, E. V.; Waring, A. J.; Ganz, T. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver *. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (11), 7806–7810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>.
- (44) Pigeon, C.; Ilyin, G.; Courselaud, B.; Leroyer, P.; Turlin, B.; Brissot, P.; Loréal, O. A New Mouse Liver-Specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload *. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (11), 7811–7819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008923200>.
- (45) Nicolas, G.; Bennoun, M.; Devaux, I.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Kahn, A.; Vaulont, S. 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), 8780–8785. <https://doi.org/10.1073/pnas.151179498>.
- (46) Nicolas, G.; Bennoun, M.; Porteu, A.; Mativet, S.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Siritto, M.; Sawadogo, M.; Kahn, A.; Vaulont, S. Severe Iron Deficiency Anemia in Transgenic Mice Expressing Liver Hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (7), 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.072632499>.
- (47) Verga Falzacappa, M. V.; Muckenthaler, M. U. Hepcidin: Iron-Hormone and Anti-Microbial Peptide. *Gene* **2005**, *364*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.020>.
- (48) Valore, E. V.; Ganz, T. POSTTRANSLATIONAL PROCESSING OF HEPCIDIN IN HUMAN HEPATOCYTES IS MEDIATED BY THE PROHORMONE CONVERTASE FURIN. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2008**, *40* (1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.07.009>.
- (49) Nemeth, E.; Tuttle, M. S.; Powelson, J.; Vaughn, M. B.; Donovan, A.; Ward, D. M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* **2004**, *306* (5704), 2090–2093. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>.
- (50) Ganz, T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93* (4), 1721–1741. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2013>.
- (51) Canonne-Hergaux, F.; Donovan, A.; Delaby, C.; Wang, H.; Gros, P. Comparative Studies of Duodenal and Macrophage Ferroportin Proteins. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *290* (1), G156–G163. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00227.2005>.
- (52) Lakhal-Littleton, S.; Wolna, M.; Carr, C. A.; Miller, J. J. J.; Christian, H. C.; Ball, V.; Santos, A.; Diaz, R.; Biggs, D.; Stillion, R.; Holdship, P.; Lerner, F.; Tyler, D. J.; Clarke, K.; Davies, B.; Robbins, P. A. Cardiac Ferroportin Regulates Cellular Iron Homeostasis and Is Important for Cardiac Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (10), 3164–3169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422373112>.

- (53) Malerba, M.; Peyssonnaud, C. Rôle de l'hepcidine dans les infections cutanées. *médecine/sciences* **2020**, *36* (3), 222–224. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020037>.
- (54) Baumann, B. H.; Shu, W.; Song, Y.; Simpson, E. M.; Lakhali-Littleton, S.; Dunaief, J. L. Ferroportin-Mediated Iron Export from Vascular Endothelial Cells in Retina and Brain. *Exp. Eye Res.* **2019**, *187*, 107728. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107728>.
- (55) Donovan, A.; Lima, C. A.; Pinkus, J. L.; Pinkus, G. S.; Zon, L. I.; Robine, S.; Andrews, N. C. The Iron Exporter Ferroportin/Slc40a1 Is Essential for Iron Homeostasis. *Cell Metab.* **2005**, *1* (3), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003>.
- (56) Qiao, B.; Sugianto, P.; Fung, E.; del-Castillo-Rueda, A.; Moran-Jimenez, M.-J.; Ganz, T.; Nemeth, E. Heparin-Induced Endocytosis of Ferroportin Is Dependent on Ferroportin Ubiquitination. *Cell Metab.* **2012**, *15* (6), 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.018>.
- (57) Aschemeyer, S.; Qiao, B.; Stefanova, D.; Valore, E. V.; Sek, A. C.; Ruwe, T. A.; Vieth, K. R.; Jung, G.; Casu, C.; Rivella, S.; Jormakka, M.; Mackenzie, B.; Ganz, T.; Nemeth, E. Structure-Function Analysis of Ferroportin Defines the Binding Site and an Alternative Mechanism of Action of Heparin. *Blood* **2018**, *131* (8), 899–910. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786590>.
- (58) Billesbølle, C. B.; Azumaya, C. M.; Kretsch, R. C.; Powers, A. S.; Gonen, S.; Schneider, S.; Arvedson, T.; Dror, R. O.; Cheng, Y.; Manglik, A. Structure of Heparin-Bound Ferroportin Reveals Iron Homeostatic Mechanisms. *Nature* **2020**, *586* (7831), 807–811. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2668-z>.
- (59) Daher, R.; Lefebvre, T.; Puy, H.; Karim, Z. Extrahepatic Heparin Production: The Intriguing Outcomes of Recent Years. *World J. Clin. Cases* **2019**, *7* (15), 1926–1936. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i15.1926>.
- (60) Merle, U.; Fein, E.; Gehrke, S. G.; Stremmel, W.; Kulaksiz, H. The Iron Regulatory Peptide Heparin Is Expressed in the Heart and Regulated by Hypoxia and Inflammation. *Endocrinology* **2007**, *148* (6), 2663–2668. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1331>.
- (61) Bessman, N. J.; Mathieu, J. R. R.; Renassia, C.; Zhou, L.; Fung, T. C.; Fernandez, K. C.; Austin, C.; Moeller, J. B.; Zumerle, S.; Louis, S.; Vaulont, S.; Ajami, N. J.; Sokol, H.; Putzel, G. G.; Arvedson, T.; Sockolow, R. E.; Lakhali-Littleton, S.; Cloonan, S. M.; Arora, M.; Peyssonnaud, C.; Sonnenberg, G. F. Dendritic Cell-Derived Heparin Sequesters Iron from the Microbiota to Promote Mucosal Healing. *Science* **2020**, *368* (6487), 186–189. <https://doi.org/10.1126/science.aau6481>.
- (62) Pinto, J. P.; Dias, V.; Zoller, H.; Porto, G.; Carmo, H.; Carvalho, F.; De Sousa, M. Heparin Messenger RNA Expression in Human Lymphocytes. *Immunology* **2010**, *130* (2), 217–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x>.

- (63) Theurl, I.; Theurl, M.; Seifert, M.; Mair, S.; Nairz, M.; Rumpold, H.; Zoller, H.; Bellmann-Weiler, R.; Niederegger, H.; Talasz, H.; Weiss, G. Autocrine Formation of Hepcidin Induces Iron Retention in Human Monocytes. *Blood* **2008**, *111* (4), 2392–2399. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-090019>.
- (64) Peyssonnaud, C.; Zinkernagel, A. S.; Datta, V.; Lauth, X.; Johnson, R. S.; Nizet, V. TLR4-Dependent Hepcidin Expression by Myeloid Cells in Response to Bacterial Pathogens. *Blood* **2006**, *107* (9), 3727–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2259>.
- (65) Zumerle, S.; Mathieu, J. R. R.; Delga, S.; Heinis, M.; Viatte, L.; Vaulont, S.; Peyssonnaud, C. Targeted Disruption of Hepcidin in the Liver Recapitulates the Hemochromatotic Phenotype. *Blood* **2014**, *123* (23), 3646–3650. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-550467>.
- (66) Nemeth, E.; Ganz, T. Hepcidin and Iron in Health and Disease. *Annu. Rev. Med.* **2023**, *74* (Volume 74, 2023), 261–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-032816>.
- (67) Sharma, A.; Kumar, A.; Saha, P. K.; Saha, L. The Role of TMPRSS6 Gene Polymorphism in Iron Resistance Iron Deficiency Anaemia (IRIDA): A Systematic Review. *Ann. Hematol.* **2024**, *103* (4), 1085–1102. <https://doi.org/10.1007/s00277-023-05576-w>.
- (68) Roth, M.-P.; Meynard, D.; Coppin, H. Chapter Five - Regulators of Hepcidin Expression. In *Vitamins and Hormones*; Litwack, G., Ed.; Iron Metabolism: Hepcidin; Academic Press, 2019; Vol. 110, pp 101–129. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.005>.
- (69) Babitt, J. L.; Huang, F. W.; Wrighting, D. M.; Xia, Y.; Sidis, Y.; Samad, T. A.; Campagna, J. A.; Chung, R. T.; Schneyer, A. L.; Woolf, C. J.; Andrews, N. C.; Lin, H. Y. Bone Morphogenetic Protein Signaling by Hemojuvelin Regulates Hepcidin Expression. *Nat. Genet.* **2006**, *38* (5), 531–539. <https://doi.org/10.1038/ng1777>.
- (70) Silvestri, L.; Nai, A.; Dulja, A.; Pagani, A. Hepcidin and the BMP-SMAD Pathway: An Unexpected Liaison. *Vitam. Horm.* **2019**, *110*, 71–99. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.004>.
- (71) Canali, S.; Zumbrennen-Bullough, K. B.; Core, A. B.; Wang, C.-Y.; Nairz, M.; Bouley, R.; Swirski, F. K.; Babitt, J. L. Endothelial Cells Produce Bone Morphogenetic Protein 6 Required for Iron Homeostasis in Mice. *Blood* **2017**, *129* (4), 405–414. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-721571>.
- (72) Canali, S.; Wang, C.-Y.; Zumbrennen-Bullough, K. B.; Bayer, A.; Babitt, J. L. Bone Morphogenetic Protein 2 Controls Iron Homeostasis in Mice Independent of Bmp6. *Am. J. Hematol.* **2017**, *92* (11), 1204–1213. <https://doi.org/10.1002/ajh.24888>.

- (73) Meynard, D.; Kautz, L.; Darnaud, V.; Canonne-Hergaux, F.; Coppin, H.; Roth, M.-P. Lack of the Bone Morphogenetic Protein BMP6 Induces Massive Iron Overload. *Nat. Genet.* **2009**, *41* (4), 478–481. <https://doi.org/10.1038/ng.320>.
- (74) Koch, P.-S.; Olsavszky, V.; Ulbrich, F.; Sticht, C.; Demory, A.; Leibing, T.; Henzler, T.; Meyer, M.; Zierow, J.; Schneider, S.; Breitkopf-Heinlein, K.; Gaitantzi, H.; Spencer-Dene, B.; Arnold, B.; Klapproth, K.; Schledzewski, K.; Goerdts, S.; Géraud, C. Angiocrine Bmp2 Signaling in Murine Liver Controls Normal Iron Homeostasis. *Blood* **2017**, *129* (4), 415–419. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-729822>.
- (75) Kautz, L.; Besson-Fournier, C.; Meynard, D.; Latour, C.; Roth, M.-P.; Coppin, H. Iron Overload Induces BMP6 Expression in the Liver but Not in the Duodenum. *Haematologica* **2011**, *96* (2), 199–203. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031963>.
- (76) Colucci, S.; Altamura, S.; Marques, O.; Müdder, K.; Agarvas, A. R.; Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U. Iron-Dependent BMP6 Regulation in Liver Sinusoidal Endothelial Cells Is Instructed by Hepatocyte-Derived Secretory Signals. *HemaSphere* **2022**, *6* (10), e773. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000773>.
- (77) *Hémochromatoses juvéniles - FFH | France Fer Hémochromatose | Association nationale.* <https://www.hemochromatose.org/hemochromatoses-juveniles/> (accessed 2024-07-12).
- (78) Kautz, L.; Meynard, D.; Monnier, A.; Darnaud, V.; Bouvet, R.; Wang, R.-H.; Deng, C.; Vaulont, S.; Mosser, J.; Coppin, H.; Roth, M.-P. Iron Regulates Phosphorylation of Smad1/5/8 and Gene Expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the Mouse Liver. *Blood* **2008**, *112* (4), 1503–1509. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143354>.
- (79) Worthen, C. A.; Enns, C. A. The Role of Hepatic Transferrin Receptor 2 in the Regulation of Iron Homeostasis in the Body. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 34. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00034>.
- (80) Johnson, M. B.; Enns, C. A. Diferric Transferrin Regulates Transferrin Receptor 2 Protein Stability. *Blood* **2004**, *104* (13), 4287–4293. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2477>.
- (81) Levy, J. E.; Jin, O.; Fujiwara, Y.; Kuo, F.; Andrews, N. C. Transferrin Receptor Is Necessary for Development of Erythrocytes and the Nervous System. *Nat. Genet.* **1999**, *21* (4), 396–399. <https://doi.org/10.1038/7727>.
- (82) Alvarenga, A. M.; Brissot, P.; Santos, P. C. J. L. Haemochromatosis Revisited. *World J. Hepatol.* **2022**, *14* (11), 1931–1939. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i11.1931>.
- (83) Chen, J.; Chloupková, M.; Gao, J.; Chapman-Arvedson, T. L.; Enns, C. A. HFE Modulates Transferrin Receptor 2 Levels in Hepatoma Cells via Interactions That

- Differ from Transferrin Receptor 1-HFE Interactions *. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (51), 36862–36870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706720200>.
- (84) Gao, J.; Chen, J.; Kramer, M.; Tsukamoto, H.; Zhang, A.-S.; Enns, C. A. Interaction of the Hereditary Hemochromatosis Protein HFE with Transferrin Receptor 2 Is Required for Transferrin-Induced Heparin Expression. *Cell Metab.* **2009**, *9* (3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.010>.
- (85) Rishi, G.; Crampton, E. M.; Wallace, D. F.; Subramaniam, V. N. In Situ Proximity Ligation Assays Indicate That Hemochromatosis Proteins Hfe and Transferrin Receptor 2 (Tfr2) Do Not Interact. *PLOS ONE* **2013**, *8* (10), e77267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077267>.
- (86) Schmidt, P. J.; Fleming, M. D. Transgenic HFE-Dependent Induction of Heparin in Mice Does Not Require Transferrin Receptor-2. *Am. J. Hematol.* **2012**, *87* (6), 588–595. <https://doi.org/10.1002/ajh.23173>.
- (87) Xiao, X.; Moschetta, G. A.; Xu, Y.; Fisher, A. L.; Alfaro-Magallanes, V. M.; Dev, S.; Wang, C.-Y.; Babitt, J. L. Regulation of Iron Homeostasis by Hepatocyte Tfr1 Requires HFE and Contributes to Heparin Suppression in β -Thalassemia. *Blood* **2023**, *141* (4), 422–432. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017811>.
- (88) Park, C. H.; Valore, E. V.; Waring, A. J.; Ganz, T. Heparin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver *. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (11), 7806–7810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>.
- (89) Nemeth, E.; Rivera, S.; Gabayan, V.; Keller, C.; Taudorf, S.; Pedersen, B. K.; Ganz, T. IL-6 Mediates Hypoferremia of Inflammation by Inducing the Synthesis of the Iron Regulatory Hormone Heparin. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113* (9), 1271–1276. <https://doi.org/10.1172/JCI200420945>.
- (90) Wrighting, D. M.; Andrews, N. C. Interleukin-6 Induces Heparin Expression through STAT3. *Blood* **2006**, *108* (9), 3204–3209. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027631>.
- (91) Pietrangelo, A.; Dierssen, U.; Valli, L.; Garuti, C.; Rump, A.; Corradini, E.; Ernst, M.; Klein, C.; Trautwein, C. STAT3 Is Required for IL-6-Gp130-Dependent Activation of Heparin in Vivo. *Gastroenterology* **2007**, *132* (1), 294–300. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.018>.
- (92) Lee, P.; Peng, H.; Gelbart, T.; Wang, L.; Beutler, E. Regulation of Heparin Transcription by Interleukin-1 and Interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (6), 1906–1910. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409808102>.
- (93) Smith, C. L.; Arvedson, T. L.; Cooke, K. S.; Dickmann, L. J.; Forte, C.; Li, H.; Merriam, K. L.; Perry, V. K.; Tran, L.; Rottman, J. B.; Maxwell, J. R. IL-22 Regulates Iron Availability in Vivo through the Induction of Heparin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2013**, *191* (4), 1845–1855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202716>.

- (94) Wang, R.-H.; Li, C.; Xu, X.; Zheng, Y.; Xiao, C.; Zerfas, P.; Cooperman, S.; Eckhaus, M.; Rouault, T.; Mishra, L.; Deng, C.-X. A Role of SMAD4 in Iron Metabolism through the Positive Regulation of Hepcidin Expression. *Cell Metab.* **2005**, 2 (6), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.10.010>.
- (95) Verga Falzacappa, M. V.; Casanovas, G.; Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U. 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), 531–540. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0313-7>.
- (96) Besson-Fournier, C.; Gineste, A.; Latour, C.; Goubeyre, O.; Meynard, D.; Martin, P.; Oswald, E.; Coppin, H.; Roth, M.-P. Hepcidin Upregulation by Inflammation Is Independent of Smad1/5/8 Signaling by Activin B. *Blood* **2017**, 129 (4), 533–536. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-748541>.
- (97) Canali, S.; Core, A. B.; Zumbrennen-Bullough, K. B.; Merkulova, M.; Wang, C.-Y.; Schneyer, A. L.; Pietrangelo, A.; Babitt, J. L. Activin B Induces Noncanonical SMAD1/5/8 Signaling via BMP Type I Receptors in Hepatocytes: Evidence for a Role in Hepcidin Induction by Inflammation in Male Mice. *Endocrinology* **2016**, 157 (3), 1146–1162. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1747>.
- (98) Mayeur, C.; Lohmeyer, L. K.; Leyton, P.; Kao, S. M.; Pappas, A. E.; Kolodziej, S. A.; Spagnoli, E.; Yu, B.; Galdos, R. L.; Yu, P. B.; Peterson, R. T.; Bloch, D. B.; Bloch, K. D.; Steinbicker, A. U. The Type I BMP Receptor Alk3 Is Required for the Induction of Hepatic Hepcidin Gene Expression by Interleukin-6. *Blood* **2014**, 123 (14), 2261–2268. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-480095>.
- (99) Meynard, D.; Sun, C. C.; Wu, Q.; Chen, W.; Chen, S.; Nelson, C. N.; Waters, M. J.; Babitt, J. L.; Lin, H. Y. Inflammation Regulates TMPRSS6 Expression via STAT5. *PLoS One* **2013**, 8 (12), e82127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082127>.
- (100) Weiss, G.; Ganz, T.; Goodnough, L. T. Anemia of Inflammation. *Blood* **2019**, 133 (1), 40–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-856500>.
- (101) McGrath, K. E.; Catherman, S. C.; Palis, J. Delineating Stages of Erythropoiesis Using Imaging Flow Cytometry. *Methods* **2017**, 112, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.08.012>.
- (102) Nairz, M.; Theurl, I.; Swirski, F. K.; Weiss, G. “Pumping Iron”—How Macrophages Handle Iron at the Systemic, Microenvironmental, and Cellular Levels. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **2017**, 469 (3), 397–418. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1944-8>.
- (103) Ginzburg, Y.; An, X.; Rivella, S.; Goldfarb, A. Normal and Dysregulated Crosstalk between Iron Metabolism and Erythropoiesis. *eLife* **2023**, 12, e90189. <https://doi.org/10.7554/eLife.90189>.

- (104) Fan, N.; Lavu, S.; Hanson, C. A.; Tefferi, A. Extramedullary Hematopoiesis in the Absence of Myeloproliferative Neoplasm: Mayo Clinic Case Series of 309 Patients. *Blood Cancer J.* **2018**, *8* (12), 119. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0156-6>.
- (105) Lenox, L. E.; Shi, L.; Hegde, S.; Paulson, R. F. Extramedullary Erythropoiesis in the Adult Liver Requires BMP4/Smad5 Dependent Signaling. *Exp. Hematol.* **2009**, *37* (5), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.01.004>.
- (106) Porayette, P.; Paulson, R. F. BMP4/Smad5 Dependent Stress Erythropoiesis Is Required for the Expansion of Erythroid Progenitors during Fetal Development. *Dev. Biol.* **2008**, *317* (1), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.047>.
- (107) Vokurka, M.; Krijt, J.; Šulc, K.; Nečas, E. Hepcidin mRNA Levels in Mouse Liver Respond to Inhibition of Erythropoiesis. *Physiol. Res.* **2006**, 667–674. <https://doi.org/10.33549/physiolres.930841>.
- (108) Ashby, D. R.; Gale, D. P.; Busbridge, M.; Murphy, K. G.; Duncan, N. D.; Cairns, T. D.; Taube, D. H.; Bloom, S. R.; Tam, F. W. K.; Chapman, R.; Maxwell, P. H.; Choi, P. Erythropoietin Administration in Humans Causes a Marked and Prolonged Reduction in Circulating Hepcidin. *Haematologica* **2010**, *95* (3), 505–508. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.013136>.
- (109) Pak, M.; Lopez, M. A.; Gabayan, V.; Ganz, T.; Rivera, S. Suppression of Hepcidin during Anemia Requires Erythropoietic Activity. *Blood* **2006**, *108* (12), 3730–3735. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-028787>.
- (110) Finch, C. Regulators of Iron Balance in Humans.
- (111) Tanno, T.; Bhanu, N. V.; Oneal, P. A.; Goh, S.-H.; Staker, P.; Lee, Y. T.; Moroney, J. W.; Reed, C. H.; Luban, N. L. C.; Wang, R.-H.; Eling, T. E.; Childs, R.; Ganz, T.; Leitman, S. F.; Fucharoen, S.; Miller, J. L. High Levels of GDF15 in Thalassemia Suppress Expression of the Iron Regulatory Protein Hepcidin. *Nat. Med.* **2007**, *13* (9), 1096–1101. <https://doi.org/10.1038/nm1629>.
- (112) Tanno, T.; Porayette, P.; Sripichai, O.; Noh, S.-J.; Byrnes, C.; Bhupatiraju, A.; Lee, Y. T.; Goodnough, J. B.; Harandi, O.; Ganz, T.; Paulson, R. F.; Miller, J. L. Identification of TWSG1 as a Second Novel Erythroid Regulator of Hepcidin Expression in Murine and Human Cells. *Blood* **2009**, *114* (1), 181–186. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195503>.
- (113) Casanovas, G.; Vujić Spasic, M.; Casu, C.; Rivella, S.; Strelau, J.; Unsicker, K.; Muckenthaler, M. U. The Murine Growth Differentiation Factor 15 Is Not Essential for Systemic Iron Homeostasis in Phlebotomized Mice. *Haematologica* **2013**, *98* (3), 444–447. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.069807>.
- (114) Kautz, L.; Jung, G.; Valore, E. V.; Rivella, S.; Nemeth, E.; Ganz, T. Identification of Erythroferrone as an Erythroid Regulator of Iron Metabolism. *Nat. Genet.* **2014**, *46* (7), 678–684. <https://doi.org/10.1038/ng.2996>.

- (115) Arezes, J.; Foy, N.; McHugh, K.; Sawant, A.; Quinkert, D.; Terraube, V.; Brinth, A.; Tam, M.; LaVallie, E. R.; Taylor, S.; Armitage, A. E.; Pasricha, S.-R.; Cunningham, O.; Lambert, M.; Draper, S. J.; Jasuja, R.; Drakesmith, H. Erythroferrone Inhibits the Induction of Heparin by BMP6. *Blood* **2018**, *132* (14), 1473–1477. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-857995>.
- (116) Wang, C.-Y.; Xu, Y.; Traeger, L.; Dogan, D. Y.; Xiao, X.; Steinbicker, A. U.; Babitt, J. L. Erythroferrone Lowers Heparin by Sequestering BMP2/6 Heterodimer from Binding to the BMP Type I Receptor ALK3. *Blood* **2020**, *135* (6), 453–456. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002620>.
- (117) Kautz, L.; Jung, G.; Du, X.; Gabayan, V.; Chapman, J.; Nasoff, M.; Nemeth, E.; Ganz, T. Erythroferrone Contributes to Heparin Suppression and Iron Overload in a Mouse Model of β -Thalassemia. *Blood* **2015**, *126* (17), 2031–2037. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-658419>.
- (118) Peyssonnaud, C.; Nizet, V.; Johnson, R. S. Role of the Hypoxia Inducible Factors HIF in Iron Metabolism. *Cell Cycle* **2008**, *7* (1), 28–32. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5145>.
- (119) Wenger, R. H. Cellular Adaptation to Hypoxia: O₂-Sensing Protein Hydroxylases, Hypoxia-Inducible Transcription Factors, and O₂-Regulated Gene Expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2002**, *16* (10), 1151–1162. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0944rev>.
- (120) Choudhry, H.; Harris, A. L. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab.* **2018**, *27* (2), 281–298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005>.
- (121) Chepelev, N. L.; Willmore, W. G. Regulation of Iron Pathways in Response to Hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50* (6), 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.023>.
- (122) Peyssonnaud, C.; Zinkernagel, A. S.; Schuepbach, R. A.; Rankin, E.; Vaulont, S.; Haase, V. H.; Nizet, V.; Johnson, R. S. Regulation of Iron Homeostasis by the Hypoxia-Inducible Transcription Factors (HIFs). *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (7), 1926–1932. <https://doi.org/10.1172/JCI31370>.
- (123) Shah, Y. M.; Matsubara, T.; Ito, S.; Yim, S.-H.; Gonzalez, F. J. Intestinal Hypoxia-Inducible Transcription Factors Are Essential for Iron Absorption Following Iron Deficiency. *Cell Metab.* **2009**, *9* (2), 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.012>.
- (124) Lakhal, S.; Schödel, J.; Townsend, A. R. M.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Mole, D. R. Regulation of Type II Transmembrane Serine Proteinase TMPRSS6 by Hypoxia-Inducible Factors. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (6), 4090–4097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.173096>.
- (125) Sardo, U.; Perrier, P.; Cormier, K.; Sotin, M.; Personnaz, J.; Medjbeur, T.; Desquesnes, A.; Cannizzo, L.; Ruiz-Martinez, M.; Thevenin, J.; Billoré, B.; Jung, G.; Abboud, E.; Peyssonnaud, C.; Nemeth, E.; Ginzburg, Y. Z.; Ganz, T.; Kautz,

- L. The Hepatokine FGL1 Regulates Heparin and Iron Metabolism during Anemia in Mice by Antagonizing BMP Signaling. *Blood* **2024**, *143* (13), 1282–1292. <https://doi.org/10.1182/blood.2023022724>.
- (126) Altamura, S.; D'Alessio, F.; Selle, B.; Muckenthaler, M. U. A Novel TMPRSS6 Mutation That Prevents Protease Auto-Activation Causes IRIDA. *Biochem. J.* **2010**, *431* (3), 363–371. <https://doi.org/10.1042/BJ20100668>.
- (127) Ramsay, A. J.; Reid, J. C.; Velasco, G.; Quigley, J. P.; Hooper, J. D. The Type II Transmembrane Serine Protease Matriptase-2--Identification, Structural Features, Enzymology, Expression Pattern and Potential Roles. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2008**, *13*, 569–579. <https://doi.org/10.2741/2702>.
- (128) Silvestri, L.; Pagani, A.; Nai, A.; De Domenico, I.; Kaplan, J.; Camaschella, C. The Serine Protease Matriptase-2 (TMPRSS6) Inhibits Heparin Activation by Cleaving Membrane Hemojuvelin. *Cell Metab.* **2008**, *8* (6), 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.012>.
- (129) Du, X.; She, E.; Gelbart, T.; Truksa, J.; Lee, P.; Xia, Y.; Khovananth, K.; Mudd, S.; Mann, N.; Moresco, E. M. Y.; Beutler, E.; Beutler, B. The Serine Protease TMPRSS6 Is Required to Sense Iron Deficiency. *Science* **2008**, *320* (5879), 1088–1092. <https://doi.org/10.1126/science.1157121>.
- (130) Finberg, K. E.; Heeney, M. M.; Campagna, D. R.; Aydinok, Y.; Pearson, H. A.; Hartman, K. R.; Mayo, M. M.; Samuel, S. M.; Strouse, J. J.; Markianos, K.; Andrews, N. C.; Fleming, M. D. Mutations in TMPRSS6 Cause Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia (IRIDA). *Nat. Genet.* **2008**, *40* (5), 569–571. <https://doi.org/10.1038/ng.130>.
- (131) Finberg, K. E.; Whittlesey, R. L.; Fleming, M. D.; Andrews, N. C. Down-Regulation of Bmp/Smad Signaling by Tmprss6 Is Required for Maintenance of Systemic Iron Homeostasis. *Blood* **2010**, *115* (18), 3817–3826. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224808>.
- (132) Krijt, J.; Fujikura, Y.; Ramsay, A. J.; Velasco, G.; Nečas, E. Liver Hemojuvelin Protein Levels in Mice Deficient in Matriptase-2 (Tmprss6). *Blood Cells. Mol. Dis.* **2011**, *47* (2), 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2011.04.009>.
- (133) Frýdlová, J.; Fujikura, Y.; Vokurka, M.; Nečas, E.; Krijt, J. Decreased Hemojuvelin Protein Levels in Mask Mice Lacking Matriptase-2-Dependent Proteolytic Activity. *Physiol. Res.* **2013**, *62* (4), 405–411. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932455>.
- (134) Nicolas, G.; Deschemin, J.-C.; Ramsay, A. J.; Mayeux, P.; Grandchamp, B.; Beaumont, C.; Velasco, G.; Vaulont, S. Is EPO Therapy Able to Correct Iron Deficiency Anaemia Caused by Matriptase-2 Deficiency? *Br. J. Haematol.* **2011**, *152* (4), 498–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08473.x>.
- (135) Nai, A.; Rubio, A.; Campanella, A.; Gourbeyre, O.; Artuso, I.; Bordini, J.; Gineste, A.; Latour, C.; Besson-Fournier, C.; Lin, H. Y.; Coppin, H.; Roth, M.-P.;

- Camaschella, C.; Silvestri, L.; Meynard, D. Limiting Hepatic Bmp-Smad Signaling by Matriptase-2 Is Required for Erythropoietin-Mediated Heparin Suppression in Mice. *Blood* **2016**, *127* (19), 2327–2336. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-681494>.
- (136) Coffey, R.; Ganz, T. Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Heparin and Iron Metabolism. *HemaSphere* **2018**, *2* (2), e35. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000035>.
- (137) Zhang, A.-S.; Anderson, S. A.; Wang, J.; Yang, F.; DeMaster, K.; Ahmed, R.; Nizzi, C. P.; Eisenstein, R. S.; Tsukamoto, H.; Enns, C. A. Suppression of Hepatic Heparin Expression in Response to Acute Iron Deprivation Is Associated with an Increase of Matriptase-2 Protein. *Blood* **2011**, *117* (5), 1687–1699. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-287292>.
- (138) Meynard, D.; Vaja, V.; Sun, C. C.; Corradini, E.; Chen, S.; López-Otín, C.; Grgurevic, L.; Hong, C. C.; Stirnberg, M.; Gütschow, M.; Vukicevic, S.; Babitt, J. L.; Lin, H. Y. Regulation of TMPRSS6 by BMP6 and Iron in Human Cells and Mice. *Blood* **2011**, *118* (3), 747–756. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348698>.
- (139) Maurer, E.; Gütschow, M.; Stirnberg, M. Matriptase-2 (TMPRSS6) Is Directly up-Regulated by Hypoxia Inducible Factor-1: Identification of a Hypoxia-Responsive Element in the TMPRSS6 Promoter Region. *Biol. Chem.* **2012**, *393* (6), 535–540. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0221>.
- (140) Peng, H.; Truksa, J.; Lee, P. EPO-Mediated Reduction in Hamp Expression in Vivo Corrects Iron Deficiency Anaemia in TMPRSS6 Deficiency. *Br. J. Haematol.* **2010**, *151* (1), 106–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08306.x>.
- (141) Katsarou, M.-S.; Papasavva, M.; Latsi, R.; Drakoulis, N. Hemochromatosis: Hereditary Hemochromatosis and HFE Gene. *Vitam. Horm.* **2019**, *110*, 201–222. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.010>.
- (142) Rivella, S. Iron Metabolism under Conditions of Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia. *Blood* **2019**, *133* (1), 51–58. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-815928>.
- (143) Origa, R.; Galanello, R.; Ganz, T.; Giagu, N.; Maccioni, L.; Faa, G.; Nemeth, E. Liver Iron Concentrations and Urinary Heparin in Beta-Thalassemia. *Haematologica* **2007**, *92* (5), 583–588. <https://doi.org/10.3324/haematol.10842>.
- (144) Camaschella, C. Iron Deficiency: New Insights into Diagnosis and Treatment. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2015**, *2015*, 8–13. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.8>.
- (145) Ganz, T. Anemia of Inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381* (12), 1148–1157. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1804281>.

- (146) Vu, T.-K. H.; Hung, D. T.; Wheaton, V. I.; Coughlin, S. R. Molecular Cloning of a Functional Thrombin Receptor Reveals a Novel Proteolytic Mechanism of Receptor Activation. *Cell* **1991**, *64* (6), 1057–1068. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90261-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90261-V).
- (147) Heuberger, D. M.; Schuepbach, R. A. Protease-Activated Receptors (PARs): Mechanisms of Action and Potential Therapeutic Modulators in PAR-Driven Inflammatory Diseases. *Thromb. J.* **2019**, *17* (1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12959-019-0194-8>.
- (148) Renna, S. A.; McKenzie, S. E.; Michael, J. V. Species Differences in Platelet Protease-Activated Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (9), 8298. <https://doi.org/10.3390/ijms24098298>.
- (149) Sambrano, G. R.; Weiss, E. J.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Coughlin, S. R. Role of Thrombin Signalling in Platelets in Haemostasis and Thrombosis. *Nature* **2001**, *413* (6851), 74–78. <https://doi.org/10.1038/35092573>.
- (150) Rothmeier, A. S.; Ruf, W. Protease-Activated Receptor 2 Signaling in Inflammation. *Semin. Immunopathol.* **2012**, *34* (1), 133–149. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0289-1>.
- (151) Hollenberg, M. D.; Mihara, K.; Polley, D.; Suen, J. Y.; Han, A.; Fairlie, D. P.; Ramachandran, R. Biased Signalling and Proteinase-Activated Receptors (PARs): Targeting Inflammatory Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (5), 1180–1194. <https://doi.org/10.1111/bph.12544>.
- (152) Adams, M. N.; Ramachandran, R.; Yau, M.-K.; Suen, J. Y.; Fairlie, D. P.; Hollenberg, M. D.; Hooper, J. D. Structure, Function and Pathophysiology of Protease Activated Receptors. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *130* (3), 248–282. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.003>.
- (153) Zhao, P.; Metcalf, M.; Bunnett, N. W. Biased Signaling of Protease-Activated Receptors. *Front. Endocrinol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00067>.
- (154) Scarborough, R. M.; Naughton, M. A.; Teng, W.; Hung, D. T.; Rose, J.; Vu, T. K.; Wheaton, V. I.; Turck, C. W.; Coughlin, S. R. Tethered Ligand Agonist Peptides. Structural Requirements for Thrombin Receptor Activation Reveal Mechanism of Proteolytic Unmasking of Agonist Function. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (19), 13146–13149. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42184-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42184-9).
- (155) Ramachandran, R.; Mihara, K.; Chung, H.; Renaux, B.; Lau, C. S.; Muruve, D. A.; DeFea, K. A.; Bouvier, M.; Hollenberg, M. D. Neutrophil Elastase Acts as a Biased Agonist for Proteinase-Activated Receptor-2 (PAR2). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (28), 24638–24648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201988>.
- (156) Nystedt, S.; Emilsson, K.; Wahlestedt, C.; Sundelin, J. Molecular Cloning of a Potential Proteinase Activated Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (20), 9208–9212.

- (157) Peach, C. J.; Edgington-Mitchell, L. E.; Bunnett, N. W.; Schmidt, B. L. Protease-Activated Receptors in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2023**, *103* (1), 717–785. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2021>.
- (158) Han, X.; Nieman, M. T.; Kerlin, B. A. Protease-activated Receptors: An Illustrated Review. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **2020**, *5* (1), 17–26. <https://doi.org/10.1002/rth2.12454>.
- (159) Cheng, R. K. Y.; Fiez-Vandal, C.; Schlenker, O.; Edman, K.; Aggeler, B.; Brown, D. G.; Brown, G. A.; Cooke, R. M.; Dumelin, C. E.; Doré, A. S.; Geschwindner, S.; Grebner, C.; Hermansson, N.-O.; Jazayeri, A.; Johansson, P.; Leong, L.; Prihandoko, R.; Rappas, M.; Soutter, H.; Snijder, A.; Sundström, L.; Tehan, B.; Thornton, P.; Troast, D.; Wiggin, G.; Zhukov, A.; Marshall, F. H.; Dekker, N. Structural Insight into Allosteric Modulation of Protease-Activated Receptor 2. *Nature* **2017**, *545* (7652), 112–115. <https://doi.org/10.1038/nature22309>.
- (160) Molino, M.; Barnathan, E. S.; Numerof, R.; Clark, J.; Dreyer, M.; Cumashi, A.; Hoxie, J. A.; Schechter, N.; Woolkalis, M.; Brass, L. F. Interactions of Mast Cell Tryptase with Thrombin Receptors and PAR-2. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (7), 4043–4049. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4043>.
- (161) Camerer, E.; Huang, W.; Coughlin, S. R. Tissue Factor- and Factor X-Dependent Activation of Protease-Activated Receptor 2 by Factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (10), 5255–5260.
- (162) Smith, R.; Jenkins, A.; Lourbakos, A.; Thompson, P.; Ramakrishnan, V.; Tomlinson, J.; Deshpande, U.; Johnson, D. A.; Jones, R.; Mackie, E. J.; Pike, R. N. Evidence for the Activation of PAR-2 by the Sperm Protease, Acrosin: Expression of the Receptor on Oocytes. *FEBS Lett.* **2000**, *484* (3), 285–290. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02146-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02146-3).
- (163) Takeuchi, T.; Harris, J. L.; Huang, W.; Yan, K. W.; Coughlin, S. R.; Craik, C. S. Cellular Localization of Membrane-Type Serine Protease 1 and Identification of Protease-Activated Receptor-2 and Single-Chain Urokinase-Type Plasminogen Activator as Substrates *. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (34), 26333–26342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002941200>.
- (164) Cottrell, G. S.; Amadesi, S.; Grady, E. F.; Bunnett, N. W. Trypsin IV, a Novel Agonist of Protease-Activated Receptors 2 and 4. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (14), 13532–13539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312090200>.
- (165) Hansen, K. K.; Sherman, P. M.; Cellars, L.; Andrade-Gordon, P.; Pan, Z.; Baruch, A.; Wallace, J. L.; Hollenberg, M. D.; Vergnolle, N. A Major Role for Proteolytic Activity and Proteinase-Activated Receptor-2 in the Pathogenesis of Infectious Colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (23), 8363–8368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409535102>.
- (166) Wilson, S.; Greer, B.; Hooper, J.; Zijlstra, A.; Walker, B.; Quigley, J.; Hawthorne, S. The Membrane-Anchored Serine Protease, TMPRSS2, Activates PAR-2 in

- Prostate Cancer Cells. *Biochem. J.* **2005**, *388* (Pt 3), 967–972. <https://doi.org/10.1042/BJ20041066>.
- (167) Oikonomopoulou, K.; Hansen, K. K.; Saifeddine, M.; Vergnolle, N.; Tea, I.; Blaber, M.; Blaber, S. I.; Scarisbrick, I.; Diamandis, E. P.; Hollenberg, M. D. Kallikrein-Mediated Cell Signalling: Targeting Proteinase-Activated Receptors (PARs). *Biol. Chem.* **2006**, *387* (6), 817–824. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.104>.
- (168) Li-li, C.; Perng, D.-W.; Yu, C.-H.; Su, S.-N.; Chow, L.-P. Mold Allergen, Pen c 13, Induces IL-8 Expression in Human Airway Epithelial Cells by Activating Protease-Activated Receptor 1 and 21. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2007**, *178*, 5237–5244. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5237>.
- (169) Macfarlane, S. R.; Seatter, M. J.; Kanke, T.; Hunter, G. D.; Plevin, R. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53* (2), 245–282.
- (170) Avet, C.; Sturino, C.; Grastilleur, S.; Gouill, C. L.; Semache, M.; Gross, F.; Gendron, L.; Bennani, Y.; Mancini, J. A.; Sayegh, C. E.; Bouvier, M. The PAR2 Inhibitor I-287 Selectively Targets Gαq and Gα12/13 Signaling and Has Anti-Inflammatory Effects. *Commun. Biol.* **2020**, *3* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01453-8>.
- (171) Ayoub, M. A.; Pin, J.-P. Interaction of Protease-Activated Receptor 2 with G Proteins and β-Arrestin 1 Studied by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*, 196. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00196>.
- (172) Chandrabalan, A.; Ramachandran, R. Molecular Mechanisms Regulating Proteinase-Activated Receptors (PARs). *FEBS J.* **2021**, *288* (8), 2697–2726. <https://doi.org/10.1111/febs.15829>.
- (173) Saifeddine, M.; al-Ani, B.; Cheng, C. H.; Wang, L.; Hollenberg, M. D. Rat Proteinase-Activated Receptor-2 (PAR-2): cDNA Sequence and Activity of Receptor-Derived Peptides in Gastric and Vascular Tissue. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118* (3), 521–530.
- (174) Cenac, N. Protease-Activated Receptors as Therapeutic Targets in Visceral Pain. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (6), 598–605. <https://doi.org/10.2174/1570159X113119990039>.
- (175) Kawabata, A.; Kuroda, R.; Nishida, M.; Nagata, N.; Sakaguchi, Y.; Kawao, N.; Nishikawa, H.; Arizono, N.; Kawai, K. Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) in the Pancreas and Parotid Gland: Immunolocalization and Involvement of Nitric Oxide in the Evoked Amylase Secretion. *Life Sci.* **2002**, *71* (20), 2435–2446. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02044-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02044-1).
- (176) Ku, D. D. Mechanism of Thrombin-Induced Endothelium-Dependent Coronary Vasodilation in Dogs: Role of Its Proteolytic Enzymatic Activity. *J. Cardiovasc.*

Pharmacol. **1986**, 8 (1), 29–36. <https://doi.org/10.1097/00005344-198601000-00005>.

- (177) al-Ani, B.; Saifeddine, M.; Hollenberg, M. D. Detection of Functional Receptors for the Proteinase-Activated-Receptor-2-Activating Polypeptide, SLIGRL-NH₂, in Rat Vascular and Gastric Smooth Muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1995**, 73 (8), 1203–1207. <https://doi.org/10.1139/y95-172>.
- (178) Cicala, C. Protease Activated Receptor 2 and the Cardiovascular System. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, 135 (1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704438>.
- (179) Jones, S. M.; Mann, A.; Conrad, K.; Saum, K.; Hall, D. E.; McKinney, L. M.; Robbins, N.; Thompson, J.; Peairs, A. D.; Camerer, E.; Rayner, K. J.; Tranter, M.; Mackman, N.; Owens, A. P. PAR2 (Protease-Activated Receptor 2) Deficiency Attenuates Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, 38 (6), 1271–1282. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310082>.
- (180) Disse, J.; Petersen, H. H.; Larsen, K. S.; Persson, E.; Esmon, N.; Esmon, C. T.; Teyton, L.; Petersen, L. C.; Ruf, W. The Endothelial Protein C Receptor Supports Tissue Factor Ternary Coagulation Initiation Complex Signaling through Protease-Activated Receptors. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (7), 5756–5767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201228>.
- (181) Johansson, U.; Lawson, C.; Dabare, M.; Syndercombe-Court, D.; Newland, A. C.; Howells, G. L.; Macey, M. G. Human Peripheral Blood Monocytes Express Protease Receptor-2 and Respond to Receptor Activation by Production of IL-6, IL-8, and IL-1{beta}. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, 78 (4), 967–975. <https://doi.org/10.1189/jlb.0704422>.
- (182) Steven, R.; Crilly, A.; Lockhart, J. C.; Ferrell, W. R.; McInnes, I. B. Proteinase-Activated Receptor-2 Modulates Human Macrophage Differentiation and Effector Function. *Innate Immun.* **2013**, 19 (6), 663–672. <https://doi.org/10.1177/1753425913479984>.
- (183) Kawagoe, J.; Takizawa, T.; Matsumoto, J.; Tamiya, M.; Meek, S. E.; Smith, A. J. H.; Hunter, G. D.; Plevin, R.; Saito, N.; Kanke, T.; Fujii, M.; Wada, Y. Effect of Protease-Activated Receptor-2 Deficiency on Allergic Dermatitis in the Mouse Ear. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, 88 (1), 77–84. <https://doi.org/10.1254/jjp.88.77>.
- (184) Vergnolle, N. Proteinase-Activated Receptor-2-Activating Peptides Induce Leukocyte Rolling, Adhesion, and Extravasation in Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1999**, 163 (9), 5064–5069.
- (185) McCulloch, K.; McGrath, S.; Huesa, C.; Dunning, L.; Litherland, G.; Crilly, A.; Hultin, L.; Ferrell, W. R.; Lockhart, J. C.; Goodyear, C. S. Rheumatic Disease: Protease-Activated Receptor-2 in Synovial Joint Pathobiology. *Front. Endocrinol.* **2018**, 9, 257. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00257>.
- (186) Nhu, Q. M.; Shirey, K. A.; Pennini, M. E.; Stiltz, J.; Vogel, S. N. Proteinase-Activated Receptor 2 Activation Promotes an Anti-Inflammatory and Alternatively

- Activated Phenotype in LPS-Stimulated Murine Macrophages. *Innate Immun.* **2012**, *18* (2), 193–203. <https://doi.org/10.1177/1753425910395044>.
- (187) Fiorucci, S.; Mencarelli, A.; Palazzetti, B.; Distrutti, E.; Vergnolle, N.; Hollenberg, M. D.; Wallace, J. L.; Morelli, A.; Cirino, G. Proteinase-Activated Receptor 2 Is an Anti-Inflammatory Signal for Colonic Lamina Propria Lymphocytes in a Mouse Model of Colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (24), 13936–13941. <https://doi.org/10.1073/pnas.241377298>.
- (188) Zuo, P.; Zuo, Z.; Wang, X.; Chen, L.; Zheng, Y.; Ma, G.; Zhou, Q. Factor Xa Induces Pro-Inflammatory Cytokine Expression in RAW 264.7 Macrophages via Protease-Activated Receptor-2 Activation.
- (189) Chen, L.; Gao, B.; Zhang, Y.; Lu, H.; Li, X.; Pan, L.; Yin, L.; Zhi, X. PAR2 Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation via FOXO1 Pathway. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120* (6), 9799–9809. <https://doi.org/10.1002/jcb.28260>.
- (190) Rayees, S.; Joshi, J. C.; Joshi, B.; Vellingiri, V.; Banerjee, S.; Mehta, D. Protease-Activated Receptor 2 Promotes Clearance of Pseudomonas Aeruginosa Infection by Inducing cAMP-Rac1 Signaling in Alveolar Macrophages. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 874197. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.874197>.
- (191) Saffarzadeh, M.; Grunz, K.; Nguyen, T. S.; Lee, Y. K.; Kitano, M.; Danckwardt, S.; Rodrigues, C. D. S.; Weiler, H.; Reyda, S.; Ruf, W. Macrophage Protease-Activated Receptor 2 Regulates Fetal Liver Erythropoiesis in Mice. *Blood Adv.* **2020**, *4* (22), 5810–5824. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003299>.
- (192) Aristizábal, B.; González, Á. Innate Immune System. In *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]*; El Rosario University Press, 2013.
- (193) Mass, E.; Nimmerjahn, F.; Kierdorf, K.; Schlitzer, A. Tissue-Specific Macrophages: How They Develop and Choreograph Tissue Biology. *Nat. Rev. Immunol.* **2023**, *23* (9), 563–579. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>.
- (194) Haldar, M.; Murphy, K. M. Origin, Development, and Homeostasis of Tissue-Resident Macrophages. *Immunol. Rev.* **2014**, *262* (1), 25–35. <https://doi.org/10.1111/imr.12215>.
- (195) Gautier, E. L.; Shay, T.; Miller, J.; Greter, M.; Jakubzick, C.; Ivanov, S.; Helft, J.; Chow, A.; Elpek, K. G.; Gordonov, S.; Mazloom, A. R.; Ma'ayan, A.; Chua, W.-J.; Hansen, T. H.; Turley, S. J.; Merad, M.; Randolph, G. J.; Immunological Genome Consortium. Gene-Expression Profiles and Transcriptional Regulatory Pathways That Underlie the Identity and Diversity of Mouse Tissue Macrophages. *Nat. Immunol.* **2012**, *13* (11), 1118–1128. <https://doi.org/10.1038/ni.2419>.
- (196) Okabe, Y.; Medzhitov, R. Tissue Biology Perspective on Macrophages. *Nat. Immunol.* **2016**, *17* (1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/ni.3320>.

- (197) Gomez Perdiguero, E.; Klapproth, K.; Schulz, C.; Busch, K.; Azzoni, E.; Crozet, L.; Garner, H.; Trouillet, C.; de Bruijn, M. F.; Geissmann, F.; Rodewald, H.-R. Tissue-Resident Macrophages Originate from Yolk-Sac-Derived Erythro-Myeloid Progenitors. *Nature* **2015**, *518* (7540), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>.
- (198) Hoeffel, G.; Ginhoux, F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>.
- (199) Bruttger, J.; Karam, K.; Wörtge, S.; Regen, T.; Marini, F.; Hoppmann, N.; Klein, M.; Blank, T.; Yona, S.; Wolf, Y.; Mack, M.; Pinteaux, E.; Müller, W.; Zipp, F.; Binder, H.; Bopp, T.; Prinz, M.; Jung, S.; Waisman, A. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* **2015**, *43* (1), 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.012>.
- (200) Hashimoto, D.; Chow, A.; Noizat, C.; Teo, P.; Beasley, M. B.; Leboeuf, M.; Becker, C. D.; See, P.; Price, J.; Lucas, D.; Greter, M.; Mortha, A.; Boyer, S. W.; Forsberg, E. C.; Tanaka, M.; van Rooijen, N.; García-Sastre, A.; Stanley, E. R.; Ginhoux, F.; Frenette, P. S.; Merad, M. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* **2013**, *38* (4), 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.
- (201) Röszer, T. Understanding the Biology of Self-Renewing Macrophages. *Cells* **2018**, *7* (8), 103. <https://doi.org/10.3390/cells7080103>.
- (202) Sierro, F.; Evrard, M.; Rizzetto, S.; Melino, M.; Mitchell, A. J.; Florido, M.; Beattie, L.; Walters, S. B.; Tay, S. S.; Lu, B.; Holz, L. E.; Roediger, B.; Wong, Y. C.; Warren, A.; Ritchie, W.; McGuffog, C.; Weninger, W.; Le Couteur, D. G.; Ginhoux, F.; Britton, W. J.; Heath, W. R.; Saunders, B. M.; McCaughan, G. W.; Luciani, F.; MacDonald, K. P. A.; Ng, L. G.; Bowen, D. G.; Bertolino, P. A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity* **2017**, *47* (2), 374–388.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.018>.
- (203) Blériot, C.; Ginhoux, F. Understanding the Heterogeneity of Resident Liver Macrophages. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2694. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02694>.
- (204) Bonnardel, J.; T’Jonck, W.; Gaublomme, D.; Browaeys, R.; Scott, C. L.; Martens, L.; Vanneste, B.; De Prijck, S.; Nedospasov, S. A.; Kremer, A.; Van Hamme, E.; Borghgraef, P.; Toussaint, W.; De Bleser, P.; Mannaerts, I.; Beschin, A.; van Grunsven, L. A.; Lambrecht, B. N.; Taghon, T.; Lippens, S.; Elewaut, D.; Saeys, Y.; Williams, M. Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* **2019**, *51* (4), 638–654.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.017>.

- (205) Scott, C. L.; Zheng, F.; De Baetselier, P.; Martens, L.; Saeys, Y.; De Prijck, S.; Lippens, S.; Abels, C.; Schoonoghe, S.; Raes, G.; Devoogdt, N.; Lambrecht, B. N.; Beschin, A.; Guilliams, M. Bone Marrow-Derived Monocytes Give Rise to Self-Renewing and Fully Differentiated Kupffer Cells. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10321. <https://doi.org/10.1038/ncomms10321>.
- (206) Park, M. D.; Silvin, A.; Ginhoux, F.; Merad, M. Macrophages in Health and Disease. *Cell* **2022**, *185* (23), 4259–4279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.007>.
- (207) Ginhoux, F.; Mildner, A.; Gautier, E. L.; Schlitzer, A.; Jakubzick, C.; Varol, C.; Bain, C.; Guermonprez, P. Editorial: Monocyte Heterogeneity and Function. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 626725. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.626725>.
- (208) Serbina, N. V.; Jia, T.; Hohl, T. M.; Pamer, E. G. Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, *26*, 421–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>.
- (209) Geissmann, F.; Jung, S.; Littman, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **2003**, *19* (1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00174-2).
- (210) Villani, A.-C.; Satija, R.; Reynolds, G.; Sarkizova, S.; Shekhar, K.; Fletcher, J.; Griesbeck, M.; Butler, A.; Zheng, S.; Lazo, S.; Jardine, L.; Dixon, D.; Stephenson, E.; Nilsson, E.; Grundberg, I.; McDonald, D.; Filby, A.; Li, W.; De Jager, P. L.; Rozenblatt-Rosen, O.; Lane, A. A.; Haniffa, M.; Regev, A.; Hacohen, N. Single-Cell RNA-Seq Reveals New Types of Human Blood Dendritic Cells, Monocytes and Progenitors. *Science* **2017**, *356* (6335), eaah4573. <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>.
- (211) Cros, J.; Cagnard, N.; Woollard, K.; Patey, N.; Zhang, S.-Y.; Senechal, B.; Puel, A.; Biswas, S. K.; Moshous, D.; Picard, C.; Jais, J.-P.; D’Cruz, D.; Casanova, J.-L.; Trouillet, C.; Geissmann, F. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **2010**, *33* (3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>.
- (212) Patel, A. A.; Zhang, Y.; Fullerton, J. N.; Boelen, L.; Rongvaux, A.; Maini, A. A.; Bigley, V.; Flavell, R. A.; Gilroy, D. W.; Asquith, B.; Macallan, D.; Yona, S. The Fate and Lifespan of Human Monocyte Subsets in Steady State and Systemic Inflammation. *J. Exp. Med.* **2017**, *214* (7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>.
- (213) Cecchini, M. G.; Dominguez, M. G.; Mocci, S.; Wetterwald, A.; Felix, R.; Fleisch, H.; Chisholm, O.; Hofstetter, W.; Pollard, J. W.; Stanley, E. R. Role of Colony Stimulating Factor-1 in the Establishment and Regulation of Tissue Macrophages during Postnatal Development of the Mouse. *Dev. Camb. Engl.* **1994**, *120* (6), 1357–1372. <https://doi.org/10.1242/dev.120.6.1357>.
- (214) Dai, X.-M.; Ryan, G. R.; Hapel, A. J.; Dominguez, M. G.; Russell, R. G.; Kapp, S.; Sylvestre, V.; Stanley, E. R. Targeted Disruption of the Mouse Colony-

- Stimulating Factor 1 Receptor Gene Results in Osteopetrosis, Mononuclear Phagocyte Deficiency, Increased Primitive Progenitor Cell Frequencies, and Reproductive Defects. *Blood* **2002**, 99 (1), 111–120. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.111>.
- (215) Robbins, C. S.; Chudnovskiy, A.; Rauch, P. J.; Figueiredo, J.-L.; Iwamoto, Y.; Gorbатов, R.; Etzrodt, M.; Weber, G. F.; Ueno, T.; van Rooijen, N.; Mulligan-Kehoe, M. J.; Libby, P.; Nahrendorf, M.; Pittet, M. J.; Weissleder, R.; Swirski, F. K. Extramedullary Hematopoiesis Generates Ly-6C(High) Monocytes That Infiltrate Atherosclerotic Lesions. *Circulation* **2012**, 125 (2), 364–374. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986>.
- (216) Yona, S.; Kim, K.-W.; Wolf, Y.; Mildner, A.; Varol, D.; Breker, M.; Strauss-Ayali, D.; Viukov, S.; Guillemins, M.; Misharin, A.; Hume, D. A.; Perlman, H.; Malissen, B.; Zelzer, E.; Jung, S. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **2013**, 38 (1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>.
- (217) Auffray, C.; Fogg, D.; Garfa, M.; Elain, G.; Join-Lambert, O.; Kayal, S.; Sarnacki, S.; Cumano, A.; Lauvau, G.; Geissmann, F. Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* **2007**, 317 (5838), 666–670. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>.
- (218) Trzebanski, S.; Kim, J.-S.; Larossi, N.; Kancheva, D.; Bastos, J.; Haddad, M.; Aizik, D.; Kralova, J.; Gross-Vered, M.; Halfon, S. B.; Lapidot, T.; Alon, R.; Movahedi, K.; Jung, S. Murine Classical Monocyte Subsets Display Distinct Functions and Fates. *bioRxiv* July 31, 2023, p 2023.07.29.551083. <https://doi.org/10.1101/2023.07.29.551083>.
- (219) Soehnlein, O.; Steffens, S.; Hidalgo, A.; Weber, C. Neutrophils as Protagonists and Targets in Chronic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, 17 (4), 248–261. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>.
- (220) Yang, P.; Li, Y.; Xie, Y.; Liu, Y. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *J. Immunol. Res.* **2019**, 2019, 8016254. <https://doi.org/10.1155/2019/8016254>.
- (221) Malarkey, D. E.; Johnson, K.; Ryan, L.; Boorman, G.; Maronpot, R. R. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicol. Pathol.* **2005**, 33 (1), 27–34. <https://doi.org/10.1080/01926230590881826>.
- (222) Yang, L.; Meng, Y.; Shi, Y.; Fang, H.; Zhang, L. Maternal Hepatic Immunology during Pregnancy. *Front. Immunol.* **2023**, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1220323>.
- (223) Wisse, E. An Electron Microscopic Study of the Fenestrated Endothelial Lining of Rat Liver Sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* **1970**, 31 (1), 125–150. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(70\)90150-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(70)90150-4).

- (224) Shetty, S.; Lalor, P. F.; Adams, D. H. Liver Sinusoidal Endothelial Cells - Gatekeepers of Hepatic Immunity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15* (9), 555–567. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y>.
- (225) Geerts, A. History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Semin. Liver Dis.* **2001**, *21* (3), 311–335. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17550>.
- (226) Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* **2008**, *134* (6), 1655–1669. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>.
- (227) Tsuchida, T.; Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14* (7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>.
- (228) van Furth, R.; Cohn, Z. A.; Hirsch, J. G.; Humphrey, J. H.; Spector, W. G.; Langevoort, H. L. The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and Their Precursor Cells. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *46* (6), 845–852.
- (229) Gao, B.; Jeong, W.-I.; Tian, Z. Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity. *Hepatol. Baltim. Md* **2008**, *47* (2), 729–736. <https://doi.org/10.1002/hep.22034>.
- (230) Sheng, J.; Ruedl, C.; Karjalainen, K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* **2015**, *43* (2), 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.016>.
- (231) Schulz, C.; Gomez Perdiguero, E.; Chorro, L.; Szabo-Rogers, H.; Cagnard, N.; Kierdorf, K.; Prinz, M.; Wu, B.; Jacobsen, S. E. W.; Pollard, J. W.; Frampton, J.; Liu, K. J.; Geissmann, F. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* **2012**, *336* (6077), 86–90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>.
- (232) Mass, E.; Ballesteros, I.; Farlik, M.; Halbritter, F.; Günther, P.; Crozet, L.; Jacome-Galarza, C. E.; Händler, K.; Klughammer, J.; Kobayashi, Y.; Gomez-Perdiguero, E.; Schultze, J. L.; Beyer, M.; Bock, C.; Geissmann, F. Specification of Tissue-Resident Macrophages during Organogenesis. *Science* **2016**, *353* (6304), aaf4238. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4238>.
- (233) Scott, C. L.; T’Jonck, W.; Martens, L.; Todorov, H.; Sichien, D.; Soen, B.; Bonnardel, J.; De Prijck, S.; Vandamme, N.; Cannoodt, R.; Saelens, W.; Vanneste, B.; Toussaint, W.; De Bleser, P.; Takahashi, N.; Vandenabeele, P.; Henri, S.; Pridans, C.; Hume, D. A.; Lambrecht, B. N.; De Baetselier, P.; Milling, S. W. F.; Van Ginderachter, J. A.; Malissen, B.; Berx, G.; Beschinn, A.; Saeys, Y.; Guilliams, M. The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* **2018**, *49* (2), 312–325.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.004>.

- (234) Lavin, Y.; Winter, D.; Blecher-Gonen, R.; David, E.; Keren-Shaul, H.; Merad, M.; Jung, S.; Amit, I. Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* **2014**, *159* (6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>.
- (235) Remmerie, A.; Martens, L.; Scott, C. L. Macrophage Subsets in Obesity, Aligning the Liver and Adipose Tissue. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 259. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00259>.
- (236) Tran, S.; Baba, I.; Poupel, L.; Dussaud, S.; Moreau, M.; G lineau, A.; Marcelin, G.; Magr eau-Davy, E.; Ouhachi, M.; Lesnik, P.; Boissonnas, A.; Le Goff, W.; Clausen, B. E.; Yvan-Charvet, L.; Sennlaub, F.; Huby, T.; Gautier, E. L. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* **2020**, *53* (3), 627-640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>.
- (237) Delaby, C.; Pilard, N.; Hetet, G.; Driss, F.; Grandchamp, B.; Beaumont, C.; Canonne-Hergaux, F. A Physiological Model to Study Iron Recycling in Macrophages. *Exp. Cell Res.* **2005**, *310* (1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.002>.
- (238) Lee, S.-J.; Park, S.-Y.; Jung, M.-Y.; Bae, S. M.; Kim, I.-S. Mechanism for Phosphatidylserine-Dependent Erythrophagocytosis in Mouse Liver. *Blood* **2011**, *117* (19), 5215–5223. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-313239>.
- (239) Pfefferl , M.; Ingoglia, G.; Schaer, C. A.; Yalamanoglu, A.; Buzzi, R.; Dubach, I. L.; Tan, G.; L pez-Cano, E. Y.; Schulthess, N.; Hansen, K.; Humar, R.; Schaer, D. J.; Vallelian, F. Hemolysis Transforms Liver Macrophages into Antiinflammatory Erythrophagocytes. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130* (10), 5576–5590. <https://doi.org/10.1172/JCI137282>.
- (240) Dixon, S. J.; Lemberg, K. M.; Lamprecht, M. R.; Skouta, R.; Zaitsev, E. M.; Gleason, C. E.; Patel, D. N.; Bauer, A. J.; Cantley, A. M.; Yang, W. S.; Morrison, B.; Stockwell, B. R. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **2012**, *149* (5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.
- (241) Bl riot, C.; Dupuis, T.; Jouvion, G.; Eberl, G.; Disson, O.; Lecuit, M. Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* **2015**, *42* (1), 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.020>.
- (242) Theurl, M.; Theurl, I.; Hochegger, K.; Obrist, P.; Subramaniam, N.; van Rooijen, N.; Schuemann, K.; Weiss, G. Kupffer Cells Modulate Iron Homeostasis in Mice via Regulation of Hcpidin Expression. *J. Mol. Med.* **2008**, *86* (7), 825–835. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0346-y>.
- (243) Guilliams, M.; Scott, C. L. Liver Macrophages in Health and Disease. *Immunity* **2022**, *55* (9), 1515–1529. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.002>.

- (244) Carlin, L. M.; Stamatiades, E. G.; Auffray, C.; Hanna, R. N.; Glover, L.; Vizcay-Barrena, G.; Hedrick, C. C.; Cook, H. T.; Diebold, S.; Geissmann, F. Nr4a1-Dependent Ly6C(Low) Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* **2013**, *153* (2), 362–375. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.010>.
- (245) Jakubzick, C. V.; Randolph, G. J.; Henson, P. M. Monocyte Differentiation and Antigen-Presenting Functions. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17* (6), 349–362. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>.
- (246) Kohyama, M.; Ise, W.; Edelson, B. T.; Wilker, P. R.; Hildner, K.; Mejia, C.; Frazier, W. A.; Murphy, T. L.; Murphy, K. M. Role for Spi-C in the Development of Red Pulp Macrophages and Splenic Iron Homeostasis. *Nature* **2009**, *457* (7227), 318–321. <https://doi.org/10.1038/nature07472>.
- (247) Nakayama, Y.; Masuda, Y.; Mukae, T.; Mikami, T.; Shimizu, R.; Kondo, N.; Kitagawa, H.; Itoh, N.; Konishi, M. A Secretory Protein Neudesin Regulates Splenic Red Pulp Macrophages in Erythrophagocytosis and Iron Recycling. *Commun. Biol.* **2024**, *7* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05802-9>.
- (248) An, X.; Mohandas, N. Erythroblastic Islands, Terminal Erythroid Differentiation and Reticulocyte Maturation. *Int. J. Hematol.* **2011**, *93* (2), 139–143. <https://doi.org/10.1007/s12185-011-0779-x>.
- (249) Chow, A.; Lucas, D.; Hidalgo, A.; Méndez-Ferrer, S.; Hashimoto, D.; Scheiermann, C.; Battista, M.; Leboeuf, M.; Prophete, C.; van Rooijen, N.; Tanaka, M.; Merad, M.; Frenette, P. S. Bone Marrow CD169+ Macrophages Promote the Retention of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in the Mesenchymal Stem Cell Niche. *J. Exp. Med.* **2011**, *208* (2), 261–271. <https://doi.org/10.1084/jem.20101688>.
- (250) Spring, F. A.; Parsons, S. F.; Ortlepp, S.; Olsson, M. L.; Sessions, R.; Brady, R. L.; Anstee, D. J. Intercellular Adhesion Molecule-4 Binds A4 β 1 and α V-Family Integrins through Novel Integrin-Binding Mechanisms. *Blood* **2001**, *98* (2), 458–466. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.2.458>.
- (251) Lee, G.; Lo, A.; Short, S. A.; Mankelov, T. J.; Spring, F.; Parsons, S. F.; Yazdanbakhsh, K.; Mohandas, N.; Anstee, D. J.; Chasis, J. A. Targeted Gene Deletion Demonstrates That the Cell Adhesion Molecule ICAM-4 Is Critical for Erythroblastic Island Formation. *Blood* **2006**, *108* (6), 2064–2071. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006759>.
- (252) Sadahira, Y.; Yoshino, T.; Monobe, Y. Very Late Activation Antigen 4-Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Interaction Is Involved in the Formation of Erythroblastic Islands. *J. Exp. Med.* **1995**, *181* (1), 411–415. <https://doi.org/10.1084/jem.181.1.411>.
- (253) Zermati, Y.; Fichelson, S.; Valensi, F.; Freyssinier, J. M.; Rouyer-Fessard, P.; Cramer, E.; Guichard, J.; Varet, B.; Hermine, O. Transforming Growth Factor Inhibits Erythropoiesis by Blocking Proliferation and Accelerating Differentiation

- of Erythroid Progenitors. *Exp. Hematol.* **2000**, 28 (8), 885–894. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(00\)00488-4](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(00)00488-4).
- (254) Migliaccio, A. R. Erythroblast Enucleation. *Haematologica* **2010**, 95 (12), 1985–1988. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.033225>.
- (255) Liu, X.-B.; Nguyen, N.-B. H.; Marquess, K. D.; Yang, F.; Haile, D. J. Regulation of Hepcidin and Ferroportin Expression by Lipopolysaccharide in Splenic Macrophages. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2005**, 35 (1), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.bcnd.2005.04.006>.
- (256) Deschemin, J.-C.; Mathieu, J. R. R.; Zumerle, S.; Peyssonnaud, C.; Vaulont, S. Pulmonary Iron Homeostasis in Hepcidin Knockout Mice. *Front. Physiol.* **2017**, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00804>.
- (257) Nguyen, N.-B.; Callaghan, K. D.; Ghio, A. J.; Haile, D. J.; Yang, F. Hepcidin Expression and Iron Transport in Alveolar Macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, 291 (3), L417-425. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00484.2005>.
- (258) Sow, F. B.; Florence, W. C.; Satoskar, A. R.; Schlesinger, L. S.; Zwilling, B. S.; Lafuse, W. P. Expression and Localization of Hepcidin in Macrophages: A Role in Host Defense against Tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, 82 (4), 934–945. <https://doi.org/10.1189/jlb.0407216>.
- (259) Wang, Q.; Du, F.; Qian, Z.-M.; Ge, X. H.; Zhu, L.; Yung, W. H.; Yang, L.; Ke, Y. Lipopolysaccharide Induces a Significant Increase in Expression of Iron Regulatory Hormone Hepcidin in the Cortex and Substantia Nigra in Rat Brain. *Endocrinology* **2008**, 149 (8), 3920–3925. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1626>.
- (260) Enns, C. A.; Weiskopf, T.; Zhang, R. H.; Wu, J.; Jue, S.; Kawaguchi, M.; Kataoka, H.; Zhang, A.-S. Matriptase-2 Regulates Iron Homeostasis Primarily by Setting the Basal Levels of Hepatic Hepcidin Expression through a Nonproteolytic Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2023**, 299 (10), 105238. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105238>.
- (261) Ganz, T. The Role of Hepcidin in Iron Sequestration during Infections and in the Pathogenesis of Anemia of Chronic Disease. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* **2002**, 4 (11), 1043–1045.
- (262) van den Hengel, L. G.; Hellingman, A. A.; Nossent, A. Y.; van Oeveren-Rietdijk, A. M.; de Vries, M. R.; Spek, C. A.; van Zonneveld, A. J.; Reitsma, P. H.; Hamming, J. F.; de Boer, H. C.; Versteeg, H. H.; Quax, P. H. A. Protease-Activated Receptor (PAR)2, but Not PAR1, Is Involved in Collateral Formation and Anti-Inflammatory Monocyte Polarization in a Mouse Hind Limb Ischemia Model. *PLoS One* **2013**, 8 (4), e61923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061923>.
- (263) Barra, A.; Brasil, A. F.; Ferreira, T. L.; Fernandes-Braga, W.; Marconato, D. G.; Faria-Pinto, P.; Alvarez-Leite, J. I.; Dos Santos Aggum Capettini, L.; Klein, A.

- Protease-Activated Receptor 2 Enhances Innate and Inflammatory Mechanisms Induced by Lipopolysaccharide in Macrophages from C57BL/6 Mice. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **2022**, *71* (4), 439–448. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01551-9>.
- (264) Folgueras, A. R.; de Lara, F. M.; Pendás, A. M.; Garabaya, C.; Rodríguez, F.; Astudillo, A.; Bernal, T.; Cabanillas, R.; López-Otín, C.; Velasco, G. Membrane-Bound Serine Protease Matriptase-2 (Tmprss6) Is an Essential Regulator of Iron Homeostasis. *Blood* **2008**, *112* (6), 2539–2545. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-149773>.
- (265) Szabo, R.; Peters, D. E.; Kosa, P.; Camerer, E.; Bugge, T. H. Regulation of Feto-Maternal Barrier by Matriptase- and PAR-2-Mediated Signaling Is Required for Placental Morphogenesis and Mouse Embryonic Survival. *PLoS Genet.* **2014**, *10* (7), e1004470. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004470>.
- (266) Dong, X.; Liu, J.; Xu, Y.; Cao, H. Role of Macrophages in Experimental Liver Injury and Repair in Mice. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *17* (5), 3835–3847. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7450>.
- (267) Bilzer, M.; Roggel, F.; Gerbes, A. L. Role of Kupffer Cells in Host Defense and Liver Disease. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **2006**, *26* (10), 1175–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x>.
- (268) Liang, H. P. H.; Kerschen, E. J.; Hernandez, I.; Basu, S.; Zogg, M.; Botros, F.; Jia, S.; Hessner, M. J.; Griffin, J. H.; Ruf, W.; Weiler, H. EPCR-Dependent PAR2 Activation by the Blood Coagulation Initiation Complex Regulates LPS-Triggered Interferon Responses in Mice. *Blood* **2015**, *125* (18), 2845–2854. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-610717>.
- (269) Tamary, H.; Shalev, H.; Perez-Avraham, G.; Zoldan, M.; Levi, I.; Swinkels, D. W.; Tanno, T.; Miller, J. L. Elevated Growth Differentiation Factor 15 Expression in Patients with Congenital Dyserythropoietic Anemia Type I. *Blood* **2008**, *112* (13), 5241–5244. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-165738>.
- (270) Cazzola, M. Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383* (14), 1358–1374. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1904794>.
- (271) Arezes, J.; Foy, N.; McHugh, K.; Quinkert, D.; Benard, S.; Sawant, A.; Frost, J. N.; Armitage, A. E.; Pasricha, S.-R.; Lim, P. J.; Tam, M. S.; Lavallie, E.; Pittman, D. D.; Cunningham, O.; Lambert, M.; Murphy, J. E.; Draper, S. J.; Jasuja, R.; Drakesmith, H. Antibodies against the Erythroferrone N-Terminal Domain Prevent Hecidin Suppression and Ameliorate Murine Thalassemia. *Blood* **2020**, *135* (8), 547–557. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003140>.
- (272) Wang, H.; Yi, T.; Zheng, Y.; He, S. Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Release from A549 Cells by Agonists of Protease-Activated Receptor-1 and -2. *Eur. J. Cell Biol.* **2007**, *86* (4), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.12.003>.

- (273) Filliol, A.; Saito, Y.; Nair, A.; Dapito, D. H.; Yu, L.-X.; Ravichandra, A.; Bhattacharjee, S.; Affo, S.; Fujiwara, N.; Su, H.; Sun, Q.; Savage, T. M.; Wilson-Kanamori, J. R.; Caviglia, J. M.; Chin, L.; Chen, D.; Wang, X.; Caruso, S.; Kang, J. K.; Amin, A. D.; Wallace, S.; Dobie, R.; Yin, D.; Rodriguez-Fiallos, O. M.; Yin, C.; Mehal, A.; Izar, B.; Friedman, R. A.; Wells, R. G.; Pajvani, U. B.; Hoshida, Y.; Remotti, H. E.; Arpaia, N.; Zucman-Rossi, J.; Karin, M.; Henderson, N. C.; Tabas, I.; Schwabe, R. F. Opposing Roles of Hepatic Stellate Cell Subpopulations in Hepatocarcinogenesis. *Nature* **2022**, *610* (7931), 356–365. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05289-6>.
- (274) Xie, L.; Wang, X.; Ma, Y.; Ma, H.; Shen, J.; Chen, J.; Wang, Y.; Su, S.; Chen, K.; Xu, L.; Xie, Y.; Xiang, M. Piezo1 (Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1)-Mediated Mechanosensation in Macrophages Impairs Perfusion Recovery After Hindlimb Ischemia in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2023**, *43* (4), 504–518. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318625>.
- (275) Ma, S.; Dubin, A. E.; Zhang, Y.; Mousavi, S. A. R.; Wang, Y.; Coombs, A.; Loud, M.; Andolfo, I.; Patapoutian, A. A Role of PIEZO1 in Iron Metabolism in Mice and Humans. *Cell* **2021**, *184* (4), 969-982.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.024>.
- (276) Rayees, S.; Rochford, I.; Joshi, J. C.; Joshi, B.; Banerjee, S.; Mehta, D. Macrophage TLR4 and PAR2 Signaling: Role in Regulating Vascular Inflammatory Injury and Repair. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2091. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02091>.
- (277) Mao, Y.; Finnemann, S. C. Essential Diurnal Rac1 Activation during Retinal Phagocytosis Requires Av β 5 Integrin but Not Tyrosine Kinases Focal Adhesion Kinase or Mer Tyrosine Kinase. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23* (6), 1104–1114. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0840>.
- (278) Camerer, E.; Barker, A.; Duong, D. N.; Ganesan, R.; Kataoka, H.; Cornelissen, I.; Darragh, M. R.; Hussain, A.; Zheng, Y.-W.; Srinivasan, Y.; Brown, C.; Xu, S.-M.; Regard, J. B.; Lin, C.-Y.; Craik, C. S.; Kirchhofer, D.; Coughlin, S. R. Local Protease Signaling Contributes to Neural Tube Closure in the Mouse Embryo. *Dev. Cell* **2010**, *18* (1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.014>.
- (279) Shan, Z.; Ju, C. Hepatic Macrophages in Liver Injury. *Front. Immunol.* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00322>.
- (280) Sonnweber, T.; Nachbaur, D.; Schroll, A.; Nairz, M.; Seifert, M.; Demetz, E.; Haschka, D.; Mitterstiller, A.-M.; Kleinsasser, A.; Burtscher, M.; Trübsbach, S.; Murphy, A. T.; Wroblewski, V.; Witcher, D. R.; Mleczko-Sanecka, K.; Vecchi, C.; Muckenthaler, M. U.; Pietrangelo, A.; Theurl, I.; Weiss, G. Hypoxia Induced Downregulation of Hepcidin Is Mediated by Platelet Derived Growth Factor BB. *Gut* **2014**, *63* (12), 1951–1959. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305317>.
- (281) Goodnough, J. B.; Ramos, E.; Nemeth, E.; Ganz, T. Inhibition of Hepcidin Transcription by Growth Factors. *Hepatol. Baltim. Md* **2012**, *56* (1), 291–299. <https://doi.org/10.1002/hep.25615>.

- (282) Talati, M.; West, J.; Zaynagetdinov, R.; Hong, C. C.; Han, W.; Blackwell, T.; Robinson, L.; Blackwell, T. S.; Lane, K. BMP Pathway Regulation of and by Macrophages. *PLOS ONE* **2014**, *9* (4), e94119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094119>.
- (283) Ramsay, A. J.; Hooper, J. D.; Folgueras, A. R.; Velasco, G.; López-Otín, C. Matriptase-2 (TMPRSS6): A Proteolytic Regulator of Iron Homeostasis. *Haematologica* **2009**, *94* (6), 840–849. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.001867>.
- (284) Rausa, M.; Pagani, A.; Nai, A.; Campanella, A.; Gilberti, M. E.; Apostoli, P.; Camaschella, C.; Silvestri, L. Bmp6 Expression in Murine Liver Non Parenchymal Cells: A Mechanism to Control Their High Iron Exporter Activity and Protect Hepatocytes from Iron Overload? *PLoS ONE* **2015**, *10* (4), e0122696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122696>.
- (285) Sugimoto, H.; LeBleu, V. S.; Bosukonda, D.; Keck, P.; Taduri, G.; Bechtel, W.; Okada, H.; Carlson, W.; Bey, P.; Rusckowski, M.; Tampe, B.; Tampe, D.; Kanasaki, K.; Zeisberg, M.; Kalluri, R. Activin-like Kinase 3 Is Important for Kidney Regeneration and Reversal of Fibrosis. *Nat. Med.* **2012**, *18* (3), 396–404. <https://doi.org/10.1038/nm.2629>.
- (286) Folgueras, A. R.; Freitas-Rodríguez, S.; Ramsay, A. J.; Garabaya, C.; Rodríguez, F.; Velasco, G.; López-Otín, C. Matriptase-2 Deficiency Protects from Obesity by Modulating Iron Homeostasis. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1350. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03853-1>.
- (287) Wen, X.; Zhang, B.; Wu, B.; Xiao, H.; Li, Z.; Li, R.; Xu, X.; Li, T. Signaling Pathways in Obesity: Mechanisms and Therapeutic Interventions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01149-x>.

Titre : Rôle de PAR2 et des macrophages dans la régulation de l'hepcidine

Mots clés : fer, hepcidine, PAR2, macrophages, anémie, matriptase-2

Résumé : Aujourd'hui, il est estimé qu'environ 60% du fer de l'organisme est complexé au sein de la molécule d'hémoglobine, illustrant le caractère essentiel de cet élément pour l'érythropoïèse. En cas de stress érythroïde (SE), une condition d'anémie qui requiert la production de nouveaux globules rouges, la demande en fer est augmentée. Pour augmenter la biodisponibilité de ce fer, l'expression de l'hepcidine, une hormone clé de la régulation de l'homéostasie martiale, est inhibée dans les hépatocytes. Cependant, bien que les mécanismes de réponse rapide (<24h) soient connus, ceux à plus long terme demeurent flous et suggèrent que d'autres acteurs cellulaires et protéiques pourraient exister.

Parmi ces acteurs se trouve le récepteur PAR2 (« protease-activated receptor 2 ») codé par le gène F2r1. Cette protéine a la particularité d'être activée par diverses protéases, établissant ainsi un lien entre l'environnement et la cellule dans laquelle elle est exprimée. Nos observations sur des embryons F2r1^{-/-} surexprimant l'hepcidine nous ont conduits à étudier PAR2 dans un contexte physiopathologique inédit. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse a été de caractériser le rôle de PAR2 dans la régulation de l'hepcidine. Nous révélons qu'en condition physiologique, PAR2 ne participe pas à cette régulation. En revanche, nous démontrons qu'en réponse à un SE (induit par deux phlébotomies successives) la délétion de PAR2 engendre un blocage partiel de l'inhibition de l'hepcidine. De plus, la délétion spécifique de PAR2 dans les macrophages (F2r1LysM) a récapitulé ce phénotype, démontrant que dans des conditions spécifiques de SE, PAR2 participe à la régulation de l'hepcidine depuis son expression dans les macrophages. De ce fait, nous avons exploré l'implication de ces macrophages dans la régulation de l'hepcidine. Basé sur un modèle de délétion des macrophages, nous montrons que l'élimination de ces cellules induit une surexpression de l'hepcidine et bloque également son inhibition en réponse à la phlébotomie, démontrant leur rôle majeur dans la régulation de l'hepcidine. De plus, s'appuyant sur des résultats préliminaires *in vitro*, nous proposons que les macrophages produisent un inhibiteur qui agit de façon paracrine sur les hépatocytes pour inhiber l'hepcidine.

Dans un projet secondaire, nous avons travaillé sur la caractérisation du rôle de la matriptase-2 (MT2) hépatocytaire dans la régulation de l'hepcidine. La MT2 est une protéase à sérine transmembranaire principalement exprimée dans le foie et codée par le gène Tmprss6. Celle-ci régule négativement l'expression de l'hepcidine. Chez l'Homme, des mutations de Tmprss6 causent une anémie ferriprive appelée IRIDA, le même phénotype est décrit dans des modèles murins de délétion de la MT2.

Dans ce contexte, nous avons évalué si la régulation négative de l'hepcidine par la MT2 est exclusivement contrôlée par sa localisation hépatocytaire. Pour cela, des souris spécifiquement mutées pour la MT2 dans les hépatocytes ont été développées. Nous montrons que ces souris Tmprss6Alb présentent une surexpression de Hamp1 et en conséquence une baisse des niveaux de fer sérique et hépatique, entraînant une anémie microcytaire. Nous démontrons alors que ce phénotype est à un degré similaire aux souris KO total, confirmant le rôle central de la MT2 hépatocytaire dans la régulation de l'homéostasie martiale.

En conclusion, cette thèse permet une meilleure compréhension des mécanismes de régulation négative de l'hepcidine lors des phases tardives de la réponse au SE, en révélant de façon inédite la contribution du récepteur PAR2 à ce mécanisme. Nous démontrons également le rôle majeur des macrophages, qui, au-delà de leur implication dans un contexte de SE, émettent aussi des signaux inhibiteurs de l'hepcidine hépatocytaire en conditions physiologiques. Enfin, nous confirmons que la régulation négative de l'hepcidine par la MT2 est entièrement contrôlée par sa localisation hépatocytaire.

Title: Role of PAR2 and macrophages in hepcidin regulation

Key words: iron, hepcidin, PAR2, macrophages, anemia, matriptase-2

Abstract: Today, it is estimated that about 60% of the body's iron is contained within the hemoglobin molecule, illustrating the essential role of this element in erythropoiesis. In the case of erythroid stress (ES), a condition of anemia that requires the production of new red blood cells, the demand for iron increases. To increase the bioavailability of this iron, the expression of hepcidin, a key hormone in the regulation of iron homeostasis, is inhibited in hepatocytes. However, while the mechanisms of early response to anemia (within 24 hours) are known, those over the longer term remain unclear and suggest the involvement of other cellular and protein actors.

Among these actors is the protease-activated receptor 2 (PAR2), encoded by the F2r1 gene. This protein is activated by various proteases, establishing a link between the environment and the cell in which it is expressed. Our observations on F2r1^{-/-} embryos overexpressing hepcidin led us to study PAR2 in an unprecedented pathophysiological context. Thus, the main objective of this thesis was to characterize the role of PAR2 in the regulation of hepcidin. We reveal that, under physiological conditions, PAR2 does not participate in this regulation. However, we demonstrate that in response to ES (induced by two successive phlebotomies), the deletion of PAR2 results in a partial blockage of hepcidin inhibition. Furthermore, the specific deletion of PAR2 in macrophages (F2r1LysM) recapitulated this phenotype, showing that under specific ES conditions, PAR2 participates in the regulation of hepcidin from its expression in macrophages. Consequently, we explored the involvement of these macrophages in the regulation of hepcidin. Based on a macrophage deletion model, we show that the elimination of these cells induces overexpression of hepcidin and also blocks its inhibition in response to phlebotomy, demonstrating their major role in the regulation of hepcidin. Moreover, based on preliminary *in vitro* results, we propose that macrophages produce an inhibitor that acts paracrinally on hepatocytes to inhibit hepcidin.

In a secondary project, we worked on characterizing the role of hepatocytic matriptase-2 (MT2) in the regulation of hepcidin. MT2 is a transmembrane serine protease mainly expressed in the liver and encoded by the Tmprss6 gene. It negatively regulates the expression of hepcidin. In humans, Tmprss6 mutations cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA), with the same phenotype described in murine models of MT2 deletion.

In this context, we evaluated whether the negative regulation of hepcidin by MT2 is exclusively controlled by its hepatocytic localization. For this, mice specifically mutated for MT2 in hepatocytes were developed. We show that these Tmprss6Alb mice present an overexpression of Hamp1 and consequently a decrease in serum and hepatic iron levels, leading to microcytic anemia. We demonstrate that this phenotype is similar to that of total KO mice, confirming the central role of hepatocytic MT2 in the regulation of iron homeostasis.

In conclusion, this thesis provides a better understanding of the mechanisms of negative regulation of hepcidin during the late phases of the response to ES, revealing for the first time the contribution of the PAR2 receptor to this mechanism. We also demonstrate the major role of macrophages, which, beyond their involvement in an ES context, also emit inhibitory signals for hepatocytic hepcidin under physiological conditions. Finally, we confirm that the negative regulation of hepcidin by MT2 is entirely controlled by its hepatocytic localization.