

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE / FRANCHE-COMTÉ

UFR Sciences de Santé

Année 2015

Thèse n°

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Spécialité : Médecine / Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires

Présentée et soutenue publiquement le 23 décembre 2015

Par Aurélie GUDJONCIK

Née le 01 janvier 1983 à Saint-Vallier (71)

MARQUEURS DU METABOLISME DU FER ET DERIVES DE LA L-ARGININE DANS LA CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE :

***Mise en évidence, intérêt de leur évaluation et rôle du stress
oxydant en phase aiguë d'infarctus du myocarde***

Thèse dirigée par le Professeur Luc ROCHETTE

Et co-encadrée par les Professeurs Yves COTTIN et Marianne ZELLER

Composition du jury

Mr le Professeur Yves COTTIN , Université de Bourgogne	Co-encadrant
Mr le Professeur Gérard FINET , Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Mr le Professeur Christophe RIBUOT , Université de Grenoble	Rapporteur
Mr le Professeur Gilles RIOUFOL , Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mr le Professeur Luc ROCHETTE , Université de Bourgogne	Directeur
Mme le Professeur Marianne ZELLER , Université de Bourgogne	Co-encadrant

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE / FRANCHE-COMTÉ

UFR Sciences de Santé

Année 2015

Thèse n°

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Spécialité : Médecine / Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires

Présentée et soutenue publiquement le 23 décembre 2015

Par Aurélie GUDJONCIK

Née le 01 janvier 1983 à Saint-Vallier (71)

MARQUEURS DU METABOLISME DU FER ET DERIVES DE LA L-ARGININE DANS LA CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE :

Mise en évidence, intérêt de leur évaluation et rôle du stress oxydant en phase aiguë d'infarctus du myocarde

Thèse dirigée par le Professeur Luc ROCHETTE

Et co-encadrée par les Professeurs Yves COTTIN et Marianne ZELLER

Composition du jury

Mr le Professeur Yves COTTIN , Université de Bourgogne	Co-encadrant
Mr le Professeur Gérard FINET , Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Mr le Professeur Christophe RIBUOT , Université de Grenoble	Rapporteur
Mr le Professeur Gilles RIOUFOL , Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mr le Professeur Luc ROCHETTE , Université de Bourgogne	Directeur
Mme le Professeur Marianne ZELLER , Université de Bourgogne	Co-encadrant

Remerciements

L'ensemble de ces travaux a été réalisé au sein du Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-Métaboliques (LPPCM) (Centre de Recherche Inserm UMR866 « Lipides, Nutrition, Cancer -LNC ») sous la direction du Professeur Luc ROCHETTE et le co-encadrement des Professeurs Yves COTTIN et Marianne ZELLER.

A Monsieur le Professeur Luc ROCHETTE,

Encore tous mes remerciements pour m'avoir accueillie au LPPCM et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche expérimentale et ce, depuis mon Master 2. Pour nos nombreux échanges et réflexions qui ont permis de concrétiser ce travail de thèse. Et surtout pour m'avoir initiée à votre façon de voir les choses autrement, aussi bien dans les domaines médicaux et scientifiques, que culturels et humains.

A Monsieur le Professeur Yves COTTIN,

Pour avoir su me montrer dès le début l'importance de l'investissement au travail et tout l'épanouissement professionnel mais aussi personnel que l'on pouvait en tirer. Ton implication dans ma formation a été essentielle. Je te remercie pour tout le temps et l'énergie que tu y as consacrés.

A Madame le Professeur Marianne ZELLER,

Pour ton aide, ton investissement et ton soutien qui ont été primordiaux dans ce travail. Pour ta rigueur, ta disponibilité et ta compréhension au cours de chaque étape de ces années de thèse. Je te remercie pour toute l'énergie et le temps que tu m'as consacrés.

A Monsieur le Professeur Christophe RIBUOT,

Pour me faire l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail de thèse en tant que rapporteur. Je suis très honorée de votre investissement dans la lecture et l'examen de ce manuscrit. Je garde de très bons souvenirs de ma semaine de Master 2 à Grenoble. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Gilles RIOUFOL,

Pour me faire l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail de thèse en tant que rapporteur. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre équipe il y

a quelques années et de m'avoir initiée et formée au monde de la cardiologie interventionnelle. Pour votre patience, votre rigueur et votre bonne humeur en salle de cathétérisme. Et pour vos précieux conseils, que je me remémore encore pendant les procédures. Votre participation à mon jury de thèse est donc un très grand honneur. Encore merci à vous et à toute l'équipe lyonnaise.

A Monsieur le Professeur Gérard FINET,

Pour me faire l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail de thèse. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre équipe il y a quelques années et de m'avoir initiée et formée au monde de la cardiologie interventionnelle. Pour votre vision de la cardiologie, votre implication en salle de coronarographie et également pour vos précieux conseils, qui resteront gravés. Votre participation à mon jury de thèse est donc un très grand honneur. Encore merci à vous et à toute l'équipe lyonnaise.

Un immense remerciement à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail par leurs conseils, leur expérience, leurs connaissances et surtout leur soutien :

A l'ensemble des membres du LPPCM.

A tous les membres de l'équipe RICO.

A toute l'équipe du service de Cardiologie du CHU de Dijon.

A toute l'équipe du service de Réadaptation Cardiovasculaire et du Centre de Convalescence et de Rééducation du CHU de Dijon.

A ma famille et mes amis.

Sommaire

Introduction.....	1
Etude bibliographique	4
<i>I. Métabolisme du fer.....</i>	<i>5</i>
1. Introduction.....	5
2. Le fer dans l'organisme.....	6
2.1 Sources nutritionnelles de fer	8
2.2 Transport et stockage du fer	11
2.3 Absorption intestinale du fer.....	12
3. Régulation du fer	14
3.1 Rôle de la ferritine et du système de régulation intracellulaire du métabolisme du fer IRE/IRP	14
3.2 Rôle de la transferrine	16
3.3 Rôle de l'hepcidine	17
3.3.1 Taux d'hepcidine	19
3.3.2 Structure de l'hepcidine	20
3.3.3 Métabolisme de l'hepcidine.....	21
3.3.4 Sources d'hepcidine extrahépatique.....	22
a. Macrophages.....	22
b. Adipocytes.....	24
c. Myocarde	25
d. Estomac.....	28
3.3.5 Interaction hepcidine-ferroportine (FPT)	29
3.3.6 L'hepcidine, maître régulateur du métabolisme du fer	30
3.3.7 Régulation de l'expression d'hepcidine.....	32
3.4 Rôle de l'érythroferrone	34
4. Fer et stress oxydant	37
4.1 Les métaux de transition et le stress oxydant.....	37
4.2 Rôle des mitochondries dans le métabolisme du fer	38
<i>II. Stress oxydant et dysfonction endothéliale</i>	<i>40</i>
1. Introduction.....	40
2. Définition et sources biologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN)	41
2.1 Définition des ERO et ERN	41
2.2 Sources biologiques de radicaux libres	44
3. Dérivés méthylés de la L-arginine	48
3.1 Synthèse des dérivés méthylés de la L-arginine	48
3.2 Voies de dégradation des méthyl-arginines.....	49
3.3 Rôles des dérivés méthylés de la L-arginine	50
<i>III. Etiologie des pathologies cardiovasculaires</i>	<i>52</i>
1. Stress oxydant et dysfonction endothéliale	52
2. Fer et pathologies cardiovasculaires.....	53
2.1 Carence martiale et insuffisance cardiaque.....	54
2.2 Pathologies coronariennes et IDM	57

3. L'hepcidine, agent cytoprotecteur endogène dans la physiopathologie cardiovasculaire : cibles thérapeutiques possibles?	63
IV. Objectifs de l'étude	65
Matériel et Méthodes.....	105
I. Population étudiée.....	106
1. Recueil de données démographiques et cliniques	108
2. Recueil de données biologiques	108
II. Méthodes de dosage.....	109
1. Méthode de dosage des diméthyl-arginines.....	109
1.1 Méthode de CLHP couplée à une détection fluorimétrique	110
1.2 Composition de la chaîne CHLP et chromatogramme d'un sérum	110
1.3 Protocole de dosage	112
2. Méthode de dosage de L'HEPCIDINE	112
3. Méthode de dosage de la MYONECTINE.....	114
4. Méthodes de dosage des paramètres « traditionnels » du fer	115
4.1 Fer sérique.....	115
4.2 Transferrine	115
4.3 Capacité Totale de Fixation du fer (CTF)	116
4.4 Coefficient de Saturation de la Transferrine ou Sidérophilline (CST)	117
4.5 Ferritine sérique	117
Résultats.....	119
ETUDE EXPERIMENTALE I.....	120
Diméthylarginines, glycémie et CRP chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde	120
I. Objectifs de l'étude	120
II. Méthodes	121
III. Résultats obtenus.....	122
ETUDE EXPERIMENTALE II.....	152
Nouveaux biomarqueurs du métabolisme du fer, hepcidine et myonectine/CTRP 15, chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde	152
I. Objectifs de l'étude	152
II. Méthodes	153
III. Résultats obtenus.....	154
Discussion générale	193
Références bibliographiques	201
Annexes	226
I. Publications scientifiques.....	227
II. Communications orales.....	229
III. Communications affichées.....	230

Liste des figures

Figure 1 : Distribution du fer dans le corps humain d'un adulte.	7
Figure 2 : Contrôle de l'homéostasie du fer dans les entérocytes.	10
Figure 3 : Régulation du métabolisme du fer systémique et expression de l'hepcidine.	18
Figure 4 : Hpcidine : séquence d'acides aminés et structure.	21
Figure 5 : Histologie : Expression d'hepcidine dans le foie et le coeur.	27
Figure 6 : Axe moelle osseuse-foie du métabolisme du fer.	36
Figure 7 : Effets pléiotropes du monoxyde d'azote sur le système cardiovasculaire.	43
Figure 8 : Représentation schématique de la structure des NOS.....	46
Figure 9 : Représentation schématique du découplage des NOS.....	48
Figure 10 : Schéma de la synthèse et des fonctions des dérivés méthylés de la L-arginine, du monoxyde d'azote.	51
Figure 11 : Deux types de carence martiale dans l'insuffisance cardiaque : absolue et fonctionnelle.....	56
Figure 12 : Diagramme représentant les critères d'exclusion des patients.....	107
Figure 13 : Chromatogramme d'un sérum de patient issu du RICO.....	111
Figure 14 : Principe de l'« EIA compétitif » pour le dosage de l'hepcidine.	113

Abréviations

α2M :	α2-macroglobuline
α2M-MA :	α2-macroglobuline activée par la méthylamine
ADMA :	N ^G ,N ^G -diméthyl L-arginine asymétrique
ALA :	Acide 5-aminolévulinate
ALAS :	Acide 5-aminolévulinate synthase
ASE :	Agents stimulant l'érythropoïèse
CaM :	Calmoduline
CAT :	Cationic amino acid transporter
CEC :	Circulation extra-corporelle
CLHP :	Chromatographie liquide haute performance
CM :	Carence martiale
CMA :	Carence martiale absolue
CMF :	Carence martiale fonctionnelle
CO :	Monoxyde de carbone
CRP :	Protéine C-réactive
CST :	Coefficient de saturation de la transferrine
DCYTB :	Cytochrome duodéal b
DDAH :	Diméthyl-arginine diméthyl-aminohydrolase
DMT1 :	Divalent metal transporter 1
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPO :	Erythropoïétine
ERN:	Espèce réactive de l'azote
ERO :	Espèce réactive de l'oxygène
ERFE :	Régulateur érythroïde érythroferrone
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FC :	Fréquence cardiaque
Fe ²⁺ :	Fer ferreux
Fe ³⁺ :	Fer ferrique
FEVG :	Fraction d'éjection ventriculaire gauche
FPT :	Ferroportine
GDF-15 :	Growth differentiation factor-15
GMP :	Guanylate monophosphate

GPx :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
GRACE :	Global Registry of Acute Coronary Event
HbA1c :	Hémoglobine glyquée
HCP1 :	Protéine porteuse de l'hème 1
HDL-C :	High Density Lipoprotein-Cholesterol
HIF :	Facteur induit par l'hypoxie
HJV :	Hémojuvéline
HMGB1 :	High Mobility Group Box-1
HO :	Hème Oxydase
IC :	Insuffisance cardiaque
IDM :	Infarctus du myocarde
IEC :	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IL :	Interleukine
IMC :	Indice de masse corporelle
IRA :	Insuffisance rénale aiguë
IRE :	Iron responsive element
IRP :	Iron regulatory protein
IV :	Intra-veineuse
LDL-C :	Low Density Lipoprotein-Cholesterol
L-MMA :	NG-MonoMéthyl L-Arginine
LPS :	Lipopolysaccharides
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NfκB :	Nuclear factor-kappa B
•NO :	Monoxyde d'azote
NOS :	Nitric oxide synthase
NSTEMI :	Non ST-segment elevation myocardial infarction
NT-proBNP :	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
O ₂ ^{•-} :	Anion superoxyde
PAD :	Pression artérielle diastolique
PAS :	Pression artérielle systolique
PBS :	Phosphate buffered saline
PRMT :	Protéine arginine méthyl-transférase
RE :	Réticulum endoplasmique
RICO :	observatoire des Infarctus de Côte d'Or
RPE :	Résonance paramagnétique électronique
RTf :	Récepteur spécifique à la transferrine

SDMA :	N ^G ,N ^G -diméthyl L-arginine symétrique
SOD :	Superoxyde dismutase
STEMI :	ST-segment elevation myocardial infarction
Tf :	Transferrine
TLR :	Toll like receptor
TNF :	Tumor necrosis factor
TrxR :	Thiorédoxine réductase
USIC :	Unité de soins intensifs de cardiologie

Introduction

Les pathologies cardiovasculaires représentent une des premières causes de morbi-mortalité dans les pays industrialisés. La fréquence et la gravité de ces pathologies, aussi bien en termes de mortalité que de complications à plus ou moins long terme, demeurent un véritable problème de santé publique, notamment concernant la cardiopathie ischémique. En effet, malgré d'importants progrès en matière de prévention, de prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire ainsi que le développement continu de stratégies thérapeutiques améliorant son pronostic, le nombre de patients atteints reste stable en France. Chaque année, il est dénombré environ 120 000 infarctus du myocarde (IDM). Environ 10 % des victimes décèdent dans l'heure qui suit et le taux de mortalité à un an est de 15 %, représentant environ 18 000 décès par an en France. Le pronostic s'est néanmoins bien amélioré au cours des 15 dernières années : grâce à l'amélioration globale de la prise en charge, la mortalité, qui reste élevée, a tout de même diminué de moitié en 10 ans.

L'IDM est une pathologie aiguë qui résulte, la plupart du temps, des complications de l'athérosclérose, maladie chronique multifactorielle. Son développement comporte plusieurs étapes, dont l'accumulation de lipoprotéines oxydées dans la paroi artérielle, qui s'accompagnent d'un état inflammatoire et de processus oxydatifs qualifiés de stress oxydant. L'ensemble de ces phénomènes serait associé à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. La dysfonction endothéliale est caractérisée en particulier par un déséquilibre dans la production et la libération de substances aux fonctions vasodilatatrices, anti-mitotiques et anti-thrombotiques (monoxyde d'azote, prostacycline, ...) et de substances aux propriétés vasoconstrictrices, thrombogènes et prolifératives (anion superoxyde, endothéline, angiotensine II). Lorsqu'un tel déséquilibre se produit au sein de l'homéostasie biochimique de ces cellules, sous l'influence, par exemple, des facteurs de risque cardiovasculaire ou lors du vieillissement, cela conduit à une dysfonction endothéliale aiguë ou chronique [1].

Dans les coronaropathies et de surcroît en phase aiguë d'IDM, les biomarqueurs sont devenus incontournables, pour fournir des informations à la fois diagnostiques et pronostiques, permettant de guider les stratégies thérapeutiques. En complément des données cliniques, ils permettent de stratifier les niveaux de risque de morbi-mortalité, à court et long terme, apportant une aide supplémentaire pour orienter la prise en charge des patients [2,3]. Toutes les atteintes fonctionnelles myocardiques sont sous-tendues par des altérations des métabolismes biochimiques tissulaires.

Durant la dernière décennie, de nombreux travaux ont étudié en particulier le rôle du fer, de son métabolisme ainsi que de sa régulation, dans les pathologies cardiovasculaires, notamment dans l'initiation et le développement de pathologies telles que l'insuffisance

cardiaque et l'athérosclérose. Du fait de ses propriétés d'oxydo-réduction, le fer, qui est capable de passer d'une forme ferreuse Fe^{2+} (capable de réagir avec l'oxygène) à une forme ferrique Fe^{3+} (quasiment insoluble) par échange d'un électron, joue un rôle fondamental dans les processus biologiques indispensables tels que la respiration mitochondriale, le transport de l'oxygène ou l'activité de différentes enzymes. Mais c'est un élément paradoxal car, bien qu'il soit essentiel, de par ses nombreux rôles précédemment cités, il est potentiellement dangereux car il est capable, s'il est présent sous formes activées et en excès, de catalyser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), à l'origine de dommages cellulaires et tissulaires. Toutes ces réactions sont médiées par différentes voies de signalisation et les caractérisations, il y a quelques années, de l'hormone de régulation du fer, l'hepcidine, et très récemment du facteur régulateur érythroïde nommé érythroferrone ont ouvert de nouvelles voies de recherche dans ce domaine [4,5].

La diméthyl-arginine asymétrique (ADMA), issue de la protéolyse de protéines méthylées au niveau de leurs résidus arginine, est un inhibiteur compétitif endogène des NO synthases (NOS) et des taux élevés d'ADMA sont significativement associés à une réduction de la production de NO circulant. L'ADMA, marqueur de dysfonction endothéliale, est associée à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire. La diméthyl-arginine symétrique (SDMA), le stéréo-isomère de l'ADMA, a une élimination exclusivement rénale et est considérée, comme nous le verrons ultérieurement, comme un puissant marqueur de fonction rénale. Des travaux récents suggèrent que l'étude de l'évolution des taux de SDMA serait capable de prédire la survenue d'évènements cardiaques au-delà d'une pathologie rénale chronique [6].

Dans la phase aiguë de l'IDM, peu de travaux ont étudié ces biomarqueurs, qu'il s'agisse des protéines régulatrices du métabolisme du fer, hepcidine et érythroferrone, ou des dérivés de la L-arginine. Nous nous sommes alors proposés dans ce travail d'aborder cette thématique. Nous rappellerons dans une première partie bibliographique le métabolisme du fer, sa régulation et ses implications dans le cadre des pathologies cardiovasculaires. Nous développerons 1) le rôle du stress oxydant dans ses relations avec l'évolution des fonctions cardiovasculaires concomitantes à la phase aiguë de l'IDM et 2) l'implication possible des dérivés de la L-arginine au décours de cette phase initiale de l'IDM. Nous nous sommes proposés dans une partie de ce document de thèse de décrire les méthodes d'identification et de quantification de différents composés associés au métabolisme du fer et du NO . Après avoir validé ces différentes approches analytiques, nous avons orienté nos travaux à l'interface entre la recherche fondamentale et le versant clinique. Les patients recrutés dans nos études étaient tous intégrés à l'observatoire des Infarctus de Côte d'Or (RICO) au sein du service de cardiologie du CHU de Dijon.

Etude bibliographique

I. Métabolisme du fer

1. Introduction

Le fer est un cofacteur essentiel pour plusieurs enzymes impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction en raison de sa capacité à exister sous deux formes ioniques : fer ferreux (Fe^{2+}), capable de réagir avec l'oxygène et fer ferrique (Fe^{3+}), presque insoluble. Il est ainsi utilisé dans l'organisme pour assurer le transport de l'oxygène ou catalyser des réactions de transfert d'électrons, de fixation d'azote ou synthétiser l'ADN. Dans l'organisme, un atome de fer change continuellement d'état d'oxydo-réduction sous l'action d'oxydases ou de réductases spécifiques. Toutefois, la capacité d'oxydo-réduction du fer, s'il est présent en excès dans les tissus ou non pris en charge de façon optimale, peut conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce qui peut endommager divers composants cellulaires. Pour cette raison, les niveaux de fer dans les tissus doivent être finement régulés. Différentes molécules sont impliquées dans l'absorption du fer, dans son stockage par les hépatocytes et dans son export à partir des hépatocytes.

Deux classes de protéines sont impliquées dans le métabolisme du fer. Certaines sont nécessaires au transport du fer dans les liquides de l'organisme, à son passage à travers les membranes cellulaires, à son stockage dans les tissus sous forme disponible et non toxique et des protéines ferroxidases ou ferriréductases, agissant dans les réactions d'oxydo-réduction. D'autres utilisent le fer pour leur fonction et sont classées en fonction de l'atome de fer dans la molécule, montrant les nombreuses fonctions différentes associées au fer. On distingue ainsi :

- Les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine, cytochromes...) où le fer est présent sous forme d'hème, lié à quatre noyaux pyrroles d'une molécule de porphyrine IX.
- Les protéines à centre fer-soufre où des atomes de fer sont liés de façon covalente à des atomes de soufre, structures elles-mêmes liées par l'intermédiaire de résidus de cystéine.
- Des protéines enzymatiques où un seul atome de fer est présent au site actif associé à des acides aminés (exemple des enzymes de la famille des dioxygénases oxoglutarate-dépendantes).

La découverte de l'hepcidine, avec son rôle de régulateur du fer ainsi que de son mécanisme d'action, a conduit à une meilleure compréhension de la physiopathologie des troubles du métabolisme du fer en pathologie humaine et offre un nouveau potentiel clinique

en termes de diagnostic et de thérapie. L'hepcidine est apparue comme la molécule centrale de régulation de l'homéostasie systémique du fer. Les connaissances sur la façon dont l'hepcidine exerce sa fonction de régulation et sur les processus moléculaires qui régulent sa production sont largement basées sur des études chez l'animal et *in vitro*. L'hepcidine est un peptide sécrété principalement par les hépatocytes. Elle entraîne une down-regulation de la ferroportine, le seul exportateur connu du fer, et inhibe ainsi la sortie du fer des entérocytes duodénaux, des macrophages et des hépatocytes dans la circulation sanguine. L'expression de l'hepcidine est régulée positivement par la charge corporelle en fer. Bien que les mécanismes sous-jacents impliqués dans l'expression de l'hepcidine régulée par le fer n'aient pas été complètement élucidés, plusieurs protéines participant à ce processus ont été identifiées.

2. Le fer dans l'organisme

La quantité totale de fer chez un adulte de 70 kg est d'environ 4 g, dont les deux tiers sont représentés par le fer contenu dans les globules rouges et 300 mg est contenu dans la myoglobine des muscles. La majeure partie du fer plasmatique est dirigé vers la moelle osseuse pour l'érythropoïèse. Plus de 2 millions de nouveaux érythrocytes sont produits chaque seconde par la moelle osseuse, ce qui nécessite un apport quotidien d'au moins 20 à 30 mg de fer. Par conséquent, la majorité du fer héminique provient du recyclage des érythrocytes sénescents par les macrophages du système réticulo-endothélial (figure 1). Seulement 1 à 2 mg de l'apport quotidien de fer provient de l'absorption intestinale, ce qui, à l'état de base, est suffisant pour compenser la perte insensible de fer, résultant de l'exfoliation des cellules épithéliales, de la desquamation des cellules de la peau et de pertes sanguines mineures. D'importantes quantités de fer sont également présentes dans les macrophages (jusqu'à 600 mg), tandis que l'excès de fer (~ 1 g) est stocké dans le foie. Pour garantir l'équilibre des taux de fer dans l'organisme et éviter une surcharge en fer, les cellules des mammifères régulent les taux de fer à travers son absorption et son export, car l'organisme n'a aucun moyen pour éliminer le fer absorbé en excès.

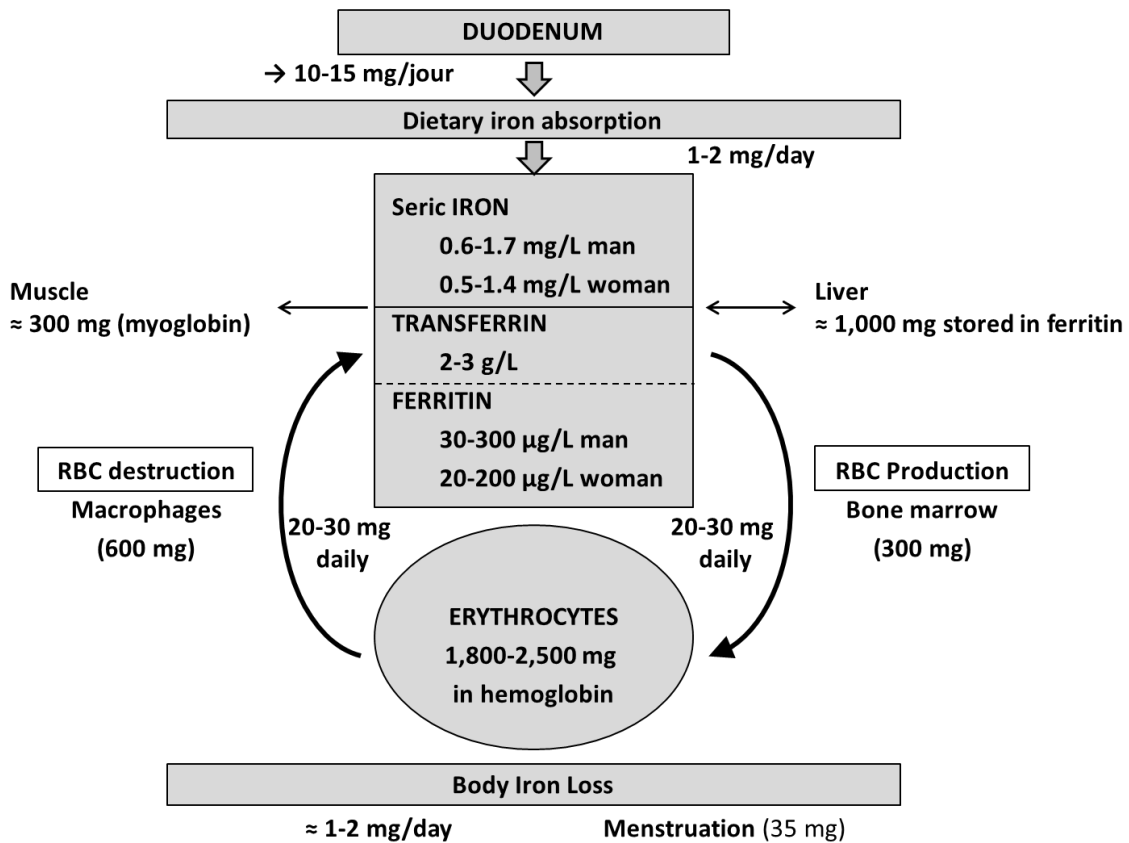


Figure 1 : Distribution du fer dans le corps humain d'un adulte. Un adulte de 70 kg a environ 4 g de fer corporel total. La plupart de ce fer circule dans l'hémoglobine des globules rouges. L'organisme absorbe seulement 1-2 mg par jour à partir d'une alimentation contenant 10-15 mg de fer. (D'après Gudjoncik *et al* [7] ; article intégré dans ce document de Thèse ultérieurement.)

2.1 Sources nutritionnelles de fer

Le maintien de concentrations stables en fer, intracellulaires et extracellulaires, nécessite la régulation coordonnée du transport du fer dans le plasma à partir de sources alimentaires absorbées dans le duodénum, à partir des globules rouges sénescents recyclés par les macrophages et de son stockage dans les hépatocytes. Chez l'homme, les indices représentant le statut du fer dans l'organisme les plus couramment utilisés sont le taux d'hémoglobine, le coefficient de saturation de la transferrine (CST) ainsi que la ferritine sérique. La carence martiale et l'anémie associée peuvent contribuer à une efficacité énergétique réduite, à une capacité aérobie abaissée ainsi qu'à une diminution de l'endurance et à l'apparition de fatigue musculaire et générale.

La carence martiale (CM) est la carence nutritionnelle la plus courante dans le monde. Lorsque les apports en fer ne parviennent pas à répondre aux demandes physiologiques ou augmentées dans certaines situations, par exemple, en raison de saignements ou lors d'une absorption insuffisante, les réserves en fer s'épuisent et la carence en fer se développe. Différents types de carence en fer existent en clinique. La classification commune distingue la carence martiale absolue (CMA), la carence fonctionnelle en fer (CMF), et la séquestration du fer [8]. La supplémentation en fer par voie orale est souvent suffisante pour traiter la carence absolue en fer et la carence en fer légère à modérée. En cas de carence en fer grave et de carence fonctionnelle en fer, la supplémentation en fer par voie intra-veineuse (IV) est souvent plus efficace. Un certain nombre de préparations de suppléments en fer par voie orale et IV sont disponibles. Les préparations à base de fer par voie orale comprennent les sels de fer, les complexes de fer polysaccharidiques et des combinaisons de fer, par exemple avec de l'acide folique ou la vitamine C [9].

Il existe trois sources de fer dans l'alimentation : le fer alimentaire natif (soit héminique, soit non héminique), la supplémentation en fer (fer non héminique ajouté volontairement dans la nourriture par l'industrie) et le fer contaminant (fer non-héminique incorporé dans la nourriture de façon involontaire, résultant soit de réactions biochimiques, soit de procédés mécaniques durant la préparation de la nourriture) [10].

Les principales sources alimentaires de fer sont les céréales et la viande. Les sources de fer non héminique et héminique sont répertoriées dans le tableau 1 de la revue « Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system », parue dans *Molecular Nutrition & Food Research* et présentée dans ce document de Thèse (Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. **Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system.** *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1721–38.

doi:10.1002/mnfr.201400036.) [7]. Les formes chimiques de fer dans la nourriture influencent la quantité absorbée par le tractus gastro-intestinal et dans la circulation sanguine. La biodisponibilité relativement faible du fer à partir des céréales et des légumineuses est due à la teneur en acide phytique de ces aliments. Les inhibiteurs de l'absorption du fer comprennent les phytates, les polyphénols, les protéines de soja et le calcium, tandis que la viande et l'acide ascorbique améliorent l'absorption du fer [11]. Le fer nutritionnel provient de deux sources, héminique et non héminique. Le fer héminique est obtenu à partir des viandes et est plus facilement absorbé que le fer non héminique, obtenu à partir de la consommation de céréales et de légumes. L'hème est absorbé en tant que complexe de porphyrine stable, non affecté par d'autres composants alimentaires. L'hème est hydrophobe et diffuse donc passivement à travers les membranes plasmiques.

L'absorption du fer héminique est cinq à dix fois plus grande que celle du fer non héminique. Bien que l'hème ne représente que 10 à 15% du fer alimentaire dans les populations carnivores, il peut représenter près de 40% du fer absorbé au total. Parce que l'absorption du fer héminique est constante et indépendante de la composition de la viande, la contribution en fer héminique peut être facilement calculée à partir de relevés alimentaires [12].

Récemment, cependant, un transporteur intestinal de l'hème a été identifié et appelé protéine porteuse de l'hème 1 (HCP1). Ce transporteur est abondamment exprimé sur la bordure en brosse des entérocytes du duodénum [13]. En ce qui concerne le fer non héminique, il existe sous la forme de complexes "libres". L'absorption du fer est fortement influencée à la fois par le statut en fer du sujet et par un grand nombre de facteurs alimentaires. L'absorption du fer à partir de l'alimentation est ainsi déterminée plus par la composition d'un repas que par la quantité de fer présente dans l'alimentation.

Huit enzymes, qui sont divisées entre les mitochondries et le cytoplasme, sont impliquées dans la biosynthèse de l'hème. L'hème est généré dans la matrice mitochondriale. La première étape dans la biosynthèse de l'hème chez les mammifères est catalysée par l'enzyme acide 5-aminolévulinate (ALA) synthase (ALAS). L'ALAS catalyse la condensation de la glycine avec le succinyl-CoA pour former l'ALA et le CO₂. La protéine mature est située dans la matrice mitochondriale. Une fois que l'ALA est produite par l'ALAS, il est exporté hors de la matrice mitochondriale pour atteindre la deuxième enzyme de la voie. L'étape terminale de synthèse de l'hème est l'insertion de fer ferreux dans le macrocycle protoporphyrine IX pour produire le protohème IX (hème) [14]. Ceci est catalysé par l'enzyme ferrochélatase, qui est synthétisée dans le cytoplasme comme une préprotéine

et est transportée vers la matrice mitochondriale, où elle est associée à la membrane mitochondriale interne [15] (figure 2).

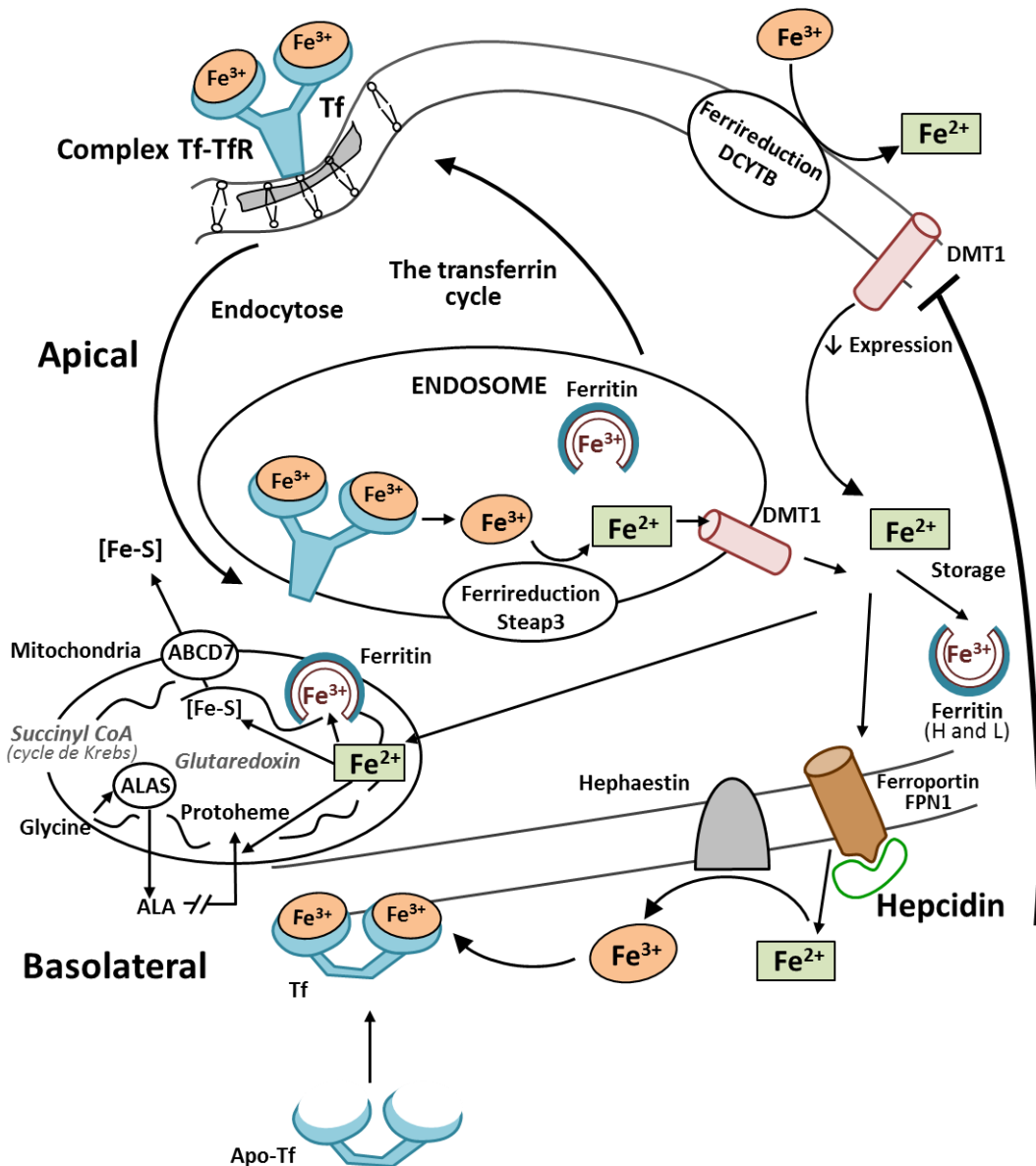


Figure 2 : Contrôle de l'homéostasie du fer dans les entérocytes. Le complexe Fe³⁺ - Tf se lie au TfR sur la surface de la cellule et subit une endocytose médiée par récepteur. Le Fe³⁺ relargué est réduit en Fe²⁺ par la ferriréductase Steap3 au sein de l'endosome avant son export de l'endosome par le transporteur DMT1. Le Fe²⁺ non utilisé ou non stocké dans la ferritine est exporté par la ferroportine. A l'intérieur de la matrice mitochondriale, le fer peut être dirigé vers différentes voies de signalisation incluant la biogenèse du cluster fer-soufre (Fe-S). Dans les mitochondries, les clusters sont régulés strictement par un transporteur : cassette de liaison à l'ATP (ABC) transporteur (ABCB7). La première étape dans la biosynthèse de l'hème chez les mammifères est catalysée par l'enzyme synthase 5-aminolévulinate (ALA) synthase (ALAS). Cette ALAS catalyse la condensation de glycine avec le succinyl-CoA pour former ALA et CO₂. L'étape terminale de la synthèse de l'hème est l'insertion de Fe²⁺ dans la protoporphyrine pour produire le protohème (hème). (D'après Gudjoncik *et al* [7] ; article intégré dans ce document de Thèse ultérieurement.)

2.2 Transport et stockage du fer

Le fer circulant dans le plasma n'étant pas soluble, il est lié à la transferrine, synthétisée par le foie. Cette protéine est bilobée, chaque lobe pouvant fixer un atome de fer ferrique avec une haute affinité, transportant ainsi les atomes de fer de ses sites de libération, entérocytes et macrophages du système réticulo-endothélial, vers les tissus périphériques, en particulier les proérythroblastes et les cellules de la moelle osseuse. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs spécifiques à la transferrine (RTf) permettant de capter le fer du plasma. La saturation de la transferrine varie en fonction du statut en fer de l'organisme est donc déterminée par l'absorption intestinale du fer, par le recyclage de fer héminique par les macrophages ainsi que par l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse.

Dans les conditions physiologiques, la saturation de la transferrine est d'environ 30%. Ce taux de saturation a été l'un des premiers paramètres biologiques d'évaluation du statut en fer de l'organisme et joue un rôle majeur dans le contrôle de la synthèse de l'hépcidine par la voie HFE-TfR2.

Le fer peut apparaître dans le plasma sous forme libre, non lié à la transferrine, quand la capacité de fixation de la transferrine est saturée. Il pénètre alors dans les cellules par diffusion passive facilitée ou par le biais d'un système de transport. Il peut ainsi provoquer la survenue d'une surcharge tissulaire, surtout au niveau du foie et du cœur, entraînant ainsi des dommages cellulaires.

Le stockage du fer dans les cellules nécessite qu'il soit associé à la ferritine, protéine de stockage qui protège la cellule de la toxicité du fer et qui est capable de le rendre disponible rapidement en cas de besoin. Les principales réserves en fer se trouvent dans le foie et dans la rate. Il existe également une ferritine mitochondriale qui possède une activité ferroxidasique indispensable à la captation du fer. Elle est exprimée dans les cardiomyocytes et aussi dans les neurones et les spermatozoïdes. Elle est aussi retrouvée dans les mitochondries des sidéroblastes lors d'anémie sidéroblastique génétique ou acquise [16].

Bien que la ferritine soit une protéine principalement intracellulaire, sa fraction circulante plasmatique est proportionnelle au stock intracellulaire. Le dosage de la ferritine sérique permet ainsi l'évaluation des réserves en fer de l'organisme [17]. Sa concentration sérique se situe entre 20 et 200µg/L et une carence en fer est diagnostiquée par une concentration inférieure à 20 µg/L. Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'une augmentation de la ferritine. Par exemple, une surcharge en fer entraîne une augmentation

de la concentration en ferritine aussi bien dans les cellules que dans le sérum, la synthèse de ferritine étant activée par le fer. La ferritinémie augmente également en cas d'inflammation, dans le syndrome métabolique, dans la maladie de Still ainsi que dans le syndrome héréditaire cataracte-hyperferritinémie.

2.3 Absorption intestinale du fer

L'absorption du fer alimentaire, qui est présent soit sous forme héminique, soit sous forme non-héminique, est effectuée par les entérocytes matures des villosités du duodénum et du jéjunum proximal. Une grande partie du fer alimentaire qui entre dans la lumière du duodénum est sous la forme oxydée ou ferrique et, par conséquent, doit être réduit avant de pouvoir être absorbé par les entérocytes [18]. La réduction du fer est principalement réalisée par voie enzymatique par une réductase ferrique située dans la bordure en brosse. La figure 2 représente le contrôle de l'homéostasie du fer dans l'entérocyte.

Comme le fer n'est pas un élément soluble, il ne peut pas traverser les membranes cellulaires spontanément. Il existe un système complexe de transporteurs qui assure ce passage ; ces transporteurs sont différents, à la fois en fonction de la nature héminique ou non du fer et à la fois selon s'il est associé ou non à une protéine porteuse.

L'identification de ces transporteurs et d'autres protéines intervenant dans l'absorption du fer alimentaire non héminique et héminique a grandement amélioré la compréhension de ce processus, qui est au centre du contrôle de l'homéostasie du fer.

Le fer non héminique est absorbé via le transporteur DMT1 (divalent metal transporter 1) et le cytochrome duodénal b (DCYTB), qui ont une activité réductase ferrique et qui catalysent la réduction du fer ferrique en fer ferreux dans le procédé de l'absorption du fer. Ces réductases sont présentes à la membrane apicale de l'intestin grêle proximal.

DMT1 est un transporteur transmembranaire de cations divalents à large spectre (fer, zinc, manganèse, cuivre, cobalt...), qui a une plus forte affinité pour le fer. Le transport du fer via DMT1 est dépendant du pH et est couplé à un transport de proton.

Il existe deux isoformes de la protéine DMT1, qui diffèrent à leur extrémité C-terminale. Le profil d'expression de DMT1 et de ses isoformes varie en fonction des tissus. Leurs rôles sont spécifiques dans l'absorption du fer en fonction des tissus et il existe un adressage intracellulaire différentiel de la protéine entre les différentes isoformes [19]. La quantité de fer absorbé par les entérocytes est influencée par divers facteurs, comprenant

les variations de réserves en fer de l'organisme, le taux de globules rouges, l'hypoxie, l'inflammation et la grossesse [20].

Le complexe Tf-TfR est internalisé dans un compartiment endosomal unique où l'acidification de l'endosome conduit à la libération du fer ferrique. Le fer ferrique est ensuite réduit en fer ferreux et transporté à travers la membrane endosomale par DMT1. La réductase ferrique endosomale responsable de la réduction du fer ferrique dans les cellules érythroïdes a récemment été identifiée : steap3 (6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) [21].

Malgré l'importance manifeste de l'hème alimentaire comme source de fer dans l'organisme, le mécanisme par lequel les entérocytes captent l'hème et le catabolisent pour utiliser le fer est mal compris. L'hème est dégradé à travers des vésicules d'internalisation dans les 2-3 heures après son absorption par endocytose médiée par des récepteurs. Le rôle des hèmes oxydases (HO) localisées dans les entérocytes a maintenant été démontré [22]. L'HO est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hème à l'aide du cytochrome P-450, de la NADPH, d'oxygène moléculaire produisant du CO, du fer et de la biliverdine [23]. Trois isoformes d'HO ont été caractérisées : une forme inductible (HO-1), qui est up-régulée en particulier dans la rate et le foie en réponse à différents types de stress, et deux formes constitutives (HO-2 et HO-3). HO-1 et HO-2 sont les produits de gènes différents (ho-1, ho-2, également nommés hmox1, hmox2). HO-1 est produite à un niveau élevé d'expression dans la rate et d'autres tissus qui dégradent les globules rouges sénescents, comme les cellules spécialisées réticulo-endothéliales du foie et de la moelle osseuse, mais elle est également présente dans les entérocytes [24]. L'HO-2 est exprimée de façon constitutive dans certains tissus (cerveau, foie, intestin et testicules) et est impliquée dans les processus de signalisation et de régulation. L'HO-2 possède trois résidus cystéine qui modulent l'affinité pour l'hème, alors que HO-1 n'en a pas. Il est probable que les résidus de cystéine dans HO-2 soient impliqués dans une forme d'interactions protéine-protéine liées aux rôles de signalisation de la protéine [25]. L'existence d'une troisième isoforme de l'HO, HO-3, a été rapportée chez le rat. La transcription de l'HO-3 a été retrouvée dans une série d'organes, comprenant la rate, le foie, les reins et le cerveau [26]. De toute évidence, le rôle de HO-1 et HO-2 dans les entérocytes doit être étudié en situations pathologiques.

3. Régulation du fer

Plusieurs protéines, telles que la transferrine, la ferritine, l'hémosidérine, l'hepcidine et la ferroportine, exercent des fonctions cruciales dans le maintien de l'homéostasie systémique de fer. Les macrophages jouent un rôle important dans l'exécution des cascades de régulation qui conduisent à des variations des taux de fer systémique. Schématiquement, le site principal de l'absorption du fer est l'intestin grêle, mais la plupart du fer est recyclé par le système des monocytes-macrophages via la phagocytose des érythrocytes sénescents. Dans la circulation, le fer est généralement lié à la transferrine (Tf), et la majeure partie du fer lié à la Tf est utilisé pour l'érythropoïèse de la moelle osseuse. Dans les cellules, le fer est stocké dans les protéines hémosidérine ou ferritine. Le fer est le seul micronutriment connu pour avoir une hormone de régulation, l'hepcidine, qui est régulée à la fois selon l'état nutritionnel et selon les infections. L'hepcidine est principalement synthétisée dans le foie. Elle agit en tant que régulateur négatif du taux de fer et sa production est augmentée dans la surcharge en fer et dans l'inflammation. Le fer intracellulaire est libéré dans la circulation par la ferroportine (FPT). Le fer est reversé à la Tf et réutilisé pour l'érythropoïèse de la moelle osseuse. L'hepcidine se lie à l'exportateur de fer FPT, ce qui entraîne sa dégradation, inhibant ainsi l'absorption intestinale du fer, son export cellulaire et la libération du fer par le système réticulo-endothélial.

Des processus physiologiques multiples sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du fer. Ceux-ci comprennent son stockage aux niveaux intracellulaires et extracellulaires. Le contrôle de la balance du fer dans l'organisme entier nécessite une communication entre les sites d'absorption, d'utilisation et de stockage. Les transporteurs de protéines clés et les molécules qui régulent leurs activités ont été récemment identifiés. La ferritine et l'hepcidine sont les principales protéines régulatrices.

La régulation intracellulaire du métabolisme du fer est assurée par le système IRE/IRP alors que la régulation systémique du métabolisme du fer est principalement sous dépendance de l'hepcidine.

3.1 Rôle de la ferritine et du système de régulation intracellulaire du métabolisme du fer IRE/IRP

Des processus physiologiques multiples sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du fer. Ceux-ci comprennent le stockage du fer aux niveaux intracellulaire et extracellulaire. La ferritine est la principale protéine de stockage du fer. Elle est composée de

24 sous-unités, qui se replient en un faisceau de 4 hélices, formant une enveloppe de protéines presque sphérique. Il existe un équilibre fort entre le fer lié à la ferritine (Fe^{3+}) et le pool de fer labile contenu dans les cellules (Fe^{2+}), par lequel la ferritine empêche la formation d'espèces réactives de l'oxygène, induites par la réaction de Fenton. Différents types de cellules contiennent un pool cytosolique transitoire de fer, probablement lié à des chélateurs intracellulaires de faible masse moléculaire, tels que le citrate, divers peptides, l'ATP, l'AMP ou le pyrophosphate. Ce pool de fer labile a une activité redox et sa concentration est déterminée par les taux d'absorption du fer, son utilisation pour l'incorporation dans les enzymes du fer, le stockage dans la ferritine et l'export de la cellule.

La ferritine est synthétisée essentiellement par le foie et les macrophages. Elle est ubiquitaire mais surtout présente dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Une mole de ferritine, dont le poids moléculaire est de 440 000 daltons, fixe et stocke environ 4500 atomes de Fe^{3+} .

Il existe deux sous-unités fonctionnellement et génétiquement distinctes de ferritine : **la L-ferritine et la H-ferritine** (également connues sous le nom de ferritine à chaîne légère et de ferritine à chaîne lourde). Ces deux sous-unités coopèrent pour le stockage du fer : la sous-unité H a une activité catalytique ferroxidase capable d'oxyder Fe^{2+} en Fe^{3+} et la sous-unité L favorise la formation d'un noyau d'hydroxy-phosphate ferrique. Par sa capacité à limiter le fer libre intracellulaire, la sous-unité H joue un rôle dans les défenses anti-oxydantes de la cellule [27]. La ferritine se trouve dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries des cellules. La ferritine sérique est considérée comme le reflet des réserves en fer de l'organisme et augmente en tant que sous-produit sécrété par la synthèse intracellulaire de ferritine. Le fer cellulaire est stocké principalement dans le cytoplasme, mais des organites tels que les mitochondries sont les principaux utilisateurs du fer métaboliquement actif [28].

La régulation de la synthèse de la ferritine par le fer est principalement due à une régulation post-transcriptionnelle qui dépend de l'interaction entre une protéine cytoplasmique nommée « iron regulatory protein » (IRP), jouant le rôle de senseur du fer et un motif ARN très conservé, nommé « iron responsive element » (IRE). Les motifs nucléotidiques IRE sont des motifs d'environ 30 nucléotides qui adoptent une structure tige-boucle et qui se trouvent dans la région 5' non codante des ARNm H- et L-ferritine, de l'ARNm ferroportine et de l'ARNm ALAS-2. Certains motifs IRE ont également été identifiés dans la région 3' non codante d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans le transport du fer (RTf1, isoforme I de DMT1). Il existe deux formes moléculaires différentes de l'IRP, IRP1 et IRP2, qui présentent une forte affinité de liaison aux IRE à l'état natif. La

fixation d'une molécule IRP sur un IRE présent dans la partie 5' non-codante réprime la traduction alors que la fixation sur un IRE présent dans la région 3' non codante stabilise l'ARNm. La régulation de la synthèse de la ferritine se fait par cette régulation post-transcriptionnelle, via la liaison de IRP1 et IRP2 au motif IRE situé dans la région 5' de l'ARNm ferritine. IRP1 et IRP2 sont tous deux exprimés de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus. En plus de la régulation médiée par le fer, le stress oxydant est capable de moduler l'activité de IRP1 et IRP2. Ce processus est régulé au niveau transcriptionnel par un élément sensible aux antioxydants « antioxidant-responsive element » (ARE) [29]. Le rôle du NO dans la régulation du système IRP/IRE est bien établi [30]. Le NO induit l'expression de la FPN, protéine transmembranaire responsable de l'export de fer à partir des macrophages, et est associé à l'activation du facteur de transcription nucléaire érythroïde (Nrf2) [31]. Étant donné les circuits de régulation établis entre l'activité de la NO synthase (NOS) et l'homéostasie du fer, il a été émis l'hypothèse que l'homéostasie du fer et la biologie du NO sont interconnectées. Des études récentes ont montré que fer héminique α de l'hémoglobine, sous sa forme oxygénée Fe^{2+} , et la NOS, sont dans un complexe macromoléculaire et peuvent former une interaction directe protéine-protéine [32].

3.2 Rôle de la transferrine

L'homéostasie du fer cellulaire s'accompagne de l'expression régulée et coordonnée de la ferritine et d'autres protéines incluant la transferrine (Tf). Les cellules ont des récepteurs à la transferrine (TfR) qui interviennent dans le métabolisme du fer. Le fer est importé par l'endocytose de Tf chargée en Fe^{3+} qui interagit avec ses TfRs (TfR1 et TfR2) dans une boucle de rétroaction étroitement régulée, contrôlée aux niveaux génétique et protéique. La Tf est une protéine monomérique de 76 à 81 kDa, comprenant deux lobes de structure similaire (appelés lobes N et C), dont chacun contient un unique site de liaison au fer. La Tf plasmatique est un chélateur puissant, capable de fixer du fer fortement, mais de manière réversible. La chélation du fer par la Tf sert à maintenir Fe^{3+} dans une forme soluble dans un état redox inerte, empêchant ainsi la génération de radicaux libres toxiques [33]. TfR1 (aussi connu sous le nom de CD71) est exprimé de façon ubiquitaire à de faibles niveaux dans la plupart des tissus humains normaux. TfR2 est une protéine qui est hautement homologue à TfR1 mais dont l'expression est limitée aux hépatocytes. Servant de principale porte d'entrée à la Tf liée au fer dans les cellules, TfR1 est un récepteur de type II qui se situe sur la membrane cellulaire externe. Le complexe Tf-TfR est internalisé par l'intermédiaire des fosses recouvertes de clathrine et ensuite métabolisé dans le lysosome [34]. L'homéostasie du fer est contrôlée par la Tf, ainsi que par d'autres moyens. Dans ce

contexte, il existe une relation entre les TfRs et des peptides tels que l'hepcidine, qui semble être impliquée dans la voie finale commune vers laquelle les composants du réseau de régulation convergent pour contrôler le métabolisme du fer tissulaire.

3.3 Rôle de l'hepcidine

Il y a dix ans, l'hepcidine, un peptide antimicrobien doté de propriétés de régulation du fer, a été découvert comme étant un acteur majeur dans la régulation du fer en physiopathologie. L'hepcidine est principalement synthétisée dans les hépatocytes, sécrétée par les hépatocytes et excrétée par le rein. Dans la carence en fer ou dans l'anémie hémorragique ou hémolytique, la production d'hepcidine dans les hépatocytes diminue. Dans ces situations, à la fois l'absorption du fer dans le duodénum et la libération du fer à partir des réserves sont fortement augmentées. Chez les patients souffrant d'anémie ou de maladie chronique, l'hepcidine est surexprimée [35].

L'hepcidine est un peptide hormonal produit par le foie, qui contrôle directement le taux de fer dans l'organisme et joue donc le rôle de régulateur central de l'homéostasie martiale. L'hepcidine se fixe sur la ferroportine, le seul exportateur de fer connu, à la surface des entérocytes, des hépatocytes et des macrophages. Cette interaction provoque l'ubiquitinylation, l'internalisation et la dégradation de la ferroportine, entraînant ainsi la séquestration du fer dans ces cellules [36] (figure 3).

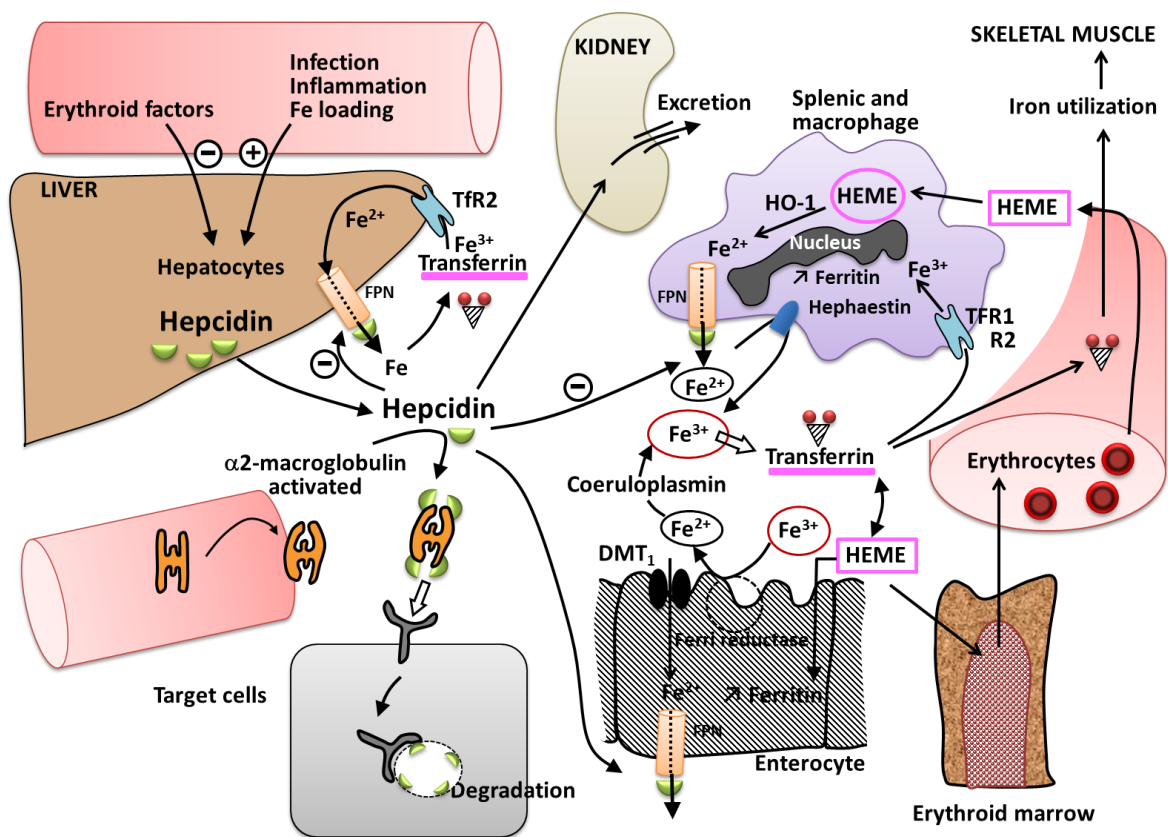


Figure 3 : Régulation du métabolisme du fer systémique et expression de l'hepcidine. Les entérocytes incorporent le fer via le transporteur DMT1 (divalent metal transporter 1) situé sur la membrane apicale lors de la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par une ferriréductase. L'hepcidine hépatique régule la sortie de fer des cellules en régulant l'activité de la ferroportine (FPN). La synthèse et la sécrétion d'hepcidine par les hépatocytes sont influencées par les taux de fer en relation avec les infections et l'inflammation. L'hepcidine se lie préférentiellement à la glycoprotéine plasmatique activée $\alpha 2$ - macroglobuline ($\alpha 2\text{M}$). Les macrophages et la rate reconnaissent les érythrocytes endommagés ou sénescents, les phagocytent et les digèrent pour en extraire l'hème et le fer. L'hème est dégradé par l'action de l'hème oxygénase-1 (HO-1) pour libérer le fer. Les macrophages exportent le Fe^{2+} via la FPN, dans un procédé couplé par la réoxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} . L'héphaestine aide ces réactions en convertissant Fe^{2+} en Fe^{3+} , qui est alors lié à la transferrine (Tf). Dans la circulation, le fer est lié à la Tf. La Tf possède des récepteurs (TfR) qui interviennent dans le métabolisme du fer. (D'après Rochette *et al* [37] ; article intégré dans ce document de Thèse ultérieurement.)

DMT1 : co-transporteur Fe(II) -proton : divalent metal transporter 1 ; FPN : ferroportine ; HO-1 : hème oxygénase-1 ; Tf : transferrine ; TfR : récepteur de la transferrine.

3.3.1 Taux d'hepcidine

L'hepcidine a été découverte par trois laboratoires travaillant indépendamment [38–40]. Le laboratoire de Tomas Ganz a inventé le nom hepcidine, parce que le gène est fortement exprimé dans le foie (hep-) et fut découvert initialement pour posséder une activité microbicide (-cidine). Les effets bactériostatiques des protéines de liaison du fer avaient déjà été reconnus dans les années 1940. Il a été noté que des protéines spécifiques se liant au fer dans le blanc d'œuf (ovotransferrine) et dans le sang (transferrine) inhibaient la croissance de certaines bactéries ; effet facilement réversible en ajoutant du fer. Il existe des différences considérables entre les niveaux d'hepcidine en fonction de la méthode utilisée pour effectuer la mesure. Les valeurs absolues de concentrations de l'hepcidine diffèrent largement entre les méthodes [41].

À ce jour, les concentrations d'hepcidine sériques ont seulement été évaluées dans de petites séries de volontaires sains et de patients. Dans un échantillon bien phénotypé de la population générale (n = 2998), une étude récente a évalué les normes de référence stratifiées des concentrations d'hepcidine sérique selon l'âge et le sexe. Pour une même tranche d'âge, les concentrations d'hepcidine varient entre les hommes et les femmes. Les hommes ont une concentration stable d'hepcidine, même si une tendance non significative à une augmentation liée à l'âge de l'hepcidine sérique avait été précédemment rapportée dans une étude portant sur 65 hommes. Chez les femmes, la concentration d'hepcidine sérique est sensiblement plus élevée chez les femmes en post-ménopause qu'avant la ménopause. La concentration sérique médiane d'hepcidine chez les hommes est de 7,8 nM, tandis que chez les femmes, elle est de 4,1 nM pour les femmes de moins de 55 ans et de 8,5 nM pour les femmes âgées de 55 ans et plus [42]. Il n'y a actuellement aucune preuve pour soutenir une variation circadienne du taux d'hepcidine, qu'elle soit primaire ou secondaire. Cependant, des variations nycthémérales d'hepcidine existent probablement et seraient secondaires à des variations de l'apport en fer pendant la journée. La ferritine sérique possède la concentration la plus corrélée à la concentration sérique d'hepcidine [43]. Dans l'étude biomédicale Nijmegen, l'hepcidine et le ratio hepcidine/ferritine, qui reflète l'expression de l'hepcidine par rapport aux réserves en fer, étaient significativement associées à la présence de plaques d'athérome chez des femmes ménopausées [44]. Il a été émis l'hypothèse que des taux élevés d'hepcidine pourraient augmenter le risque cardiovasculaire en ralentissant ou en empêchant la mobilisation du fer par les macrophages.

3.3.2 Structure de l'hepcidine (figure 4)

L'hepcidine est synthétisée dans le foie sous forme d'une préprohormone de 84 acides aminés et est destinée à la voie de sécrétion par une séquence de ciblage N-terminal de 24 acides aminés. La prohepcidine en résultant, de 60 acides aminés, est ensuite traitée dans sa partie C-terminale pour donner un peptide mature actif de 25 acides aminés (~ 2,7 kDa) qui est sécrété dans la circulation. L'hepcidine humaine, contenant 25 acides aminés, contient quatre liaisons disulfure et l'hepcidine urinaire est riche en feuilles β . L'hepcidine a une forme d'épingle stabilisée par quatre ponts disulfure [45]. En conditions physiologiques, les parties tronquées N-terminales de l'hepcidine-20, -22 et -24 ont été retrouvées dans les urines, mais sont absentes ou existent à de très faibles concentrations dans le plasma. Ces isoformes de l'hepcidine, plus petites, se retrouvent principalement dans le plasma au cours de maladies qui sont associées à des concentrations d'hepcidine augmentées de manière significative, telles que la septicémie et l'insuffisance rénale. Les concentrations d'hepcidine sont augmentées chez les patients atteints de maladie rénale chronique. Cela pourrait être expliqué par l'inflammation, qui accompagne souvent l'insuffisance rénale. Cependant, même des patients sans inflammation significative ont des taux élevés d'hepcidine qui augmentent progressivement avec la sévérité de l'atteinte rénale. Comme l'hepcidine est filtrée, au moins partiellement, par les reins, la diminution de la fonction rénale contribue probablement à ce phénomène. Cette hypothèse est étayée par un certain nombre d'études qui ont montré une corrélation inverse entre le débit de filtration glomérulaire et la concentration sérique d'hepcidine [46]. **L'hepcidine-25 a deux fonctions, à la fois antimicrobiennes et de régulation du fer**, alors que l'hepcidine-22 et l'hepcidine-20 ont seulement une activité antimicrobienne. Il reste encore beaucoup à découvrir sur l'origine de ces petites isoformes. Au cours d'un stockage prolongé de plasma à température ambiante, il a été observé qu'une diminution de l'hepcidine-25 plasmatique était corrélée à l'augmentation des taux des isoformes d'hepcidine-24, -22 et -20. Cela signifie que tous les déterminants de la conversion de l'hepcidine-25 en ces petites isoformes inactives sont présents dans la circulation, ce qui pourrait contribuer à la suppression fonctionnelle de l'hepcidine-25, qui est significativement plus élevée chez des patients présentant une insuffisance rénale [41].

Dans une étude histologique conduite au Laboratoire, nous avons constaté que l'hepcidine était exprimée de manière prédominante dans les hépatocytes autour des veines portes dans le foie de souris. Fait intéressant, la coloration de la ferroportine a également été retrouvée de façon beaucoup plus abondante dans les zones périportales. Les modalités expérimentales sont détaillées dans la figure 5.

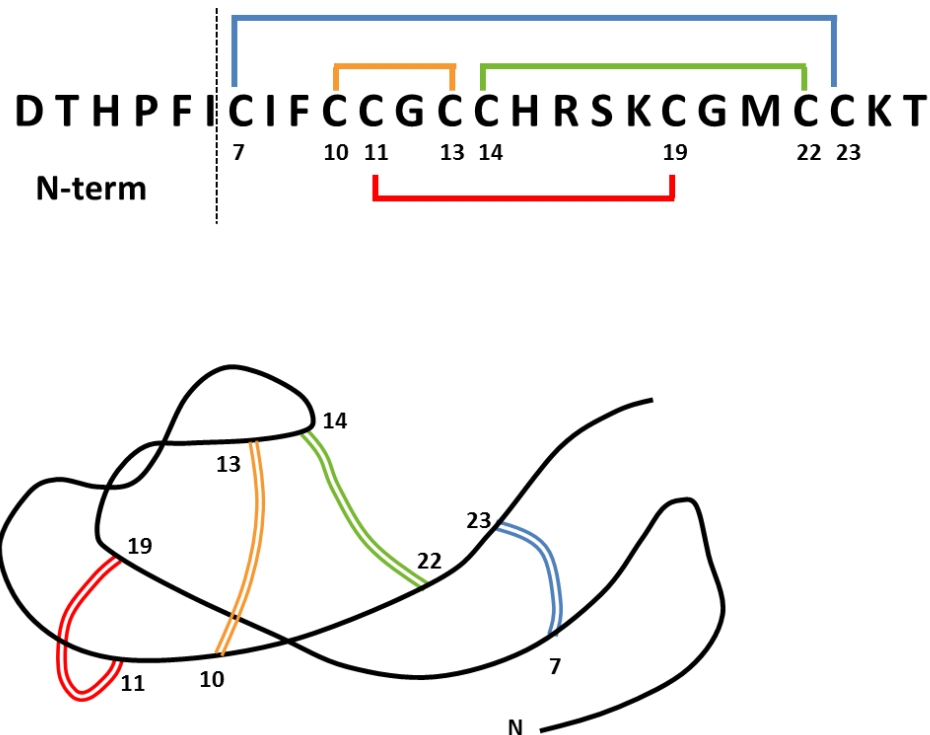


Figure 4 : Hepcidine : séquence d'acides aminés et structure. L'hepcidine est synthétisée sous forme d'une préprotéine de 84 acides aminés. Une pro-protéine convertase est responsable du clivage de la prohepcidine en hepcidine. Le peptide humain d'hepcidine contenant 25 acides aminés contient quatre liaisons disulfure. Le domaine N-terminal interagit avec la ferroportine. (D'après Rochette *et al* [37] ; article intégré dans ce document de Thèse ultérieurement.)

3.3.3 Métabolisme de l'hepcidine

La liaison aux protéines porteuses peut empêcher l'hepcidine circulante d'être librement filtrée [46]. L'hepcidine se lie préférentiellement à une glycoprotéine plasmatique, $\alpha 2$ -macroglobuline ($\alpha 2$ M) et à l' $\alpha 2$ M activée par la méthylamine ($\alpha 2$ M-MA). L' $\alpha 2$ M, qui est composée de sous-unités ayant des structures tétramériques chez les vertébrés, protège l'organisme d'infections diverses et, par conséquent, peut être utilisé comme un biomarqueur pour le diagnostic et le pronostic d'un certain nombre de maladies [47]. L'hepcidine se lie à la forme activée par la méthylamine de l' $\alpha 2$ M via 4 sites de liaison de haute affinité. En plus de leur liaison à l'hepcidine, les deux $\alpha 2$ M se lient à de nombreuses hormones et à des cytokines telles que l'IL-6. Le complexe hepcidine- $\alpha 2$ M activée et native diminue significativement l'expression de la FPN.

La clairance de l'hepcidine est supposée se produire via sa codégradation cellulaire avec la FPN sur ses sites d'action, et via l'excrétion par les reins. En raison de son faible poids moléculaire et de son volume spatial réduit, l'hepcidine non liée est probablement librement filtrée au niveau glomérulaire. Une production tubulaire locale possible d'hepcidine, de la même manière qu'une potentielle réabsorption tubulaire défectueuse d'hepcidine doivent également être prises en compte dans l'interprétation des taux urinaires d'hepcidine, comme un « miroir » des concentrations sériques d'hepcidine [48]. Récemment, il a été démontré une corrélation directe entre l'hepcidine-25 et la créatinine et une corrélation inverse avec le taux de filtration glomérulaire, suggérant que les taux d'hepcidine-25 augmentent à mesure que la fonction rénale se détériore, peut-être due à une diminution de la clairance rénale de l'hepcidine-25 [49].

3.3.4 Sources d'hepcidine extrahépatique

En dehors des hépatocytes, qui représentent la principale source d'hepcidine circulante, d'autres types de cellules telles que les macrophages, les adipocytes et les cellules cardiaques et gastriques expriment l'ARNm de l'hepcidine, mais à un niveau inférieur. Bien que l'expression extrahépatique de l'hepcidine soit de plus en plus reconnue, le rôle physiologique de l'hepcidine dans les tissus extra hépatiques n'est que partiellement compris. La production d'hepcidine extrahépatique pourrait jouer un rôle dans la régulation locale des taux de fer.

a. Macrophages

Les macrophages facilitent un débit rapide de fer et expriment fortement la FPN. Le transport du fer à travers les membranes vacuolaires jusque dans le cytoplasme des macrophages implique le transporteur DMT1, qui est spécifique pour le fer ferreux. La réduction du fer, qui est nécessaire, est catalysée par une réductase ferrique endosomale érythroïde, importante à l'utilisation du fer dans les érythrocytes.

Une séquence d'événements se déroule dans les lysosomes des macrophages quand ils phagocytent les érythrocytes sénescents. L'environnement hydrolytique du phagolysosome digère l'érythrocyte et son hémoglobine, en libérant l'hème, qui est ensuite dégradée par l'hème oxygénase-1 inducible (HO-1). Le fer est libéré pour le stockage cytoplasmique ou son export dans le plasma ; processus qui peuvent être particulièrement influencés par l'hepcidine. L'HO-1 agit dans les phagolysosomes, et le fer libéré est

transporté à travers la membrane du phagolysosome. Les macrophages sont des producteurs importants d'hepcidine, et à l'intérieur des macrophages, l'hepcidine est localisée dans des phagosomes contenant des mycobactéries où elle exerce son activité antimycobactérienne [50]. Dans les macrophages, c'est ici qu'a lieu la régulation des cytokines induites par les lipopolysaccharides (LPS), qui comprennent plusieurs composés endogènes tels que le TNF α , la famille des interleukine (IL) et les récepteurs, en particulier Toll-like (TLR) et IL-1R. L'expression d'hepcidine induite par les LPS *in vivo* est dépendante de TLR4, ce qui indique que la signalisation des TLR doit être importante pour l'activation de la production d'hepcidine dans les macrophages [51]. À la différence de l'expression d'hepcidine dans les hépatocytes, celle dans les macrophages est régulée positivement par les constituants de la paroi des bactéries GRAM + et GRAM - à travers TLR2 et TLR4 [50]. L'expression de l'hepcidine par les macrophages augmente suite à une infection bactérienne, et l'hepcidine diminue la libération du fer par les macrophages par voie autocrine et/ou paracrine. Bien que l'hepcidine circulante semble être un peptide antimicrobien relativement inefficace, il a récemment été proposé que l'hepcidine produite de façon endogène par les macrophages et localisée dans le phagosome pourrait jouer un rôle dans les défenses de l'hôte contre la tuberculose en causant des dommages structurels aux mycobactéries [52].

Dans les monocytes, la production autocrine d'hepcidine exerce une downregulation de l'expression de la FPN, contribuant ainsi à la séquestration de fer au sein de ces cellules [53]. L'élévation du fer intracellulaire médiée par l'hepcidine joue un rôle important dans la réponse des macrophages aux cytokines et donc dans les réponses immunitaires ultérieures [50]. Il a été proposé récemment que HMGB1 (High Mobility Group Box-1), qui est libéré à partir de cellules tumorales irradiées, agit comme un ligand endogène TLR4 [54]. HMGB1 est une protéine nucléaire qui peut être libérée dans le milieu extracellulaire de cellules immunes et non immunes en réponse à divers stimuli. HMGB1 extracellulaire contribue à la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes, comme le sepsis, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, l'insuffisance rénale chronique et le cancer. Une certaine interaction entre HO-1 et HMGB1 a été suggérée [55].

Dans la plaque d'athérome, le fer s'accumule préférentiellement dans les macrophages où il peut exercer des activités pro-oxydantes [56]. La physiologie de l'hepcidine suggère un mécanisme supplémentaire par lequel la déplétion de fer permettrait une protection vis-à-vis de la progression des lésions d'athérosclérose. Sans hepcidine, les macrophages conservent moins de fer. L'hepcidine pourrait favoriser la déstabilisation de plaque en empêchant la mobilisation du fer par les macrophages dans les lésions d'athérosclérose. Ce procédé peut être altéré et l'absence de cette mobilisation pourrait

entraîner une augmentation des charges cellulaires de fer, induisant ainsi la peroxydation lipidique, associée à la progression des cellules spumeuses [57].

Il a été récemment démontré qu'après l'exposition au fer, les macrophages différenciés (M2) changeaient complètement leur phénotype pour acquérir un phénotype orienté vers la libération du fer. La capacité de manutention du fer des macrophages M2 suggère qu'ils jouent un rôle de modulateur dans l'athérosclérose. L'hepcidine diminue la charge en fer dans les macrophages M2, tandis que l'expression de la FPT augmente. L'expression du gène HO-1 et de NRF2, qui sont des marqueurs du stress oxydant, augmente également de façon marquée dans les macrophages M2. Enfin, ces macrophages M2 sont hautement spécialisés dans le recyclage du fer en lien avec l'augmentation de l'expression de la FPN et de la diminution des taux d'ARNm d'hepcidine [58].

b. Adipocytes

Des données récentes suggèrent que les adipocytes sont capables de produire de l'hepcidine et que ce processus est probablement déclenché par des stimuli inflammatoires. L'ARNm de l'hepcidine et l'hepcidine sont présents dans le tissu adipeux, et les taux d'ARNm dans le tissu adipeux sont corrélés aux taux d'IL-6 et de CRP [59]. Le tissu adipeux exprime l'hepcidine à la fois au niveau de l'ARNm et au niveau de la protéine et cette expression est renforcée chez les patients obèses [60]. Un grand nombre de résultats soulignent que l'hepcidine peut jouer un rôle important dans l'hyposidérémie de l'inflammation chez les patients obèses. Il existe une relation étroite entre la carence en fer et de l'obésité. L'obésité semble être associée à des niveaux de fer plus faibles et à des réserves en fer plus élevées, reflétant une faible biodisponibilité du fer, avec une production d'hepcidine plus élevée et avec des taux plus élevés de marqueurs de l'inflammation associés à l'obésité [61]. Dans ce domaine, il a été rapporté que l'activine B était une nouvelle adipokine ayant un rôle dans l'équilibre énergétique et l'insulinorésistance associés à l'obésité [62]. La synthèse d'hepcidine peut être induite par des signaux inflammatoires comprenant l'activine B et la voie de signalisation des SMAD répondant à l'activine B [63,64].

Les interactions entre les cellules endothéliales et les lipides « régionaux » sont essentielles à une fonction vasculaire normale et sont perturbées dans les pathologies cardiovasculaires. Les adipocytes périvasculaires sont présents au niveau de l'adventice des vaisseaux sanguins. La sécrétion de médiateurs qui régulent l'inflammation est un trait caractéristique des adipocytes. Ces médiateurs peuvent être divisés en deux catégories : les adipokines et les cytokines. Le tissu adipeux sécrète de l'IL-6, de la leptine et de

l'adiponectine [65]. L'hepcidine est rapidement stimulée par les cytokines, dont l'IL-6. Chez des volontaires sains, une perfusion d'IL-6 recombinante a entraîné une augmentation du taux d'hepcidine urinaire de 7,5 fois et le fer sérique a diminué de 34% dans les 2 heures. Des anticorps neutralisant l'IL-6 ont été utilisés pour montrer qu'il y avait une voie de régulation de l'hepcidine médiée par l'inflammation dépendant de l'IL-6 [66]. Il a été suggéré que les adipocytes étaient des régulateurs clés du métabolisme dans tous les tissus, en raison de leur détection intégrée des réserves alimentaires et de la disponibilité du fer. Il existe maintenant des preuves montrant que les taux de fer dans les adipocytes régulent la transcription de l'adiponectine ainsi que les taux de protéines sériques [67]. Dans l'obésité, il y a des taux élevés de leptine qui semblent également contribuer au statut du fer observé dans l'obésité. La leptine est capable d'induire l'expression hépatique d'hepcidine via la voie de signalisation Janus kinase 2 (Jak2) / STAT3, qui est similaire à l'expression de l'hepcidine médiée par l'IL-6. La voie JAK2 / STAT3 est un mécanisme de réponse au stress qui entraîne une transduction des signaux provenant de la surface cellulaire vers le noyau, modulant ainsi l'expression du gène [68,69]. Certaines études ont rapporté que les concentrations d'hepcidine circulante et de leptine étaient plus élevées chez les patients obèses que chez les sujets de poids normal. Ces observations corroborent l'idée qu'un statut pauvre en fer, fréquemment observé chez les patients obèses, serait associé à l'inhibition de l'absorption du fer alimentaire médiée par l'hepcidine [70]. Comme nous l'avons déjà indiqué dans le mécanisme sous-tendant l'expression d'hepcidine régulée par le fer, plusieurs protéines qui participent à ce processus ont été identifiées. Parmi elles, l'hémojuvéline (HJV) joue un rôle particulièrement important. Une forme soluble d'hémojuvéline (s-HJV) existe dans le sang. Récemment, il a été rapporté que l'HJV était également exprimée dans les adipocytes, aux niveaux d'ARNm et de protéine. En outre, son expression d'ARNm est considérablement augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses et est corrélée positivement avec les taux d'expression d'hepcidine [71].

c. Myocarde

Des taux de fer élevés, de même que les dommages cellulaires et tissulaires liés au fer sont à l'origine du développement d'un certain nombre de pathologies cardiaques, comme la cardiomyopathie restrictive par surcharge en fer, l'infarctus du myocarde ainsi que les maladies coronariennes [72,73]. Les cellules myocardiques ont la capacité d'accumuler le fer lié à la transferrine via le récepteur à la Tf (TfR) et le fer non lié à la Tf probablement via le canal calcique L-type Ca^{2+} channel. L'export de fer médié par la FPN est dépendant de l'activité ferroxydase des oxydases à centre cuivre, de la céruloplasmine et de l'héphaestine

[74]. Il a également été démontré que l'hepcidine est exprimée dans le cœur ; cela signifie que cette protéine peut ainsi jouer un rôle dans l'homéostasie du fer au niveau du cœur. *In vitro*, il a été démontré que l'hepcidine est capable de se lier avec la FPN, de l'internaliser et de la dégrader et ainsi diminuer l'export de fer à partir des cellules myocardiques [75,76].

Dans notre Laboratoire, nous avons montré, lors de notre étude histologique, que l'hepcidine était présente au niveau du myocarde. Une telle étude histologique n'avait pas encore, à notre connaissance, fait l'objet d'une approche spécifique. La protéine est exprimée de manière diffuse dans le myocarde (figure 5). Récemment, l'expression d'hepcidine myocardique a été étudiée dans différentes conditions : myocardite auto-immune expérimentale chez le rat (MAE), infarctus du myocarde chez le rat et dans la myocardite chez l'homme. L'ARNm de l'hepcidine est modérément exprimé dans le cœur de rats normaux, mais l'expression d'ARNm d'hepcidine dans le cœur de rats avec une MAE était nettement supérieure à celle des témoins. Chez l'homme, le taux d'ARNm d'hepcidine/cytochrome oxydase des cœurs atteints de myocardite était significativement plus élevé que dans les cœurs sans myocardite. Enfin, l'expression d'hepcidine est plus fortement influencée par les conditions environnementales locales que par les conditions systémiques ; les niveaux d'ARNm d'hepcidine sont corrélés à ceux de l'ARNm de l'IL-6 [77]. Dans les cœurs de rats hypoxiques, les niveaux d'expression d'hepcidine étaient plus élevés dans la zone bordante [76], traduisant l'importance de l'hepcidine locale en terme de réponse au processus inflammatoire.

Une autre condition à l'origine de l'expression de l'hepcidine est l'inflammation associée aux pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque. L'augmentation des taux de cytokines proinflammatoires et l'anémie sont fréquentes chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Il est possible que l'augmentation du niveau des cytokines inflammatoires dans le cœur puisse induire l'expression du gène de l'hepcidine dans les cardiomyocytes [78]. En utilisant des modèles transgéniques, il apparaît que l'hepcidine pourrait jouer, au niveau du cœur, un rôle dans la régulation de l'homéostasie du fer sur un mode autocrine et paracrine [79].

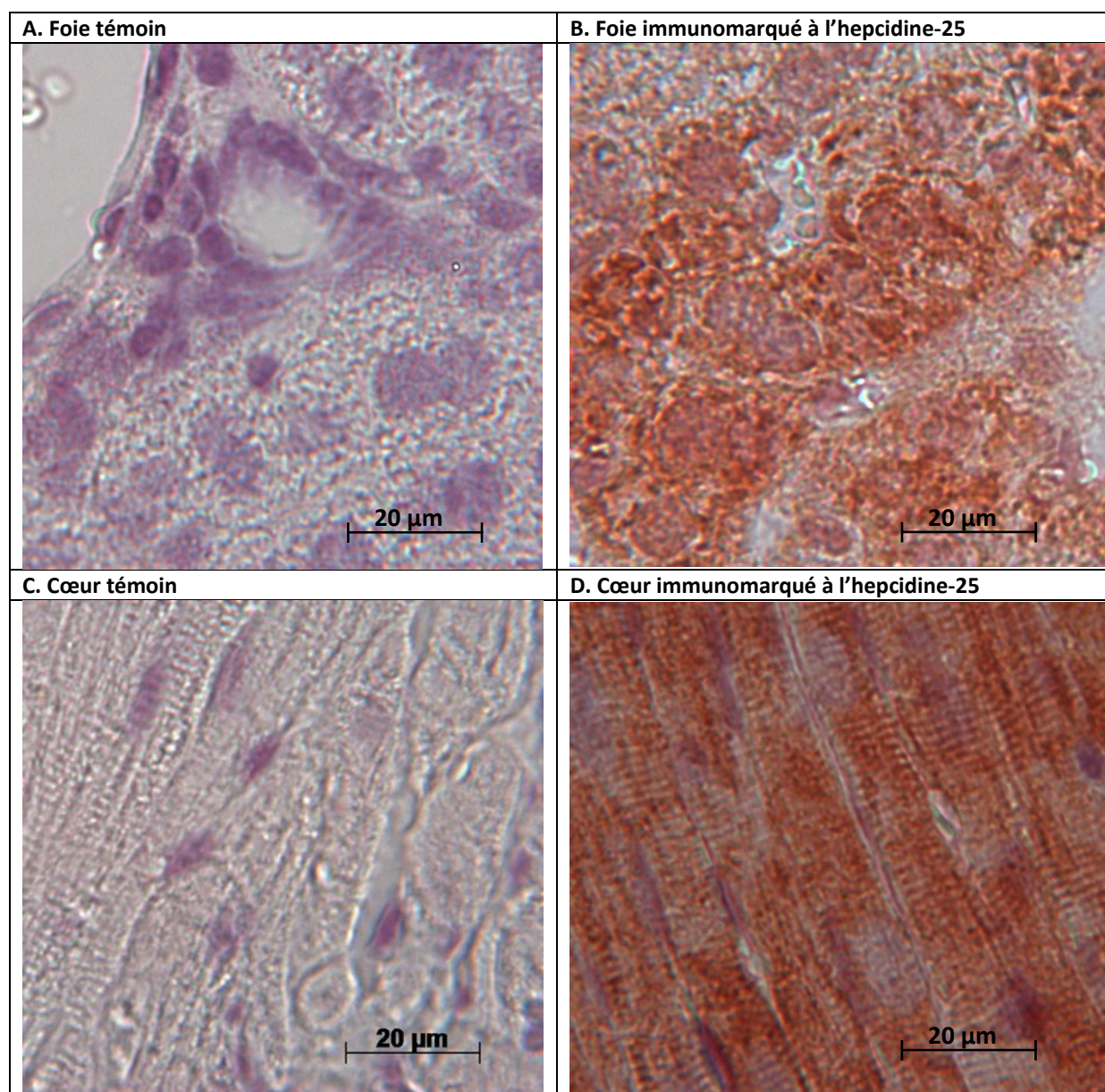


Figure 5 : Histologie : Expression d'hepcidine dans le foie et le cœur.

Coupes immunocolorées représentant l'expression d'hepcidine-25 dans des sections de foie et de cœur. Après fixation dans le formol et déshydratation dans l'alcool, les échantillons ont été déposés dans de la paraffine. Des lames de 5 μm ont été coupées et immunocolorées pour l'hepcidine. Brièvement, après extraction de l'antigène (tampon citrate pH 6), les lames ont été incubées avec H_2O_2 à 3% dans du TBST (2 x 8 minutes) et saturées (Impress Kit de sérum, additionné de 3% de BSA dans du TBST) pendant 20 minutes. Elles ont été incubées avec des anticorps anti-hepcidine (1/50, Abcam - ab30760) pendant toute une nuit à 4°C. Après 3 rinçages dans du TBST, les lames ont été incubées avec une solution Impress Kit (Vector Lab - MP7401) pendant 30 minutes. Après révélation avec le kit Nova Red (Vector Lab - SK4800), coloration à l'inverse dans de l'hématoxyline. (D'après Rochette *et al* [37] ; article intégré dans ce document de Thèse ultérieurement.)

d. Estomac

Compte tenu du rôle bien établi de l'estomac et de l'intestin dans le métabolisme du fer, il est tentant de spéculer que le système de l'hepcidine soit impliqué dans les fonctions de régulation et antimicrobiennes du fer. Une étude récente a montré que l'hepcidine était exprimée dans les cellules pariétales gastriques [80]. Chez la souris et le rat, des analyses en RT-PCR quantitative ont révélé une expression abondante d'hepcidine dans le fundus ainsi qu'une expression moins importante dans l'antrum. L'influence de l'hepcidine sur la sécrétion d'acide gastrique et sur la régulation de la production d'acide gastrique peut également contribuer à l'homéostasie locale du fer. L'hepcidine est également présente dans la bile [81]. Le taux d'hepcidine augmente après un traitement par inhibiteurs de la pompe à protons et diminue après injection d'histamine ; ces résultats suggèrent que la signalisation de l'hepcidine sert de mécanisme pour maintenir la sécrétion d'acide gastrique stable dans des conditions normales et pathologiques telles que l'inflammation. En effet, en cas d'inflammation, l'absorption du fer diminue et les mécanismes à l'origine de la diminution d'absorption du fer par l'intestin ont peu été étudiés au niveau cellulaire. Un traitement par TNF- α diminue l'absorption intestinale du fer, mais le TNF semble médier l'hyposidérémie indépendamment de l'hepcidine [82]. Une étude a recherché si l'hepcidine était impliquée dans l'anémie liée au cancer colo-rectal et si elle pouvait jouer un rôle dans la carcinogénèse. L'hepcidine apparaît être exprimée par des cellules néoplasiques colorectales et pourrait donc représenter un nouveau mécanisme de signalisation oncogénique [83].

3.3.5 Interaction hepcidine-ferroportine (FPT)

L'interaction de l'hepcidine avec la FPN fournit un mécanisme pour coordonner l'entrée du fer dans le plasma avec son utilisation et son stockage. Les progrès récents dans la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation de l'hepcidine, en particulier concernant sa relation avec la FPN et ses cibles, ont été permis par l'étude de patients présentant une surcharge en fer d'origine génétique comme l'hémochromatose. Ces patients présentent des mutations dans les gènes codant pour différentes protéines et ont de faibles taux d'hepcidine par rapport à leurs réserves en fer [84].

La principale cible de l'hepcidine est la FPN, protéine transmembranaire responsable de l'export de fer des cellules au plasma [66]. La protéine FPN est codée par le gène SLC40A1 situé sur le chromosome 2 (2q32). Des mutations du gène de la FPN ont été identifiées dans différentes ethnies et certaines de ces mutations sont associées à une surcharge en fer autosomique dominante [85]. A ce jour, 45 mutations ont été décrites dans le gène SLC40A1, chez des personnes d'origine ethnique différente, et ce nombre est appelé à augmenter à mesure que plusieurs autres mutations seront découvertes. Dans la majorité des cas, le polymorphisme de la FPN est le résultat d'une mutation faux-sens [86]. L'hepcidine se lie à un domaine hautement conservé sur une boucle extracellulaire de FPN. Cette boucle qui interagit avec l'hepcidine a été identifiée à partir de l'observation selon laquelle la mutation Cys326 dans cette boucle avait pour effet que la FPN devienne résistante à sa liaison avec l'hepcidine. Il a été proposé que le groupement thiol libre du résidu Cys326 formait une liaison disulfure avec un des résidus de cystéine de l'hepcidine [87]. La concentration de FPN à la surface des cellules dépend de son taux de synthèse, de l'interaction hepcidine/FPN, du taux d'internalisation et du taux de dégradation cellulaire. Une fois internalisée, la FPN est déphosphorylée puis ubiquitinylée. L'incapacité à ubiquitinyler la FPN n'empêche pas l'internalisation induite par l'hepcidine, mais inhibe la dégradation de la FPN. La FPN ubiquitinylée est ensuite dégradée dans l'endosome [88].

Il a été démontré que la kinase responsable de la phosphorylation de la FPN est JAK2. La liaison de JAK2 à la FPN est très forte et nécessite l'hepcidine pour se lier à la fois aux deux monomères du dimère FPN et pour être capable d'activer JAK2 [89]. Des études ont suggéré qu'un échange thiol-disulfure pouvait se produire au cours de la liaison de l'hepcidine à la FPN [90]. Une fois lié, JAK2 est autophosphorylé puis il phosphoryle la FPN, conduisant à l'internalisation de la FPN [89].

En résumé, l'excès de fer induit une augmentation de la concentration d'hepcidine, ce qui entraîne l'internalisation et la dégradation de la FPN. Le fer intracellulaire est ensuite séquestré par liaison à la ferritine à l'intérieur des cellules, ce qui limite l'augmentation de la

sidérémie et la saturation de la Tf. Coupler l'internalisation de la FPN au taux d'hepcidine génère une boucle homéostatique qui régule les taux de fer plasmatiques et la distribution tissulaire du fer.

3.3.6 L'hepcidine, maître régulateur du métabolisme du fer

Lorsque les réserves en fer sont suffisantes ou élevées, le foie produit l'hepcidine, qui circule jusqu'à l'intestin grêle. Des molécules de FPN sont exprimées sur les membranes basolatérales des entérocytes, et elles transportent le fer des entérocytes à la transferrine plasmatique. L'hepcidine entraîne l'internalisation de la FPN bloquant ainsi la voie pour le transfert de fer des entérocytes ou des macrophages au plasma. Les macrophages exportent le Fe^{2+} à partir de leur membrane plasmique via la FPN, via un processus couplé à la réoxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} par la céruloplasmine et suivi par le chargement de Fe^{3+} sur la Tf. Le fer exporté est balayé par la Tf, qui maintient le Fe^{3+} dans un état redox inerte et le délivre aux tissus. Le ferroxydase contenant du cuivre, l'héphaestine, apporte son aide en convertissant le Fe^{2+} en Fe^{3+} , qui est ensuite lié à la Tf.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le fer entre dans la cellule à partir de la circulation sanguine à travers un complexe où il est lié à la Tf ; ce complexe se lie aux récepteurs TfR1 et TfR2 de la membrane plasmique. Il y a ensuite endocytose de ce complexe [91–93]. En conditions physiologiques, la Tf plasmatique est hyposaturée (de l'ordre de 30%) et affiche une très forte capacité de fixation du fer.

L'expression de l'axe hepcidine-FPN est régulée par différents facteurs, exogènes et endogènes. Au niveau moléculaire, les voies de signalisation impliquées dans cette régulation ne sont pas entièrement connues. L'effet de la vitamine D sur l'axe hepcidine-FPN suggère qu'un statut faible en vitamine D peut être un facteur contribuant à l'anémie des maladies chroniques du rein, qui se caractérisent par un déficit en vitamine D, qui est lui-même étroitement associé à la survenue des complications de la maladie rénale chronique. Récemment, une étude a montré pour la première fois que la vitamine D était un puissant régulateur de l'hepcidine, à la fois dans les monocytes et les hépatocytes [94]. Dans des conditions de carence en vitamine D, une synthèse élevée d'hepcidine par les hépatocytes peut augmenter les concentrations intracellulaires et systémiques d'hepcidine et ainsi diminuer l'expression membranaire de la FPN dans ces cellules.

Des études ont rapporté une diminution de l'expression de l'hepcidine en réponse à l'hypoxie. Cependant, la pertinence physiologique de l'hypoxie et de son impact sur la

régulation de l'hepcidine restent incertains et controversés. *In vivo*, l'hypoxie pourrait également supprimer l'hepcidine indirectement à travers l'érythropoïèse et une meilleure utilisation du fer. Les facteurs induits par l'hypoxie, HIF (hypoxia-inducible factor) peuvent toutefois contribuer à la suppression de l'hepcidine indirectement par l'intermédiaire de ses effets sur la décomposition de l'hémojuvénine [95]. En outre, HIF1 α et 2 α augmentent l'absorption intestinale du fer, l'absorption du fer dans les progéniteurs érythroïdes et la synthèse de l'hème, et pour supprimer la production de l'hepcidine, assurant ainsi un approvisionnement adéquat en fer pour l'érythropoïèse [96,97]. Dans l'étude HIGHCARE, étude en haute altitude réalisée de 3400 à 5400 m au-dessus du niveau de la mer, les modifications induites par l'exposition aiguë et chronique à l'hypoxie hypobare sur les indices de fer sérique, l'EPO, l'IL-6, et les niveaux d'hepcidine ont été étudiées. Les taux d'hepcidine diminuent dans les 40 heures après l'exposition à l'hypoxie aiguë à 3400 m et atteignent le niveau le plus bas à 5400 m. Cette baisse est associée à une diminution rapide du taux de ferritine sérique. La forte corrélation entre les taux de ferritine sérique et d'hepcidine au cours de l'étude indiquent que le fer lui-même ou la cinétique de l'utilisation du fer en réponse à l'hypoxie peuvent entraîner une downregulation de l'hepcidine [98].

Pour la régulation de l'hepcidine, le réticulum endoplasmique (RE) peut jouer un rôle à l'égard de l'inflammation. La réponse inflammatoire aiguë est liée au stress du RE, état associé à la perturbation de l'homéostasie du RE et à l'accumulation de protéines mal repliées ou non repliées dans le RE. Globalement, il apparaît que la régulation de l'hepcidine par le stress du RE relie la réponse cellulaire impliquée dans le contrôle-qualité de la protéine de l'immunité innée et de l'homéostasie du fer. Apparemment, l'hepcidine réagit non seulement aux stimuli extracellulaires, tels que les fluctuations de fer et les cytokines, mais aussi aux signaux de stress à l'intérieur de la cellule [99,100].

Parmi les médiateurs endogènes, le monoxyde de carbone (CO) et le NO semblent jouer un rôle dans cette régulation. Le CO supprime l'expression d'hepcidine induite par l'IL-6 et les agents du stress du RE en inhibant les transducteurs du signal, les activateurs de la phosphorylation transcriptionnelle (STAT-3) et la maturation du CREBH (cyclic AMP response element-binding protein-H), protéine liée à l'élément de réponse à l'AMPc. L'induction du stress du RE chez la souris entraîne une augmentation de l'hepcidine hépatique et sérique [101]. L'action anti-inflammatoire du CO est impliquée dans ces différents processus [23].

Concernant le NO , comme nous l'avons précisé précédemment, il existe des interconnexions entre l'homéostasie du fer et le NO . La régulation de la synthèse de la ferritine par le fer est principalement due à la régulation post-transcriptionnelle au travers de

la liaison de IRP1 et IRP2 à IRE et à l'expression de FPN NO -induite [31,32]. Plusieurs études rapportent un effet synergique potentiel entre NO et H_2S dans le contrôle de diverses réponses biologiques de la fonction vasculaire. Les fonctions cytoprotectrices de faibles concentrations de H_2S sont comparables à celles du NO . Le NO et l'hydrogène peuvent réagir rapidement avec des métalloprotéines telles que les clusters fer-soufre [102,103].

3.3.7 Régulation de l'expression d'hépcidine

L'expression de l'hépcidine est dépendante de l'opposition des voies de signalisation : les effets combinés des différentes voies détermineront les taux d'hépcidine. Les facteurs systémiques qui modifient l'expression de l'hépcidine, tels que l'anémie ou l'inflammation, sont bien établis. Cependant, le mécanisme par lequel la production d'hépcidine est régulée au niveau moléculaire reste encore incertain.

HFE, le gène muté dans la forme la plus commune d'hémochromatose héréditaire, joue un rôle dans la surveillance du statut du fer de l'organisme et dirige ensuite une réponse adaptée d'hépcidine. La protéine HFE interagit avec TfR1 sur un site qui chevauche le site de liaison pour la Tf. Une corrélation étroite entre les taux de Tf et l'expression hépatique d'ARNm d'hépcidine a été démontrée après hémolyse [104]. De plus, lorsque la Tf se lie à TfR2, les voies de signalisation ERK1/ERK2 et p38 MAP-kinase sont activées, induisant ainsi l'expression d'hépcidine [105]. L'inflammation stimule l'expression de l'hépcidine, qui à son tour provoque l'hyposidérémie associée aux épisodes inflammatoires. Bien que plusieurs cytokines pro-inflammatoires augmentent l'expression de l'hépcidine, l'IL-6 est la plus étudiée dans ces processus. Elle stimule la transcription d'hépcidine à travers la voie de signalisation STAT3. Plusieurs ligands aux récepteurs Toll-like d'origine microbienne (TLR) peuvent induire l'expression de l'hépcidine, peut-être par l'induction de l'IL-6 [106]. Le facteur récemment décrit dans la voie de régulation de l'expression d'hépcidine est la voie BMP/SMAD (BMP, bone morphogenetic protein ; SMAD, contraction de Sma et Mad). Il a également été démontré que la dorsomorphine, un inhibiteur sélectif de la phosphorylation de SMAD BMP-sensible, bloquait l'induction de l'hépcidine médiée par l'IL-6 [107]. La régulation de l'expression d'hépcidine par le BMP et l'IL-6 peut impliquer des transferts de signal au niveau de la transduction du signal. Ces effets sont influencés par le microenvironnement cellulaire. BMP6 est le régulateur endogène spécifique de l'hépcidine [108]. Des mutations dans les gènes codant pour le ligand BMP6, le corécepteur au BMP HJV, et la molécule de signalisation intracellulaire SMAD4 sont associées à la suppression de l'expression de l'hépcidine. Ces actions sont associées à une surcharge en fer tissulaire.

Il est maintenant bien établi que la voie de signalisation BMP6-HJV-SMAD joue un rôle majeur dans la régulation de l'hepcidine et dans l'homéostasie du fer [109]. La stimulation par BMP6 et/ou par le fer induit une augmentation de l'activité de la voie BMP6-HJV-SMAD, éventuellement par le biais d'un mécanisme impliquant HFE et TfR2, conduisant à la liaison des complexes SMAD aux éléments sensibles au BMP (BMP-REs) sur le promoteur de l'hepcidine et à l'upregulation de la transcription de l'hepcidine. Les BMPs agissent en se liant à des complexes de récepteurs de deux de type I et 2 de type II (BMPRI et BMPRII) et en modulant l'expression de gènes cibles à travers différentes voies de transduction du signal. La signalisation à travers les protéines SMAD est maintenant bien caractérisée et la phosphorylation de récepteurs des protéines SMAD permet la formation d'un complexe hétéromère qui stimule l'expression de nombreux gènes cibles, comprenant celui de l'hepcidine [110].

Il existe des interactions importantes entre ces différentes voies et la participation d'autres membres à ce réseau de régulation ; le rôle du GDF-15 (growth differentiation factor-15) a été rapporté dans plusieurs tissus. L'expression du GDF-15 est associée au stress cellulaire et à l'apoptose [111]. Le GDF-15 est exprimé par les érythroblastes matures, dans des maladies dues à une érythropoïèse de plus en plus inefficace telles que la thalassémie. GDF-15 réprime la sécrétion d'hepcidine [111,112]. L'expression érythroblastique d'une deuxième molécule nommée TWSG1 (Twisted Gastrulation Gene 1) est un potentiel régulateur érythroïde de l'hepcidine. TWSG1 interfère avec l'expression d'hepcidine médiée par BMP et peut agir avec GDF-15 pour déréguler l'homéostasie du fer dans la thalassémie. Les voies de signalisation SMAD sont impliquées dans les actions cellulaires de GDF-15 et de TWSG1 [113].

Récemment, plusieurs études ont démontré que les œstrogènes régulent l'expression de l'hepcidine via la voie de signalisation GPR30-BMP6, indiquant que les œstrogènes diminuent l'absorption du fer dans l'intestin. La protéine GPR30 est localisée à la fois au niveau de la membrane plasmique et au niveau du RE. Elle module l'action des œstrogènes en tant que récepteur de stéroïde. De nouvelles données suggèrent que les œstrogènes participent directement à la régulation de l'expression hépatique de l'hepcidine [114].

L'expression d'hepcidine dans les macrophages est régulée principalement par les récepteurs TLR2 et TLR4. La régulation autocrine de l'accumulation de fer dans les macrophages par l'hepcidine peut affecter les niveaux de production de cytokines pro-inflammatoires. L'upregulation de l'hepcidine médiée par TLR2 et TLR4 a été complètement annulée dans les macrophages MyD88 ^{-/-}, ce qui suggère que la voie de signalisation MyD88 est nécessaire pour l'induction d'hepcidine par les TLRs [50].

Toutes les observations cliniques s'orientent vers des voies de régulation sensibles au fer et suggèrent que le stress oxydant pourrait être impliqué dans la signalisation de l'IL-6 pour la production d'hépcidine. Au cours d'un processus inflammatoire, les cellules sont exposées à des concentrations constamment élevées d'anions superoxydes et de H_2O_2 . Cela exige une régulation stricte de l'homéostasie du fer pour éviter des lésions tissulaires par des réactions de Fenton. Dans les neutrophiles et les macrophages, la NADPH oxydase NOX2 génère des anions superoxydes qui sont convertis ensuite en H_2O_2 par les superoxydes dismutases (SODs) [115]. Récemment, il a été montré que de très faibles concentrations de H_2O_2 étaient suffisantes pour induire une puissante upregulation d'hépcidine au sein des cellules hépatiques néoplasiques et des hépatocytes primaires, H_2O_2 agissant en synergie avec d'autres inducteurs de l'hépcidine, tels que l'IL-6. L'effet de H_2O_2 sur l'hépcidine est principalement médié par STAT3, qui est la voie de signalisation classique dans l'inflammation pour la régulation de l'hépcidine [116].

3.4 Rôle de l'érythroferrone

En cas de stimulation de l'érythropoïèse, que ce soit lors d'une hémorragie, d'une hémolyse ou de toute autre condition déclenchant une érythropoïèse de stress, la synthèse de l'hémoglobine, et donc la consommation en fer par la moelle osseuse, sont augmentées afin de normaliser rapidement le nombre de globules rouges et la capacité de transport de l'oxygène. Pour faire face à ce besoin accru en fer, la synthèse d'hépcidine diminue pour stabiliser la ferroportine à la surface des cellules qui l'expriment, conduisant à l'augmentation de l'absorption du fer alimentaire au niveau du duodénum et du relargage du fer par les macrophages et les hépatocytes. Cette connexion entre érythropoïèse et métabolisme du fer était jusqu'à ces derniers mois mal caractérisée. Il était simplement et communément admis qu'un facteur inconnu, historiquement désigné sous le nom de « régulateur érythroïde », contrôlait ce processus [117]. Ce lien entre l'augmentation de l'érythropoïèse, la modulation de la production d'hépcidine et la disponibilité en fer vient d'être identifié par le Dr Léon Kautz, de l'équipe du Dr Tomas Ganz, à l'Université de Californie, Los Angeles, caractérisant ce signal érythropoïétique et lui donnant le nom de régulateur érythroïde ERYTHROFERRONE (ERFE).

L'érythropoïèse est régulée principalement par l'érythropoïétine (EPO), facteur de croissance indispensable à la survie et à la prolifération des précurseurs érythroïdes. En cas d'anémie ou d'hypoxie, la sécrétion rénale d'EPO augmente pour stimuler l'érythropoïèse.

Parallèlement, dans ce même contexte d'anémie ou d'hypoxie, la production d'hepcidine par le foie diminue, permettant ainsi l'augmentation de l'absorption intestinale de fer et sa libération des cellules au milieu plasmatique pour qu'il soit disponible à l'érythropoïèse. Jusqu'à présent, les données de la littérature suggéraient que la régulation de l'hepcidine n'était pas directement dictée par l'EPO, mais impliquait un facteur rapidement produit par les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse, puis sécrété dans la circulation pour réprimer la production d'hepcidine afin d'augmenter la quantité de fer disponible pour la synthèse de nouveaux globules rouges par la moelle osseuse [118–120]. Plusieurs candidats ont été proposés comme régulateurs érythroïdes potentiels (GDF15 [growth differentiation factor 15], TWSG1 [twisted gastrulation BMP signaling modulator 1],...), mais leur importance physiologique dans cette régulation reste à confirmer [5].

L'érythroferrone, qui présente une similitude de structure avec la MYONECTINE, est une hormone appartenant à la famille des protéines C1q/TNF (tumor necrosis factor) et a récemment été identifiée comme le facteur régulateur érythroïde de l'hepcidine [5]. En effet, en réponse à l'EPO, la synthèse d'ERFE est induite rapidement dans les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse et de la rate via la voie de signalisation JAK2/STAT5. Cela a été démontré dans les travaux de l'équipe de Ganz et Kautz qui ont précisé que les souris invalidées pour ERFE étaient incapables de réprimer l'expression de l'hepcidine après une phlébotomie ou après administration d'EPO. Lors d'une demande accrue de l'érythropoïèse, l'ERFE apparaît donc être essentielle à la diminution rapide de l'expression de l'hepcidine. A noter que ces souris *Erfe*^{-/-} avaient des paramètres hématologiques normaux, ce qui suggère qu'ERFE n'est pas un acteur majeur de l'érythropoïèse en conditions physiologiques normales, mais que son rôle serait restreint aux conditions d'érythropoïèse de stress. *In vivo*, l'injection directe d'ERFE ou sa surexpression à l'aide d'un vecteur lentiviral a confirmé son action suppressive sur l'expression d'hepcidine. Les travaux de cette équipe suggèrent également que l'ERFE agirait directement sur les hépatocytes pour réprimer la transcription de l'hepcidine. Le récepteur de l'ERFE ainsi que la voie de signalisation qu'il induit restent encore à identifier.

Dans un contexte plus large, l'érythroferrone est exprimée dans le muscle squelettique où elle est reconnue comme une protéine C1q/TNF (CTR15 pour C1q/TNF-related protein), appelée myonectine ou CTR15, qui régule le métabolisme lipidique [121]. La myonectine, qui est induite après une période de jeûne par la réalimentation ou l'administration de nutriments, agit à travers la voie de signalisation PI3-K/Akt/mTOR pour inhiber l'autophagie des hépatocytes, suggérant un rôle possible de cette voie dans la régulation de l'hepcidine [122].

Dans un modèle murin de bêta-thalassémie, l'ERFE pourrait agir comme répresseur de l'hepcidine et désormais des études sont nécessaires chez l'homme afin de confirmer le rôle de l'ERFE en tant que régulateur érythroïde responsable de la diminution d'hepcidine et de la surcharge martiale chez ces patients. Les perspectives offertes par l'identification de ce nouveau régulateur sont celles d'une nouvelle cible thérapeutique. En inhibant l'ERFE, on pourrait espérer augmenter la production d'hepcidine chez des patients atteints d'anémie héréditaire avec surcharge en fer ; à l'inverse, en l'administrant chez des sujets atteints d'anémie associée à des maladies inflammatoires, des affections rénales ou des cancers, on pourrait espérer une correction du déficit en fer lié à un excès d'hepcidine.

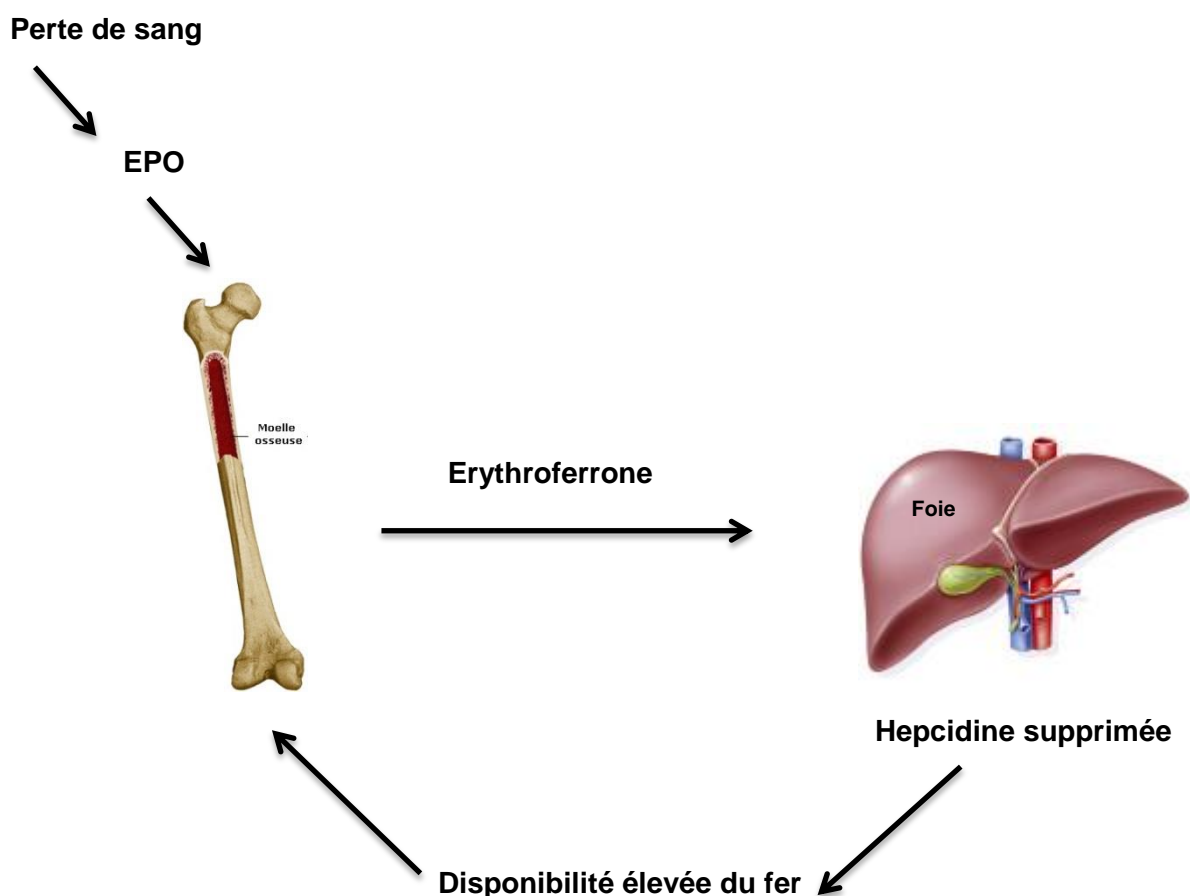


Figure 6 : Axe moelle osseuse-foie du métabolisme du fer. Une perte de sang déclenche, via l'érythropoïétine, une augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'érythroferrone dans la moelle osseuse. Celle-ci réprime l'expression de l'hepcidine dans le foie, ce qui entraîne une augmentation de la disponibilité du fer (absorption intestinale élevée et augmentation de la libération depuis les réserves internes).

4. Fer et stress oxydant

4.1 Les métaux de transition et le stress oxydant

Les métaux de transition, comprenant le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le sélénium, jouent un rôle prédominant dans le métabolisme cellulaire. Le fer et le cuivre participent à la réaction de Fenton comme donneurs d'électrons à du peroxyde d'hydrogène, induisant la production d'une puissante ERO, le radical hydroxyle. Le fer est impliqué dans des réactions catalytiques du fait de sa réactivité redox, ce qui lui permet de faire la transition entre un état réduit ferreux et un état ferrique oxydé [123]. Dans le corps, un excès ou la carence d'ions métalliques peuvent potentiellement inhiber les fonctions des protéines, interférer avec le repliement correct des protéines ou, dans le cas du fer ou de cuivre, promouvoir le stress oxydant [124]. Le maintien des taux cellulaires en fer nécessite des mécanismes précis pour réguler son absorption, son stockage et son export. Plusieurs pathologies cardiovasculaires sont liées à un problème de régulation de l'homéostasie du fer. La quantité de fer absorbée par les entérocytes dépend des besoins de l'organisme. Un mécanisme impliqué dans l'homéostasie du fer est régulé non seulement par l'état du fer cellulaire, mais aussi par les ERO dans les cellules qui déclenchent des mécanismes de défense contre la toxicité du fer et le stress oxydant catalysé par le fer.

Comme le fer, le cuivre est un métal redox-actif qui peut passer d'un état Cu^{1+} réduit à un état oxydé Cu^{2+} . Le cuivre est essentiel à de nombreux processus cellulaires, y compris pour les défenses antioxydantes et l'oxydation du fer. Les taux de cuivre cellulaires doivent également être étroitement contrôlés, puisque l'accumulation de cuivre peut conduire au stress oxydant [125]. Le manganèse est un métal de transition et un co-facteur essentiel aux enzymes antioxydantes mitochondriales MnSOD, ainsi qu'à d'autres enzymes comme l'arginine synthase. La MnSOD semble être un contributeur important aux fonctions cardiaques mitochondriales et métaboliques, en réduisant le stress oxydant mitochondrial [126]. Le sélénium est un élément nutritif essentiel pour les mammifères car il est nécessaire à l'activation de différentes enzymes antioxydantes, comme la glutathion peroxydase (GPx) et la thiorédoxine réductase (TrxR). Huit isoformes différentes de la GPx (GPx 1-8) ont été identifiées chez l'homme. GPx1 est l'isoforme la plus abondante et est présente dans le cytoplasme de nombreux tissus où elle réduit le peroxyde d'hydrogène en eau [127]. L'homéostasie redox est essentielle à la viabilité cellulaire, au fonctionnement cellulaire normal et est régulé par deux grands systèmes antioxydants cellulaires, le système du glutathion et le système de la thiorédoxine. La thiorédoxine réductase (TrxR) réduit son principal substrat Trx, mais peut également transférer des électrons à des composés de faible poids moléculaire. Les peroxyrédoxines dépendantes de la thiorédoxine (PRX)

représentent la première ligne de défense contre les ERO et le ONOO⁻ et régulent la transduction du signal médiée par H₂O₂. H₂O₂ peut agir soit comme un oxydant destructif, soit comme un second messenger [128].

4.2 Rôle des mitochondries dans le métabolisme du fer

Les mitochondries représentent une réserve significative de fer dans les cellules, puisque le fer est nécessaire au fonctionnement des complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le mécanisme pour le trafic intracellulaire du fer vers les mitochondries est incomplètement compris. Il est admis que les cellules utilisent du fer dans les mitochondries pour la synthèse de l'hème et des clusters fer-soufre (Fe-S). Le flux séquentiel d'électrons dans la chaîne respiratoire, à partir d'un substrat potentiel réduit d'O₂, est médié par des cofacteurs redox liés aux protéines. Dans la mitochondrie, l'hème, de même que la flavine, le complexe fer-soufre, et des cofacteurs du cuivre, régulent ce flux de multiples électrons [129]. L'insertion d'un atome de fer ferreux dans le macrocycle de porphyrine par une ferrochélatase produit l'hème. Il est maintenant bien démontré que les mitochondries ont un rôle crucial dans le métabolisme du fer en synthétisant l'hème, en assemblant les protéines fer-soufre (Fe/S), et en participant à la régulation du fer cellulaire [130]. Les clusters Fe-S sont d'importants cofacteurs à de nombreuses protéines impliquées dans le transfert d'électrons et dans les processus métabolique et de régulation [131].

La chaîne respiratoire repose sur des systèmes d'oxydo-réduction contenant du fer sous la forme de complexes I-III avec des clusters Fe-S et avec des cytochromes et avec l'hème comme groupement prothétique. Comme nous l'avons indiqué précédemment, les complexes I et III sont les principaux sites de production d'O₂^{•-}. Le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) oxyde le NADH du cycle de l'acide tricarboxylique et de la β -oxydation, et transporte des protons à travers la membrane interne. C'est un contributeur majeur à la production cellulaire d'ERO. La réaction d'oxydo-réduction du complexe I est catalysée dans un domaine hydrophile et comprend l'oxydation du NADH par la flavine mononucléotide. La transduction d'énergie par le complexe I est composée de l'oxydation du NADH par la flavine mononucléotide, du transfert d'électrons intramoléculaires de la flavine pour se lier à une quinone le long d'une chaîne de clusters (Fe-S), la réduction de la quinone et la translocation de protons [132]. En dehors du complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase), le complexe mitochondrial du cytochrome bc1 (complexe III ; ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase) a été identifié comme le principal producteur d'anions superoxydes et d'ERO dans la chaîne respiratoire mitochondriale. La formation et l'assemblage des enzymes de la chaîne respiratoire est un processus complexe qui

nécessite l'aide d'une multitude de protéines supplémentaires et de clusters Fe-S. Le trafic et le stockage des clusters Fe-S dans les mitochondries est étroitement régulé par un transporteur : le transporteur ATP-binding cassette [133]. En outre, les ERO générées par les complexes III semblent agir en tant que seconds messagers dans le cadre du préconditionnement ischémique et de la cardioprotection pharmacologique [134].

Des études se sont intéressées aux variations dans l'homéostasie du fer systémique chez l'animal et chez l'homme en matière de pathologies cardiovasculaires afin de déterminer les dommages intrinsèques dans les voies de régulation du fer des cardiomyocytes défaillants. Il a été démontré que l'accumulation de fer dans les mitochondries pouvait provoquer ou exacerber une cardiomyopathie. C'est le cas de l'ataxie cérébelleuse de Friedreich (FRDA), une maladie génétique causée par l'expansion du triplet GAA dans le gène X25 codant pour une protéine, la frataxine [135]. La frataxine est localisée dans les mitochondries et la carence en frataxine dans la FRDA provoque un dysfonctionnement dans le métabolisme du fer mitochondrial. Le traitement des patients avec une combinaison de défériprone, un chélateur du fer perméable aux mitochondries, et un antioxydant, a partiellement inversé le phénotype cardiaque observé dans la FRDA, soutenant ainsi le rôle du fer mitochondrial dans la physiopathologie de la dysfonction cardiaque.

Dans l'insuffisance cardiaque, il a été démontré une accumulation de fer dans les mitochondries. Les activités des clusters Fe-S mitochondriaux sont ainsi réduites dans ces tissus myocardiques et le défaut de l'activité des complexes III a été spécifiquement attribué à l'absence d'un centre de clusters Fe-S [79]. Sur la base d'un certain nombre d'arguments biochimiques, il a été suggéré que le glutathion réduit (GSH) jouait un rôle dans le métabolisme du fer. Cependant, il a été conclu que le GSH ne pouvait pas être directement impliqué ou jouer un rôle essentiel dans la distribution du fer au sein des mitochondries [80]. Fe^{3+} est rapidement réduit en Fe^{2+} en présence de GSH : le potentiel réducteur de GSH étant suffisant pour réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} à pH 7. En plus d'un rôle tampon pour Fe^{2+} , le complexe Fe^{2+}GS se lie à des glutarédoxines, protéines nécessaires à l'assemblage des clusters de fer et à la biosynthèse de l'hème.

II. Stress oxydant et dysfonction endothéliale

1. Introduction

L'oxygène, composé indispensable à la vie, peut présenter dans certaines conditions une forte toxicité. En effet, lors de réactions radicalaires, il peut former des ERO. Ce métabolisme débute par la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), puis, les réactions s'enchaînant, les processus oxydatifs non compensés par les défenses endogènes conduisent à un état caractérisant **une situation instable et potentiellement délétère : le stress oxydant**. Dans certaines situations physiopathologiques, ce stress oxydant est un facteur essentiel à la mise en œuvre de défenses endogènes mais aussi dans certaines situations telles que le développement d'atteintes cellulaires et de dysfonctions organiques.

Le stress oxydant est un « dénominateur commun biologique » dans un certain nombre de situations biochimiques, physiologiques et physiopathologiques. Il représente le résultat d'une production accrue d'espèces réactives et/ou une diminution de leur élimination. Le stress oxydant joue un rôle primordial dans la plupart des étapes-clés intervenant dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires. Quels que soient les organes, il est possible de distinguer différentes sources intracellulaires de radicaux libres. Dans l'insuffisance cardiaque, la production d'ERO est significativement accrue dans le myocarde défaillant, comme cela a été clairement démontré dans des études cliniques [72,136,137]. De nombreuses démonstrations ont précisé l'implication des radicaux libres cellulaires dans la régulation redox de fonctions physiologiques normales et dans la pathogenèse de diverses maladies [93]. Le stress oxydant est associé, comme nous l'avons signalé, à un déséquilibre entre facteurs pro-oxydants, antioxydants directs et/ou indirects. Ainsi, les cellules ont développé des systèmes de défense antioxydants intracellulaires élaborés pour se protéger contre ces dommages oxydatifs. L'équilibre redox de la cellule dépend principalement du couple redox du fer (et du cuivre) et est maintenu dans d'étroites limites physiologiques [138].

Un antioxydant est une substance qui, à l'état de trace, inhibe l'oxydation d'un substrat présent en concentration importante. Dans le plasma, les substances présentes vont orienter le milieu vers un état oxydatif ou réducteur. Les antioxydants naturels doivent être considérés comme des protecteurs indispensables et ils sont classés en fonction leur

structure chimique et de leur localisation extracellulaire ou intracellulaire. Ils existent sous la forme de vitamines (A, C, E, acide folique) ou de protéines (albumine, ferritine, céruloplasmine, myoglobine, ...) et sont présents dans tous les liquides de l'organisme : plasma, liquide céphalorachidien ou liquide synovial. Ces protéines ont un rôle majeur dans la protection cellulaire car elles sont capables de chélater le fer ou le cuivre qui sont des métaux de transition « facilitateurs » des réactions radicalaires impliquant l'oxygène.

L'environnement redox cellulaire (réduction-oxydation) se réfère au potentiel de réduction ou à la capacité de réduction dans les **compartiments cellulaires**. L'état redox cellulaire est régulé par l'équilibre entre les oxydants cellulaires et les niveaux réducteurs. Les stress oxydant et réducteur peuvent déclencher des cascades redox et ainsi affecter l'environnement de la cellule ; ainsi, l'exposition à divers xénobiotiques pourrait déterminer si une cellule prolifère, se différencie, ou meurt [139]. Ceci est particulièrement important à préciser dans les pathologies cardio-vasculaires, l'athérosclérose et le diabète. Ces différentes pathologies sont associées à des états particuliers que sont l'inflammation et l'apoptose [140].

2. Définition et sources biologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN)

2.1 Définition des ERO et ERN

Les radicaux libres peuvent être définis comme des molécules ou des composés qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend donc très réactifs. Les espèces réactives de l'oxygène, symbolisées comme nous l'avons signalé par les abréviations (ERO), et de l'azote (ERN) sont la plus grande classe d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants. Ces espèces, qui sont donc des intermédiaires chimiques, sont produites par le métabolisme de la cellule et ont soit des effets bénéfiques ou délétères, en fonction de leur concentration dans les cellules [141,142].

Les ERO et ERN comprennent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le radical carboxyle ($CO_2^{\cdot-}$), le monoxyde d'azote ($\cdot NO$), le dioxyde d'azote ($\cdot NO_2$), ainsi que les espèces non-radicalaires, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'oxygène singulet et le monoxyde de carbone (CO).

L'anion superoxyde, formé à partir de l' O_2 sous l'action d'enzymes de type oxydases ou mitochondriales, peut être transformé en peroxyde d'hydrogène par la voie des

superoxydes dismutases (SODs), puis en H_2O , par la voie des catalases et des glutathion peroxydases. Il s'agit de voies normales de détoxification et de protection cellulaires.

Mais dans des situations physiopathologiques, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut, en présence de métaux dits de transition comme le fer (Fe) ou le cuivre (Cu) qui activent la réaction, conduire à la formation permanente de composés radicalaires hydroxylés.

Des réactions en chaîne vont alors s'établir au niveau des différents compartiments intracellulaires et extracellulaires, passant ainsi des radicaux libres primaires (anion superoxyde, hydroxyle et monoxyde d'azote) à des radicaux libres secondaires alkyl-alkoxyl ($RO\cdot$, $ROO\cdot$ ou $NO_2\cdot$). Certaines de ces formes radicalaires ont un rôle de signalisation intracellulaire et apparaissent comme des « modulateurs » indispensables aux fonctions cellulaires. Cependant, quand ces processus oxydatifs sont dépassés, des effets toxiques s'installent, déjà de façon réversible, puis irréversible, ce qui conduit à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose. Dans une phase intermédiaire, tous les constituants de la cellule subissent des déstructurations par oxydation, ce qui aboutit à la formation de dérivés oxydés des protéines, des lipides et des acides nucléiques. La mise en évidence des espèces radicalaires principalement dérivées de l'oxygène est très délicate. En effet, leurs demi-vies sont très courtes, de l'ordre de fractions de millisecondes, hormis pour le $\cdot NO$, dont la demi-vie est en moyenne de quatre secondes. La résonance paramagnétique électronique (RPE) est la méthode de référence permettant l'identification et la quantification fines des espèces radicalaires [142], mais son utilisation est délicate à mettre en œuvre à l'échelle d'études cliniques. D'autres techniques sont utilisées, comme par exemple l'évaluation des peroxydes plasmatiques avec le test FORT (Free Oxygen Radicals Testing) [143] ou le dosage des diméthyl-arginines [144].

Parmi les ERN, le monoxyde d'azote endothélial occupe une place de « pivot biologique ». Dans des conditions physiologiques, en présence de son substrat (L-arginine) et de ses co-facteurs (tétrahydrobioptérine : BH₄), les NOS endothéliales (eNOS) produisent le $\cdot NO$. C'est un puissant médiateur gazeux, largement reconnu comme un déterminant clé de la fonction endothéliale. Le $\cdot NO$ possède des propriétés physiologiques variées qui, selon les environnements physiopathologiques, peuvent être aussi bien bénéfiques que délétères. Ses effets vasculaires sont médiés par le GMP cyclique (GMPc), responsable d'une relaxation. Il peut réguler l'activité de certaines enzymes. Il possède aussi une action anti-inflammatoire du fait de son activité inhibitrice de l'activation et de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, de l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses et de l'inhibition de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire [145,146]. Il a également des propriétés antioxydantes par sa capacité à piéger certaines espèces radicalaires. Du fait de

son caractère au maintien d'une physiologie vasculaire normale, le $\bullet\text{NO}$ est qualifié de molécule endogène athéro-protectrice (figure 7).

Mais sa réaction avec l'anion superoxyde, aboutissant à la formation de peroxynitrite et de radical hydroxyle, lui confère aussi des effets cytotoxiques à l'origine d'atteintes vasculaires et myocardiques. C'est cette toxicité qui intervient au niveau de l'endothélium, au niveau duquel ces deux composés sont susceptibles d'être produits.

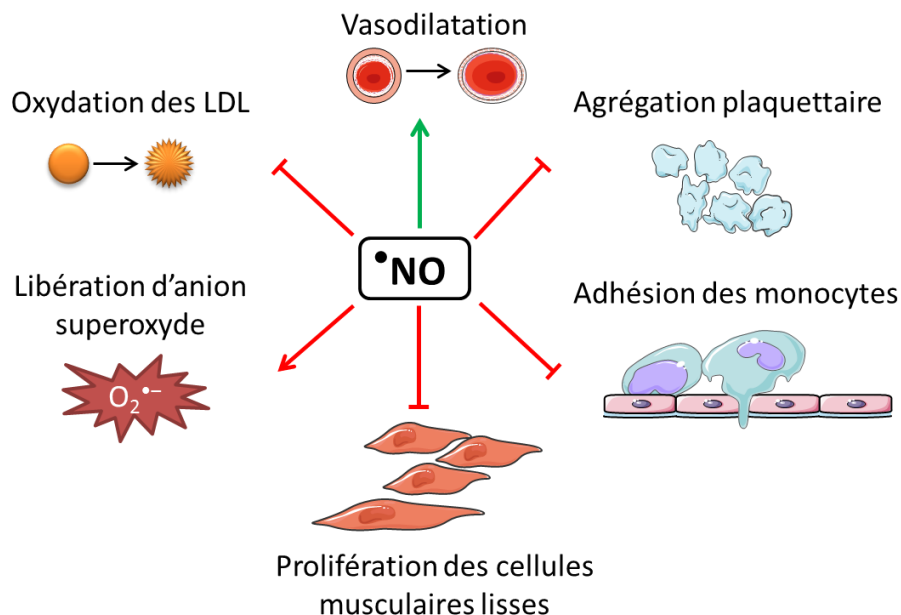


Figure 7 : Effets pléiotropes du monoxyde d'azote sur le système cardiovasculaire. Le monoxyde d'azote ($\bullet\text{NO}$) agit en inhibant les mécanismes conduisant à l'athérogenèse tels que l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des monocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'oxydation des LDL (low density lipoprotein) et réduit la libération d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Le $\bullet\text{NO}$ favorise la vasodilatation. (D'après Böger *et al* [147]).

2.2 Sources biologiques de radicaux libres

Comme nous l'avons déjà indiqué, la production d'espèces radicalaires est un phénomène permanent au sein des organismes vivants et l'essentiel de cette production physiologique, qui peut aussi devenir pathologique, est liée au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction.

Plusieurs composants d'une cellule produisent des ERO dans des conditions physiologiques normales, comme la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que des systèmes enzymatiques comme la nicotinamide adénosine diphosphate (NADPH) oxydase, le cytochrome P450, les lipooxygénases, cyclooxygénases, xanthine oxydases, les enzymes peroxysomales et, sous certaines conditions, les NO synthases (NOS) endothéliales (eNOS) [148]. Cinq complexes multiprotéiques constituent la chaîne respiratoire incorporée dans la membrane interne de la mitochondrie. Les complexes I et III sont les principaux sites de production d' $O_2^{\bullet-}$. Une source importante d'ERO est produite dans les cellules endothéliales à partir des oxydases (xanthine oxydases, NADPH oxydases). La xanthine oxydase catalyse l'hydroxylation séquentielle de l'hypoxanthine pour obtenir la xanthine et de l'acide urique. L'enzyme existe sous deux formes qui diffèrent principalement dans leur substrat à oxyder. La forme déshydrogénase est préférentiellement utilisée. L'activation des NADPH oxydases peut résulter de la stimulation d'un certain nombre de récepteurs situés à la surface cellulaire, comme le récepteur de l'angiotensine II, particulièrement important dans l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque. Lors de la stimulation par l'angiotensine II, l'activité des NADPH oxydases est augmentée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, suggérant qu'en présence d'un système rénine-angiotensine activé (soit local ou circulant), un dysfonctionnement dû à une augmentation de la production vasculaire d'anions superoxydes est à prévoir [149,150]. La stimulation des récepteurs 1 de l'angiotensine (AT1) par l'angiotensine II peut conduire à l'activation des phospholipases C et D (PLC et PLD), qui produisent du diacylglycérol (DAG). La PLC produit également de l'inositol triphosphate (IP3). La libération de DAG et de calcium médié par l'IP3 active la protéine kinase C (PKC) [151]. La phosphorylation de la sous-unité p47phox par la PKC est nécessaire pour permettre la liaison de cette sous-unité avec les autres et ainsi activer les NADPH oxydases.

Les sources enzymatiques d'ERO impliquées dans certaines pathologies impliquent des \bullet NO synthases découplées (qui génèrent l'anion superoxyde préjudiciable plutôt que le \bullet NO vasoprotecteur). Parmi les nombreuses enzymes produisant des ERO, les NADPH oxydases, qui sont au nombre de 7 homologues (appelés Nox 1-5 et Duox 1,2), ont un rôle particulièrement important dans les pathologies cardiovasculaires [15,152]. Le \bullet NO a de

puissantes propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques [153,154]. Le radical libre $\cdot\text{NO}$ a une demi-vie courte, de seulement quelques secondes dans un environnement aqueux. Le $\cdot\text{NO}$ réagit avec l'oxygène moléculaire et les ERO pour générer une gamme de produits d'oxydation. Une réaction de formation d'ERN bien caractérisée est celle de $\cdot\text{NO}$ avec $\text{O}_2^{\cdot-}$. Cette réaction se produit à des taux de diffusion limitée pour produire le peroxyxynitrite, $\text{ONOO}^{\cdot-}$, qui lui-même est très fortement oxydant, et quand il devient protoné, il subit une scission homolytique pour produire le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et le dioxyde d'azote ($\cdot\text{NO}_2$). D'autres espèces radicalaires dérivées d'autres molécules endogènes telles que le CO et l'hydroperoxyde peuvent être formées dans les systèmes vivants.

L'un des principaux stimulants de la production de $\cdot\text{NO}$ au niveau vasculaire est le shear stress ou forces de cisaillement et correspond à une libération de $\cdot\text{NO}$ en réponse aux forces de cisaillement exercées par l'écoulement du sang. Des composées tels que l'acétylcholine, l'histamine, et la bradykinine représentent également les principaux facteurs stimulateurs de la production de $\cdot\text{NO}$ au niveau endothélial.

Les $\cdot\text{NO}$ Synthases (NOS)

Le $\cdot\text{NO}$ est produit par les NOS, à partir de la L-arginine, en présence d'oxygène et de cofacteurs. Les NOS se présentent sous trois isoformes : neuronale (nNOS), inducible (iNOS) et endothéliale (eNOS). Les NOS constitutives (nNOS et eNOS) sont Ca^{2+} /Calmoduline dépendantes alors que les iNOS sont Ca^{2+} indépendantes [155]. La eNOS joue un rôle majeur dans l'homéostasie vasculaire, via la libération de $\cdot\text{NO}$ et ses actions vasodilatatrices, antiagrégantes, inhibitrices de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses et protectrices de l'oxydation des LDL.

Dans les cellules endothéliales au repos, les NOS se présentent sous forme monomérique, inactive, mais avec une activité cytochrome P450 réductase. Chaque monomère est constitué d'un domaine N-terminal avec une activité oxygénase et d'un domaine C-terminal avec une activité réductase, ces deux domaines étant reliés par un site central qui lie la calmoduline et sont stabilisés par un pont contenant un atome de zinc. Elles utilisent toutes trois la L-arginine comme substrat, de la (6R-)5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine (BH4) comme cofacteur et une molécule d'oxygène au niveau du domaine oxygénase. Le domaine réductase contient les sites de liaison au nicotinamide adénosine diphosphate sous la forme réduite (NADPH) et les cofacteurs flaviniques : la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN). La liaison d'une molécule d'hème au niveau du domaine oxygénase provoque la dimérisation nécessaire à l'activité $\cdot\text{NO}$ synthase.

La forme active des NOS neuronales et endothéliales nécessite la présence d'une protéine régulatrice appelée calmoduline leur conférant une structure tétramérique. Après liaison de la calmoduline, il y a un transfert d'électrons intra-enzymatique depuis les cofacteurs NADPH, FMN et FAD du domaine réductase vers le groupement hème du domaine oxydase. Ensuite, en présence de BH₄ et d'oxygène, les NOS catalysent la conversion de la L-arginine en 'NO à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal chimiquement équivalents du groupe guanidine.

La synthèse se fait en deux étapes, la L-arginine est d'abord hydroxylée en N-hydroxy-L-arginine, puis la L-citrulline et le 'NO sont libérés simultanément et de manière stœchiométrique. Pour chaque réaction, une molécule de NADPH est utilisée au niveau du domaine réductase de l'enzyme comme source d'électrons (Figure 8) [155].

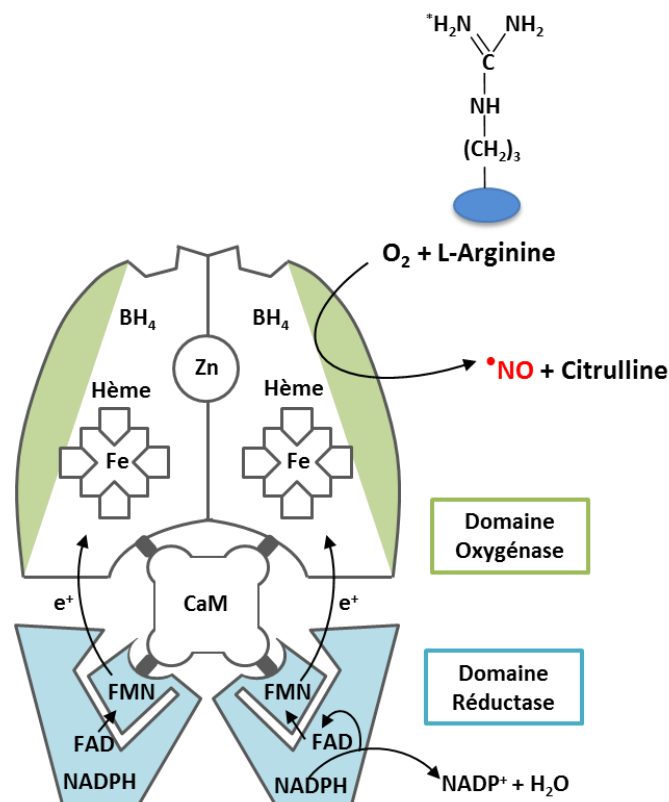


Figure 8 : Représentation schématique de la structure des NOS. Les 'NO synthases (NOS) sont constituées de deux domaines réductase et oxygénase reliés par une molécule de calmoduline (CaM). Des cofacteurs sont indispensables à la biosynthèse du monoxyde d'azote ('NO) : tétrahydro-bioptérine (BH₄), flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN), nicotinamide adénosine diphosphate (NADPH), tout comme leur substrat la L-arginine (D'après Rochette *et al* 2013 [155]).

La eNOS est l'isoforme la plus exprimée dans le système cardiovasculaire (cellules endothéliales vasculaires, cardiomyocytes et plaquettes) [156].

L'expression des eNOS et leur activité enzymatique peuvent être régulées par des modifications pré ou post-transcriptionnelles. De plus, leur activité catalytique dépend de leur état de phosphorylation et de la formation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. La L-arginine est l'unique substrat des NOS et sa biodisponibilité est donc un facteur déterminant dans les processus de synthèse du $\cdot\text{NO}$. La concentration intracellulaire de L-arginine excède son K_m pour les NOS d'au moins 2 ou 3 fois, ce qui signifie que la concentration de L-arginine ne devrait pas être un facteur limitant de l'activité des NOS et que son administration exogène ne devrait pas non plus influencer sur l'activité des NOS. Cependant, dans certaines conditions *in vitro* (cellules endothéliales de patients diabétiques ou hypertendus) et *in vivo* (patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive), l'administration de L-arginine augmente la production de $\cdot\text{NO}$. Ce « paradoxe de la L-arginine » suggère que des facteurs autres que la concentration extracellulaire de L-arginine influencent sa biodisponibilité pour les NOS [157]. Parmi les facteurs possibles, figurent la co-localisation des NOS et du transporteur de la L-arginine, l'action des arginases (enzymes dégradant la L-arginine) et l'action des inhibiteurs des NOS.

Dans certaines situations, l'activité des eNOS n'aboutit plus à la formation de $\cdot\text{NO}$, mais à la synthèse de $\text{O}_2^{\cdot-}$, aggravant le déséquilibre en faveur du stress oxydant. Les eNOS sont alors découplées. Les différents mécanismes impliqués dans le découplage des eNOS comprennent l'oxydation de leur cofacteur essentiel BH4, la déplétion en L-arginine ou encore l'accumulation de méthyl-arginines (inhibiteurs des NOS) (Figure 9).

La principale cause conduisant les eNOS à perdre leur capacité de convertir la L-arginine en $\cdot\text{NO}$ et L-citrulline est l'absence d'un cofacteur essentiel tel que BH4, du fait de son oxydation ou d'une diminution de son expression.

Au cours du découplage, les électrons sont déviés vers l'oxygène à la place de la L-arginine, donnant lieu à une production d'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ et non plus de $\cdot\text{NO}$, conduisant ainsi à une **majoration du stress oxydant**, qui réduira la biodisponibilité de BH4, mais aussi celle du $\cdot\text{NO}$ [156,158].

Il existe des composés circulants qui possèdent des actions inhibitrices des eNOS : les dérivés méthylés de la L-arginine. Ils peuvent inhiber l'activité des eNOS, de façon compétitive avec la L-arginine, au niveau du site actif de l'enzyme, mais aussi au niveau des transporteurs membranaires de L-arginine.

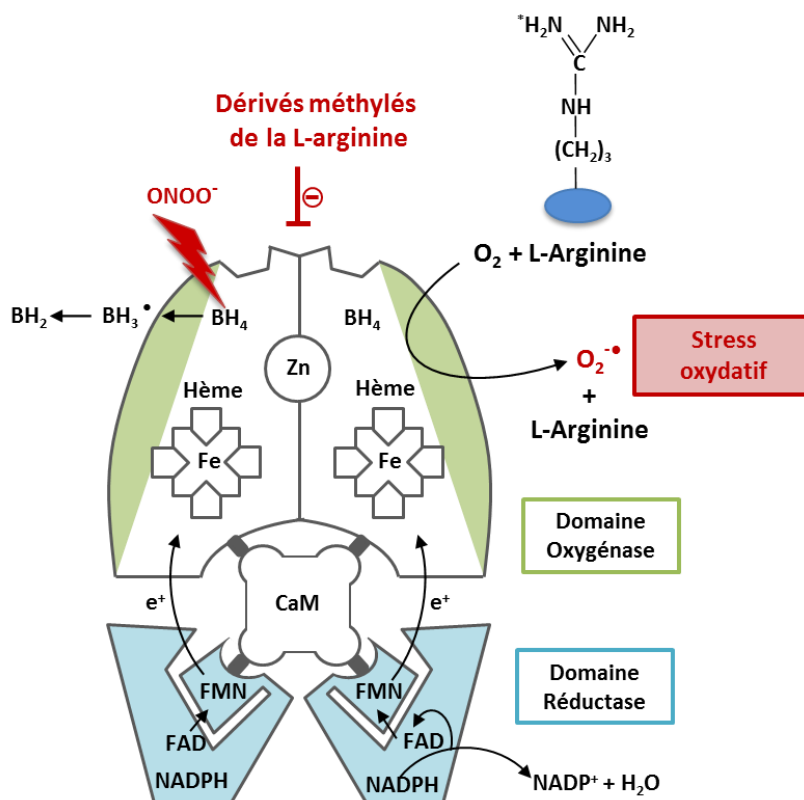


Figure 9 : Représentation schématique du découplage des NOS. L'absence du cofacteur tétrahydro-bioptérine (BH_4), la présence de peroxy-nitrite ($ONOO^-$) ou de dérivés méthylés de la L-arginine engendre le découplage des NO synthases (NOS). Les électrons sont déviés vers l'oxygène et non plus vers la L-arginine conduisant à la production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et non plus du monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$). (D'après Rochette *et al* 2013 [155]).

3. Dérivés méthylés de la L-arginine

3.1 Synthèse des dérivés méthylés de la L-arginine

L'arginine, acide aminé contenu dans les protéines, peut subir une méthylation qui constitue une modification post-traductionnelle majeure impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la maturation des ARNm, la régulation de la transcription ou bien la transduction des signaux cellulaires [159]. Cette méthylation est catalysée par des enzymes appelées protéines arginine méthyl-transférases (PRMTs) qui transfèrent des groupements méthyles (CH_3) issus de la S-adénosyl-méthionine (SAM) sur un des atomes d'azote du groupement guanidine terminal des résidus arginines. Ces résidus arginines, ainsi mono ou diméthylés, de façon symétrique ou asymétrique, donnent lieu respectivement à la formation de N^G -monométhyl L-arginine (L-MMA), N^G,N^G -diméthyl L-arginine symétrique

(SDMA) ou N^G,N^G-diméthyl L-arginine asymétrique (ADMA). Après la formation de L-MMA, dont la synthèse est catalysée par les PRMTs I et II, un second groupement méthyle peut être ajouté par une PRMT de type I conduisant à la formation d'ADMA et de type II pour la SDMA [160].

Pour exercer leur rôle biologique, les dérivés méthylés de la L-arginine doivent être libérés et cela se produit au cours d'une protéolyse, composante essentielle de l'homéostasie cellulaire, qui participe entre autres au « ménage cellulaire » en éliminant les protéines anormales et à l'approvisionnement en acides aminés nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines. Ce rôle est assuré par le système protéasome, ou protéasome 26S, composé des protéasomes 20S et 19S. En général, les protéines qui doivent être dégradées sont ubiquitinyllées, mais pas exclusivement. C'est le cas pour les protéines dont les structures se trouvent altérées par un processus oxydatif, qui ne nécessitent pas d'ubiquitinylation pour être dégradées et qui sont directement reconnues par le protéasome 20S.

A l'issue de cette protéolyse, les résidus méthyl-arginine vont être libérés en ADMA, SDMA et L-MMA libres dans le cytoplasme, et ainsi exercer leur rôle d'inhibiteurs compétitifs des NOS, contrairement aux méthyl-arginines liées aux protéines, qui ne peuvent inhiber l'action des NOS. Le métabolisme des méthyl-arginines est ainsi intimement lié à la synthèse et à la dégradation des protéines méthylées [161]. Les méthyl-arginines ainsi libérées peuvent soit être transportées de leur site d'origine soit importées du plasma vers différents sites par des transporteurs d'acides aminés cationiques, les CATs (cationic acid transporters) en échange de L-arginine ou d'autres acides aminés cationiques [162,163]. Ces systèmes de transport CATs sont impliqués dans l'assimilation et le relargage cellulaire de la L-arginine [164]. L'activité des CATs, dont il existe plusieurs sous-types, permet le maintien d'un équilibre dynamique des acides aminés entre les milieux extra et intra-cellulaires. La proximité du transporteur CAT1 et des eNOS tend à montrer que l'inhibition des eNOS par l'ADMA dépend essentiellement de l'ADMA plasmatique plutôt que de l'ADMA intracellulaire.

3.2 Voies de dégradation des méthyl-arginines

Les transporteurs CATs sont également nécessaires à l'élimination des méthyl-arginines. L'ADMA est principalement métabolisée par voie enzymatique dans le foie et le rein. Son élimination rénale est quant à elle extrêmement minoritaire, au contraire de la SDMA pour qui l'élimination rénale est la voie exclusive. Pour ces deux voies de

dégradation, l'ADMA et la SDMA doivent être transportées de la cellule vers le plasma, pour atteindre leur lieu de dégradation.

Les diméthylarginine diméthylaminohydrolases (DDAHs) catalysent l'hydrolyse de l'ADMA et de la L-MMA en une molécule de L-citrulline et une molécule de diméthylamine ou monométhylamine respectivement. Cette voie de dégradation représente 80% de l'élimination de l'ADMA, les 20% restant sont éliminés par excrétion rénale.

La voie d'élimination de la SDMA est quant à elle presque exclusivement urinaire. En effet, de par leur structure moléculaire, les DDAHs ne peuvent dégrader la SDMA car leur poche catalytique n'est pas accessible aux molécules de SDMA du fait d'un encombrement stérique différent et d'une instabilité électrostatique [165].

3.3 Rôles des dérivés méthylés de la L-arginine

L'ADMA, analogue structurel de la L-arginine, est un inhibiteur compétitif et puissant de la eNOS [166]. Ainsi, l'accumulation d'ADMA provoque une diminution de la biodisponibilité de NO , et cette propriété confère ainsi à l'ADMA son rôle délétère sur la fonction endothéliale [167]. Cet impact sur la régulation de la balance oxydative pourrait prédire le risque de survenue d'événements cardiovasculaires [168,169]. De plus, il a été montré qu'outre l'inhibition compétitive de la eNOS par l'ADMA, celle-ci provoque également un découplage de l'enzyme, et donc une majoration du stress oxydatif et de la production d'anion superoxyde [170].

Contrairement aux propriétés de l'ADMA, la SDMA ne peut inhiber directement les NOS mais peut altérer son fonctionnement par une diminution de la disponibilité de son substrat en rentrant en compétition avec ce dernier pour les transporteurs CATs [171]. Du fait de son incapacité à inhiber directement les NOS, la SDMA a longtemps été considérée comme biologiquement inactive. Cependant, les travaux des dernières années montrent que la SDMA, en raison de son élimination urinaire, serait un nouveau marqueur de la fonction rénale [172,173]. Certaines données récentes suggèrent une voie alternative de dégradation des diméthylarginines, via la AGTX2 (Alanine-glyoxylate aminotransférase 2), montrant que cette voie pourrait constituer un lien pathogénique entre l'altération de la fonction rénale et la SDMA ainsi que l'association entre SDMA et mortalité après un AVC [174].

Dans la population générale, il apparaît donc, à la vue des travaux récents, que la SDMA pourrait être associée à la survenue d'événements cardiovasculaires et ce avec la même puissance statistique que l'ADMA [175].

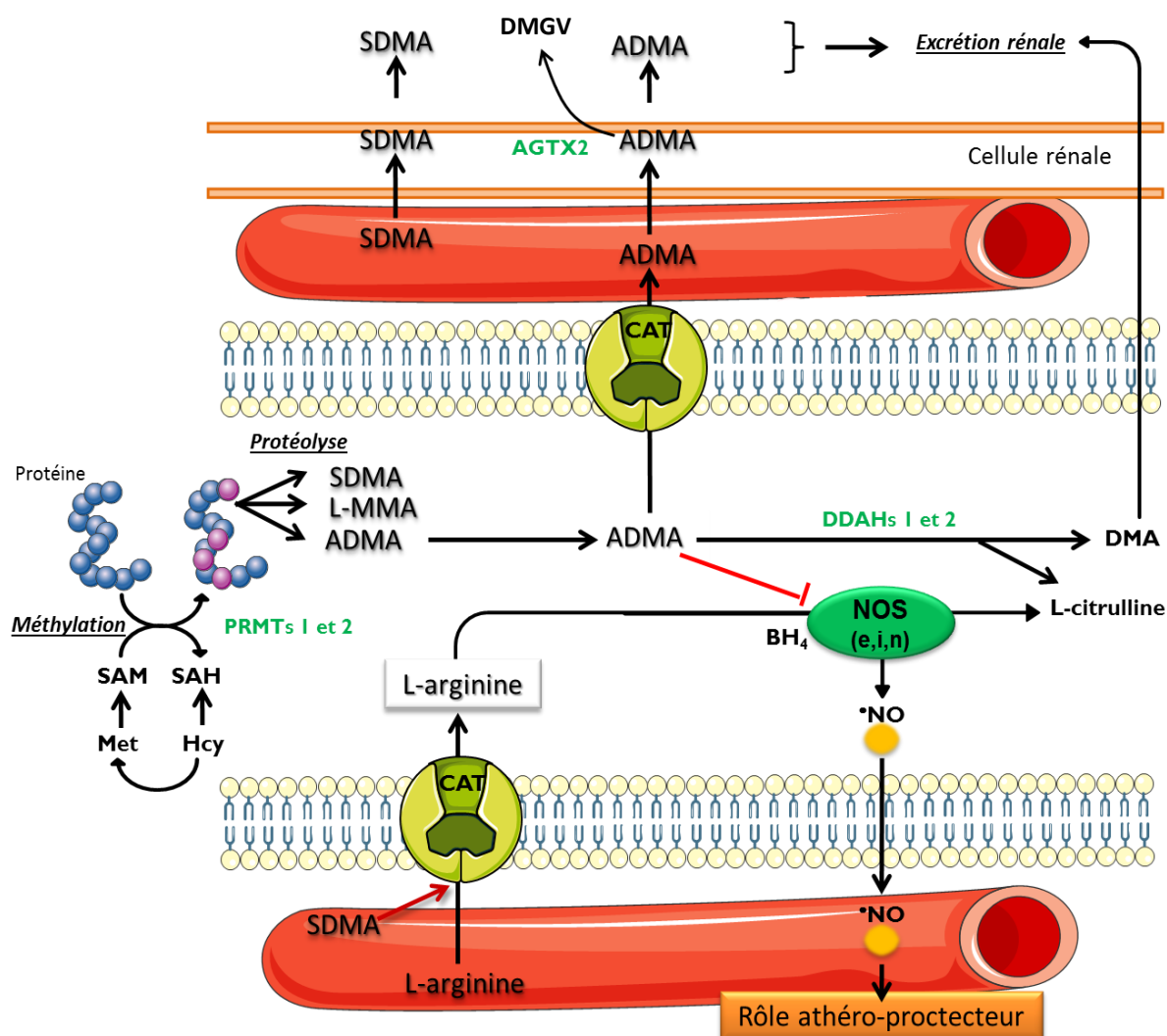


Figure 10 : Schéma de la synthèse et des fonctions des dérivés méthylés de la L-arginine, du monoxyde d'azote. L'ADMA et la SDMA libres sont des composés issus de la protéolyse de protéines méthylées au niveau de leurs résidus arginine. L'ADMA est un inhibiteur compétitif des NOS contrairement à la SDMA qui ne modifie pas directement l'activité des NOS. En revanche, la SDMA peut interférer avec le transport cellulaire de la L-arginine au niveau des transporteurs CATs. La biodisponibilité du NO se trouve donc sous la dépendance ces deux composés. L'ADMA est principalement dégradée par les DDAHs de type 1 et 2 mais aussi par AGTX2. La SDMA est exclusivement éliminée par voie rénale. (D'après Lorin *et al* 2014 [154]).

ADMA: diméthyl-arginine asymétrique; AGTX2 :alanine-glyoxylate amino-transférase 2 ; BH₄ : tétra hydrobioptérine; CATs: cationique AA transporteurs; DDAHs: diméthyl-arginine diméthyl-aminohydrolases; DMA: diméthylamine; DMGV: a-keto-8-(N(G),N(G)- diméthyl-guanidino) acide valérique; Hcy: homocystéine; L-Arg : L-arginine; LDL: low-density lipoprotéine; L-MMA: monométhyl-L-arginine; Met: méthionine; NADPH: nicotinamide dinucléotide phosphate; NO: monoxyde d'azote; NOS : NO synthase; PRMTs: protéine arginine méthyl-transférase; SAH : S-adenosyl homocystéine SAM : S-adenosyl méthionine ; SDMA: diméthyl-arginine symétrique.

III. Etiologie des pathologies cardiovasculaires

Nous tenterons dans ce chapitre d'établir une synthèse des différents processus radicalaires qui sous-tendent l'initiation et le développement des atteintes vasculaires et myocardiques qui participent aux processus cellulaires accompagnant l'IDM.

1. Stress oxydant et dysfonction endothéliale

Dans des conditions normales et au niveau de toutes les cellules d'un tissu, il existe un équilibre entre la formation radicalaire et le stress oxydant. Les espèces radicalaires impliquées dans la signalisation redox jouent alors un rôle majeur dans le devenir et l'adaptation de la cellule à son environnement. La cellule peut ainsi soit s'installer en quiescence, ou proliférer, ou s'autodétruire ; c'est ce qui se passe lors de l'apoptose.

Les phénomènes inflammatoires ont un rôle majeur dans la genèse d'un stress oxydant. En effet, les médiateurs de l'inflammation déclenchent une migration et une activation des polynucléaires neutrophiles qui s'accompagnent de la production d'ERO, déversés dans le milieu extracellulaire et qui peuvent alors déclencher, entretenir puis amplifier les réactions inflammatoires. On retrouve ainsi, au cours des états inflammatoires chroniques ou aigus, des anomalies tissulaires pouvant être le résultat de ces phénomènes oxydatifs.

Le stress oxydant est l'un des facteurs qui participe à l'installation de dysfonctionnements importants au niveau du système cardiovasculaire. Concernant l'athérosclérose, l'initiateur principal de la lésion serait l'interaction entre les lipoprotéines oxydées circulantes (LDLox) et les macrophages tissulaires. L'oxydation des LDL, sous l'action des ERO, empêche leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques, mais les LDLox sont reconnus par des récepteurs macrophagiques. Les macrophages sont chargés d'endocyter ces LDLox et deviennent alors des cellules spumeuses.

Les ERO ont aussi été impliquées dans les incidences métaboliques et fonctionnelles de la séquence d'ischémie-reperfusion rénale, gastro-intestinale, cérébrale et cardiaque en particulier [176]. La reperfusion d'un organe ischémié s'accompagne d'altérations spécifiques associées à un phénomène de stress oxydant.

Concernant les cellules endothéliales, dans des conditions physiologiques, les systèmes de défense antioxydants endogènes maintiennent un équilibre entre la production de NO et de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour minimiser leurs interactions et ainsi réguler l'état redox de ces cellules. Cependant, cette balance peut être altérée dans de nombreuses pathologies

cardiovasculaires, conduisant à l'augmentation des anions superoxydes et à une diminution du NO biologiquement actif. Ainsi, l'augmentation de la production d'ERO, qui se traduit par une diminution de la biodisponibilité du NO biologiquement actif, participe aux phénomènes de dysfonction endothéliale.

Dans la dysfonction endothéliale, la mise en évidence d'une augmentation de la dégradation du NO par les radicaux libres a été réalisée par la démonstration d'effets vasomoteurs de substances possédant une activité de chélation ou de dégradation des radicaux libres. En effet, l'administration de polyéthylène glycol superoxyde dismutase (PEG-SOD) améliore la relaxation endothélium-dépendante chez des lapins hypercholestérolémiques [177]. Un effet similaire de la SOD ou d'autres molécules antioxydantes a été retrouvé dans diverses situations comme le diabète, l'hypertension artérielle, la transplantation d'organes, la reperfusion post-ischémique ou l'insuffisance cardiaque. De la même façon, l'administration de molécules antioxydantes chez l'homme, en particulier la vitamine C, augmente les réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium chez des sujets diabétiques, hypertendus ou présentant une insuffisance coronaire [178]. Il a été démontré au sein de notre Laboratoire qu'un accélérateur de la décomposition du peroxyde d'azote conférait un certain degré de cardioprotection en situation d'ischémie-reperfusion mimant *in vitro* une cardioplégie clinique [179].

Une augmentation de la production d'anions superoxydes a pu être mesurée sur des segments de veines saphènes prélevées chez des patients diabétiques ou hypercholestérolémiques [180]. Les radicaux libres favorisent l'expression de molécules d'adhérence endothéliales ou de facteurs chimiotactiques, participant ainsi à l'augmentation d'adhésion de leucocytes caractéristique de la dysfonction endothéliale. Il est cependant difficile de déterminer si l'augmentation d'adhésion induite par les radicaux libres est un effet direct ou secondaire à la baisse de NO , car le NO exerce des effets opposés sur ces mêmes expressions. Enfin, les radicaux libres peuvent également stimuler l'hypertrophie et la prolifération cellulaire, en particulier au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires.

2. Fer et pathologies cardiovasculaires

Le fer est nécessaire pour les cellules en raison de sa capacité à transporter l'oxygène et les électrons. Récemment, les conséquences d'une carence ou d'une surcharge en fer dans l'organisme ont bien été démontrées montrant l'implication du fer dans l'étiologie de plusieurs maladies chroniques, dont le diabète, les maladies cardiovasculaires et les cancers. Le fer a des fonctions biologiques vitales ; par exemple, il est nécessaire à la

formation de l'hémoglobine, de la myoglobine et de nombreux groupes enzymatiques. Pendant longtemps, l'influence de la carence en fer a été sous-estimée, en particulier en termes d'aggravation des maladies cardio-vasculaires et dans le développement de l'anémie. Le traitement de l'anémie des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique (ICC) avec altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) repose traditionnellement sur les agents stimulant l'érythropoïèse (ASE) [19].

En revanche et paradoxalement, l'accumulation de fer provoque des dysfonctions d'organes par le biais de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Le couple redox du fer sert d'intermédiaire au transfert d'électrons célibataires à travers les réactions réversibles d'oxydo-réduction de Fe^{2+} et Fe^{3+} . Le fer est un métal essentiel pour la synthèse de l'hémoglobine dans les érythrocytes, pour les réactions d'oxydo-réduction et pour la prolifération cellulaire [181].

Les dysfonctions myocardiques peuvent résulter d'un déséquilibre dans les mécanismes programmés pour stabiliser le stress oxydant. De plus en plus de données suggèrent que les modifications impliquées dans le stress oxydant seraient dues aux métaux ioniques comme le fer. Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque consécutive à une cardiomyopathie dilatée, nous avons démontré des altérations dans les taux de fer dans les différentes parties du myocarde et qui étaient reliées aux paramètres fonctionnels. Ces résultats ont montré une relation entre les troubles du métabolisme du fer et la gravité des pathologies cardiaques [72].

2.1 Carence martiale et insuffisance cardiaque

Dans l'insuffisance cardiaque, les études récentes montrent bien qu'il faut s'intéresser plutôt au déficit en fer qu'à l'anémie. En effet, bien que l'anémie soit fréquente dans l'insuffisance cardiaque, la carence martiale l'est davantage et est aussi plus précoce. Les données épidémiologiques montrent qu'un insuffisant cardiaque sur deux est carencé en fer.

Cependant, les résultats de l'étude RED-HF [182] n'ont pas montré de bénéfice d'un traitement par EPO dans ce contexte, alors qu'était observée une tendance à l'amélioration sous supplémentation en fer. Ceci peut s'expliquer par l'interaction de plusieurs mécanismes à l'origine de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque, tels que l'hémodilution, la dysfonction rénale, les cytokines proinflammatoires, la baisse de la perfusion de la moelle osseuse ou même certains traitements comme les IEC [183]. Il peut aussi y avoir un défaut d'apport

favorisé par une malnutrition ou une malabsorption secondaire de l'œdème des tissus digestifs suite à la congestion, l'augmentation de la sécrétion d'hépcidine et/ou des pertes gastro-intestinales par hémorragies distillantes, secondaires aux traitements antiagrégants plaquettaires ou anticoagulants. Ces mécanismes sont à l'origine d'une diminution du stock en fer et donc d'une carence martiale absolue. Il existe tout particulièrement un lien étroit entre insuffisance rénale, sécrétion d'EPO et insuffisance cardiaque. Il est fréquent d'observer des taux élevés d'EPO chez ces patients, d'autant plus que l'insuffisance cardiaque est sévère, liés à l'hypoperfusion rénale engendrée. Ainsi, l'anémie de l'insuffisant cardiaque surviendrait sur fond de résistance à l'EPO, expliquant l'échec de traitement par EPO dans RED-HF. Cette résistance à l'EPO peut provenir d'un déficit en fer. En effet, dans cette étude, la moitié des patients présentaient un déficit martial selon la définition de la carence martiale de l'époque. Le CST médian était de 20 % (un taux < 15 % était un critère d'exclusion) et le taux médian de ferritine était de 100 µg/L. Sous EPO, les patients ont eu tendance à développer un déficit en fer, probablement car ils n'étaient pas assez supplémentés en fer.

Chez l'insuffisant cardiaque (IC), il est admis qu'il existe un déficit absolu en fer avec des stocks faibles. Dans les maladies rénales chroniques, un déficit fonctionnel a été suggéré, dont la cause serait l'inflammation, provoquant une élévation de la sécrétion hépatique d'hépcidine, à l'origine d'un déficit fonctionnel en fer [184]. Ce type de déficit fonctionnel peut aussi se rencontrer chez l'insuffisant cardiaque, bien que les mécanismes diffèrent dans une infection et dans l'autre. En effet, dans l'IC, un syndrome inflammatoire par le biais des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, augmente la sécrétion hépatocytaire d'hépcidine, diminuant l'absorption du fer qui est alors piégé par les macrophages, entraînant une diminution de sa mobilisation et donc une carence martiale fonctionnelle.

Le diagnostic de carence martiale, absolue ou fonctionnelle, repose sur l'analyse de deux biomarqueurs, la ferritine et le coefficient de saturation de la transferrine, dont le dosage, à côté de celui de l'hémoglobine, est désormais recommandé chez les patients insuffisants cardiaques par la Société européenne de cardiologie (recommandation de classe I et de niveau C) [185]. Une ferritinémie basse, inférieure à 100 µg/L, définit une carence martiale absolue et le coefficient de saturation de la transferrine est alors également diminué (< 20 %). Un coefficient de saturation de la transferrine diminué (< à 20 %), en présence d'une ferritinémie normale ou même légèrement élevée (entre 100 et 300 µg/L), définit une carence martiale fonctionnelle (figure 11).

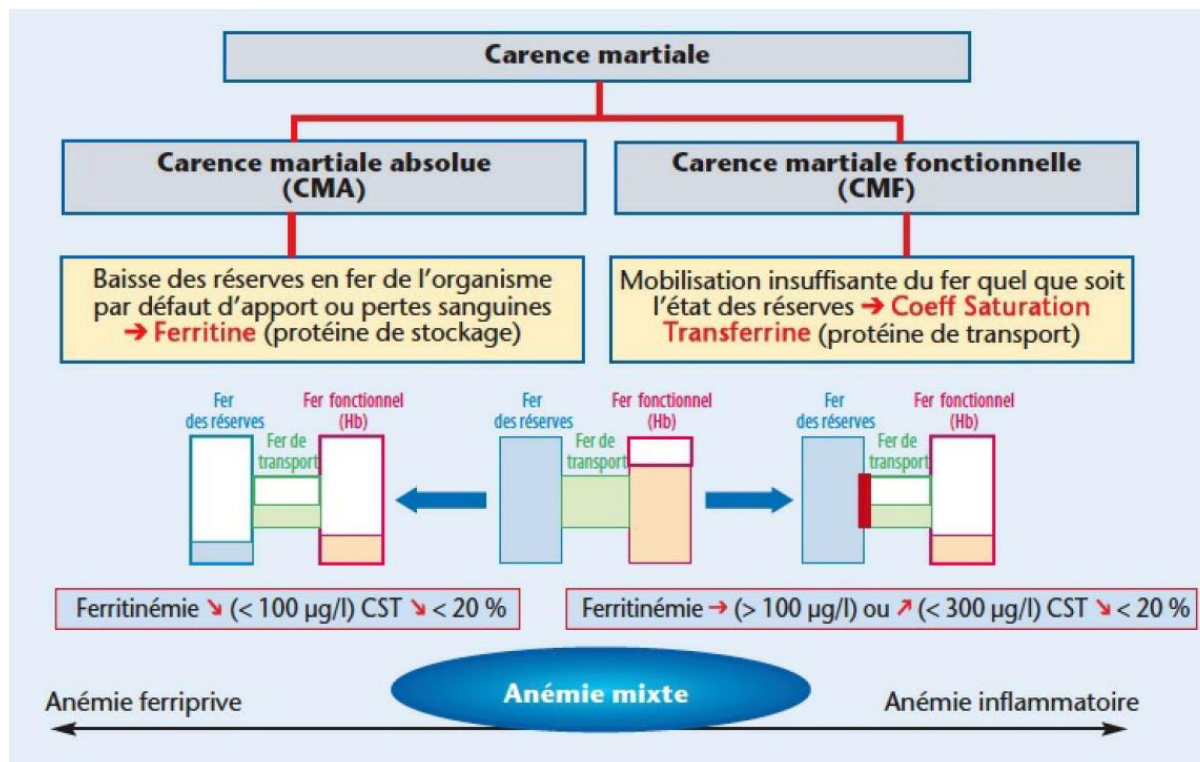


Figure 11 : Deux types de carence martiale dans l'insuffisance cardiaque : absolue et fonctionnelle. (D'après Galinier 2013 [186].)

Il est important de préciser que ces valeurs seuils de ferritinémie et de CST correspondent aux recommandations du traitement de l'insuffisance cardiaque et qu'il existe également d'autres définitions de carence en fer absolue et fonctionnelle concernant d'autres spécialités, telles que l'anesthésie, la gastroentérologie, l'oncologie ou bien encore la néphrologie, avec des valeurs seuils différentes.

De même, les recommandations de l'ESC ne sont pas spécifiques et il n'y a pas de cut-off défini pour la ferritinémie en contexte inflammatoire comme en phase aiguë d'infarctus du myocarde par exemple.

En France, un consensus d'experts concernant le diagnostic et la prise en charge de la carence martiale chez les patients insuffisants cardiaques a été publié [187].

L'étude de Jankowska a montré que le déficit en fer, évalué par le dosage du récepteur soluble à la transferrine, augmentait avec la classe NYHA de l'insuffisance cardiaque, mais que le taux d'hepcidine diminuait également, à l'inverse de ce qui est

constaté dans l'insuffisance rénale, avec une diminution dans l'insuffisance cardiaque moins nette en cas d'anémie ou d'inflammation associée [188].

Dans l'insuffisance cardiaque systolique, ses précédentes études ont montré qu'une carence martiale était associée à une augmentation de la morbi-mortalité, indépendamment d'une anémie concomitante [189,190]. Les patients IC avec un taux faible d'hepcidine avaient un risque de mortalité plus élevée, indépendamment de l'anémie.

Le traitement de la carence en fer est actuellement une voie prometteuse pour améliorer le pronostic de l'insuffisance cardiaque. L'étude FAIR-HF montre une tendance à l'amélioration des patients avec insuffisance cardiaque systolique traités par fer par voie intra-veineuse (vs. placebo), qu'ils présentent une anémie ou non [191,192]. En effet, un traitement par injections de fer (carboxymaltose ferrique) est associé à une amélioration des symptômes et de la classe fonctionnelle de la NYHA (critères primaires) ainsi que des scores de qualité de vie et de durée de marche au test de 6 minutes (critères secondaires), sans effets indésirables, en dehors de quelques troubles gastro-intestinaux, en particulier sans réaction d'hypersensibilité sévère.

Deux méta-analyses démontrent que l'apport en fer intraveineux, chez des patients présentant une carence martiale avec ou sans anémie, diminue significativement les hospitalisations (– 49 et 74 %), sans cependant réduire significativement la mortalité (– 27 et 34 %) [193,194].

L'étude CONFIRM-HF a comparé un traitement par fer intra-veineux, le carboxymaltose ferrique, avec un placebo, chez des insuffisants cardiaques de classe II et III de la NYHA présentant un déficit en fer. La durée du traitement a été de 1 an. Les résultats montrent une augmentation significative de la distance parcourue au test de marche de 6 minutes à la semaine 24, critère principal d'évaluation, chez les patients traités par carboxymaltose ferrique. Les investigateurs ont également observé une amélioration significative de la qualité de vie et de la classe NYHA. Enfin, un traitement par carboxymaltose ferrique conduit à une diminution significative du risque d'hospitalisation [195].

2.2 Pathologies coronariennes et IDM

Des études observationnelles ont indiqué que l'exposition élevée au fer peut être associée à un risque plus élevé de maladie coronarienne. Les preuves épidémiologiques, cependant, restent encore ambiguës. Certaines études n'ont retrouvé aucune association ou

bien une association inverse entre l'exposition au fer et l'incidence de la maladie coronarienne ou la mortalité. Récemment, les caractéristiques de 32 cohortes provenant de 21 études ont été rapportées [196]. Dans cette méta-analyse quantitative regroupant des études de cohorte prospectives, l'apport total en fer était inversement associé à l'incidence de la maladie coronarienne, tandis que l'apport en fer héminique était positivement associé avec l'incidence des coronaropathies. Le fer non héminique n'a pas été retrouvé comme un facteur associé à l'incidence de la maladie coronarienne. En revanche, le fer héminique augmente le risque de maladie coronarienne. Une hypothèse pour expliquer ces résultats réside en la biodisponibilité du fer, le fer héminique étant plus absorbé au niveau intestinal que le fer non héminique [197].

Il a été proposé qu'un état d'appauvrissement soutenu en fer ou qu'une légère carence en fer pouvait exercer une action protectrice primaire contre la coronaropathie, appelée « l'hypothèse du fer » ; l'effet protecteur d'une déplétion en fer, qui pourrait avoir plusieurs conséquences bénéfiques, est due à une diminution de la disponibilité en fer. Une critique persistante de l'hypothèse du fer est que l'athérosclérose peut ne pas être une caractéristique importante de l'hémochromatose héréditaire (HH). L'HH est une pathologie autosomale récessive, cliniquement et génétiquement hétérogène, avec des troubles d'apparition tardive, conduisant à l'accumulation d'excès de fer dans de nombreux tissus, dont le cœur. Les données épidémiologiques quant à l'implication possible des variations du gène HFE dans le développement de l'athérosclérose sont équivoques [198,199]. Récemment, l'objectif d'une étude a été d'évaluer l'association de quatre variants du gène HFE au risque de maladie coronarienne. Certaines mutations du gène HFE ont été démontrées comme étant associées à une surcharge en fer et à une maladie coronarienne [200]. Fait intéressant, les mutations du gène HFE sont associées à une augmentation du risque de 70% de survenue de maladie coronarienne chez les femmes, mais pas chez les hommes [201].

Les fonctions diastolique et systolique ventriculaires gauches de patients atteints de pathologies telles que l'HH ou la β -thalassémie, peuvent être atteintes directement par des dépôts de fer. L'association entre arythmie cardiaque et HH est maintenant bien documentée. De nombreuses études ont décrit des cas d'arythmie survenant dans un contexte d'insuffisance cardiaque due à une surcharge en fer. Le principal tableau clinique est celui de l'insuffisance cardiaque congestive progressive avec arythmie, dont l'autopsie a confirmé la surcharge excessive en fer du cœur [202]. Il est donc difficile de déterminer si

l'arythmie des sujets atteints d'HH est directement liée à la surcharge en fer systémique plutôt qu'à l'insuffisance cardiaque.

Récemment, une étude a révélé que l'incidence des troubles du rythme supraventriculaire et ventriculaire était plus élevée dans les groupes combinés d'HH que dans des groupes contrôles de volontaires sains appariés sur l'âge et le sexe [203].

Dans la thalassémie, des anomalies de l'électrocardiogramme sont fréquentes. On retrouve des modifications de la fréquence cardiaque et un intervalle QT corrigé allongé (QTc), indépendamment du statut cardiaque en fer. Des anomalies de la repolarisation, un intervalle QTc allongé, une déviation axiale gauche et des ondes T négatives sont de puissants prédicteurs de surcharge myocardique en fer [204]. En ce qui concerne l'incidence de la surcharge en fer, les patients présentaient des altérations plus marquées des fonctions systolique et diastolique ventriculaire gauche, avec notamment une altération du strain rate de la paroi libre de l'oreillette gauche, facteur associé à la survenue d'arythmies supraventriculaires chez ces patients atteints de thalassémie [205].

Les patients atteints de cardiomyopathie par surcharge en fer présentent une altération des fonctions systolique et diastolique ventriculaire gauche et ont une susceptibilité accrue de développer des épisodes de fibrillation auriculaire (FA). Le développement d'épisodes de FA reste insuffisamment compris et peut varier considérablement selon le type de pathologie sous-jacente. Dans toutes les pathologies de surcharge en fer, les études ont documenté les effets bénéfiques à long terme des traitements par chélation du fer sur les anomalies électrocardiographiques [206,207].

Environ un tiers des patients atteints d'IC et 10 à 20% de ceux atteints de coronaropathie présentent une anémie [183]. Le traitement de l'anémie des patients atteints d'IC avec une altération de la fraction d'éjection ventriculaire gauche repose traditionnellement sur les agents stimulant l'érythropoïèse (ASE) [19]. Récemment, de grands essais randomisés sur les ASE et la supplémentation en fer par voie intra-veineuse ont montré que les ASE n'entraînaient pas d'amélioration des critères de jugement cliniques, mais que la supplémentation par fer intra-veineux améliorait les symptômes de l'IC [208]. Chez les patients atteints d'IC, l'érythropoïétine (EPO) est fortement exprimée, et une étroite corrélation entre EPO et IC a été démontrée [209]. La correction d'une anémie avec l'EPO réduit la morbi-mortalité chez les patients atteints de maladie rénale chronique et des études récentes ont montré que la même approche n'était pas toujours aussi bénéfique chez les patients atteints d'IC. L'utilisation d'EPO pour le traitement de l'anémie des patients atteints

du syndrome cardio-rénal est associée à une augmentation du risque de décès, ainsi qu'à une tendance à l'augmentation du risque de survenue d'événements cardiovasculaires et d'AVC [210].

L'un des aspects intéressants de l'épidémiologie de l'athérosclérose est la différence d'incidence entre les sexes. Dans tous les groupes d'âge, les femmes ont un risque d'infarctus du myocarde (IDM) plus faible que les hommes. Les observations épidémiologiques et les résultats d'essais cliniques contrôlés récents suggèrent que ce ne sont pas les œstrogènes qui protègeraient les femmes. Une hypothèse alternative est que le risque plus faible de coronaropathie chez les femmes serait dû aux différences de genre dans le métabolisme du fer. Il a été suggéré que c'était la baisse des réserves en fer de l'organisme, et non la perte des fonctions ovariennes, qui expliquait les différences entre les hommes et les femmes dans le développement de la maladie coronarienne [200].

Les liens entre métabolisme des différentes formes de fer et risque d'événements cardiovasculaires apparaissent difficiles à vérifier avec certitude. Des études indiquent qu'une consommation importante de viande rouge et/ou transformée est liée à un risque accru de maladies cardiovasculaires et/ou de décès. Ces associations ont été attribuées, au moins en partie, à la teneur en fer héminique contenu dans la viande rouge [211]. Des études prospectives ont étudié l'association entre l'apport de fer héminique et de fer non héminique et le risque d'IDM fatals et non fatals. Les résultats ne confortent pas l'hypothèse que le fer alimentaire augmente le risque de maladie coronarienne. Ils suggèrent cependant qu'un apport élevé en fer héminique est associée à un risque accru d'IDM [212,213]. Une étude prospective récente a examiné l'apport de fer héminique et non héminique par rapport au risque d'IDM fatals et non fatals séparément. Dans cette étude, une association positive entre la consommation de fer héminique et le risque d'IDM fatals a été retrouvée, plus particulièrement chez les hommes ayant de faibles apports en calcium, magnésium et en zinc. Il a ainsi été émis l'hypothèse que, dans des conditions de faible apport de minéraux, les interactions entre le fer et l'apport de minéraux pourraient conduire à une absorption accrue de fer [214].

Dans le cadre de cette réflexion sur les hypothèses délétères des apports en fer, de son métabolisme et du risque cardiovasculaire, une orientation nouvelle s'est faite vers le rôle que pourrait jouer les hormones telles que l'hépcidine.

Depuis la découverte de l'hepcidine, de nombreuses équipes travaillent sur une meilleure compréhension de son rôle dans différentes pathologies, notamment dans l'insuffisance rénale, les maladies chroniques inflammatoires mais aussi aiguës. Du fait du rôle majeur du fer dans différentes pathologies cardiovasculaires telles que la cardiomyopathie par surcharge en fer, les lésions d'ischémie-reperfusion ou l'athérosclérose, il devient primordial de mieux connaître l'implication de l'hepcidine dans ces pathologies.

Son expression dans des cellules myocardiques de rats a été démontrée par Merle et al., qui ont montré une augmentation de l'expression de l'hepcidine dans les cœurs de rats exposés à des situations d'hypoxie ou chez qui était injectée de l'huile de térébenthine [76].

Par la suite, l'expression de l'hepcidine par les cardiomyocytes a été démontrée chez des rats chez qui était provoqué un infarctus du myocarde, avec un taux d'expression qui augmentait un jour après l'infarctus [77]. Il s'agit là d'un contexte inflammatoire où le taux de cytokines proinflammatoires est élevé et où l'hepcidine semble jouer un rôle essentiel dans l'homéostasie du fer et la génération d'ERO.

Puis, il a été découvert une isoforme plus courte d'hepcidine, de 20 acides aminés (hepcidine-20), dans le sérum humain. Suzuki et al. ont montré que l'augmentation de la concentration de cette isoforme dans le sérum de patients présentant un syndrome coronaire aigu était plus précoce et plus fugace en phase aiguë, rendant son dosage plus sensible en phase aiguë que celui de l'hepcidine-25 [215].

Concernant la régulation de l'hepcidine, un travail a récemment montré une upregulation de l'hepcidine dans le myocarde ischémique de rats avec une augmentation de l'expression d'hepcidine par le myocarde infarci et aussi une élévation du taux sérique d'hepcidine chez ces rats. Les auteurs suggèrent que cette upregulation de l'hepcidine, lors d'une ischémie myocardique permettrait de réduire la toxicité tissulaire du fer et ainsi de protéger le myocarde d'une atteinte tissulaire irréversible [216].

Dans le contexte de la protection myocardique, l'état vasculaire coronaire conditionne la mise en œuvre efficace des processus de protection endogène. La limitation de l'extension des altérations vasculaires liées à l'athérosclérose est un des objectifs de certaines thérapeutiques.

Le mécanisme par lequel le fer peut stimuler l'athérogenèse a été intensivement étudié. Il existe de nombreuses revues disponibles sur les connaissances actuelles à l'égard de l'athérosclérose. L'athérogenèse est caractérisée par des processus inflammatoires,

menant à la formation des plaques, puis à la rupture de plaque et à la thrombose artérielle. Les lésions d'athérosclérose sont précédées des stries lipidiques, avec l'accumulation de cellules lipidiques surchargées, en dessous de l'endothélium. La plupart des cellules dans ces stries lipidiques sont des macrophages, associés à des cellules T. La migration, à travers l'endothélium, des leucocytes est un mécanisme inflammatoire fondamental dans l'athérogenèse. Ce processus est en partie médié par l'interaction entre les molécules d'adhésion endothéliales et leurs ligands sur les monocytes [217]. Des études épidémiologiques et des données expérimentales suggèrent que le fer est impliqué dans l'apparition de l'athérosclérose. La relation entre le fer et l'athérosclérose est complexe et reste contradictoire. Le stress oxydant joue un rôle important dans l'étiologie de l'athérosclérose et des métaux de transition tels que le fer aggravent ce stress oxydant. Le fer joue un rôle majeur dans la pathogenèse de l'athérosclérose, principalement en agissant comme un catalyseur pour les modifications des LDL dans l'athérosclérose. En outre, les macrophages jouent un rôle clé dans l'athérogenèse par leur action pro-inflammatoire, qui implique la production d'IL-1 β et du tumor necrosis factor TNF. Dans notre Laboratoire, nous avons démontré que chez les lapins, l'hypercholestérolémie induisait une augmentation tissulaire des taux d'anion superoxyde dans l'aorte. Notre modèle expérimental s'est axé sur le stade très précoce de l'athérogenèse lorsque les macrophages adhèrent à la couche endothéliale [218].

Des cytokines pro-inflammatoires induisent l'absorption du fer par les monocytes et les macrophages. Le fer provoque le recrutement de monocytes au niveau de l'endothélium en modulant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire sur l'endothélium. Les chélateurs de fer limiteraient l'installation de ces événements médiés par le fer [219]. La chélation du fer par la déféroxamine ralentit les premiers stades de l'athérosclérose, probablement en diminuant les niveaux de fer [220]. Les patients atteints de coronaropathie ont des altérations de la vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à la méthacholine par rapport aux sujets témoins sains, et la déféroxamine améliore la réponse du flux sanguin à la méthacholine chez les patients atteints de coronaropathie. Ainsi, la chélation du fer améliore la vasodilatation endothélium-dépendante médiée par le NO chez ces patients [221].

Dans les études cliniques, le rôle spécifique du fer dans l'athérogenèse est souvent controversé [222]. Chez les patients présentant des lésions d'athérosclérose, le fer a été détecté dans les plaques coronaires. Sur des biopsies d'artères coronaires de patients atteints de cardiopathie ischémique et d'athérosclérose, nous avons observé que la teneur en fer était élevée et associée à une augmentation de la peroxydation lipidique [136]. Une majorité de données sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle des taux élevés de fer

pourraient contribuer au développement de l'athérosclérose en tant que facteur dans cette maladie multifactorielle. Toutefois, certaines données épidémiologiques suggèrent que des réserves élevées de fer représentent un facteur de risque indépendant de coronaropathie [223].

3. L'hepcidine, agent cytoprotecteur endogène dans la physiopathologie cardiovasculaire : cibles thérapeutiques possibles?

La présence d'hepcidine dans le flux sanguin soulève des questions sur sa fonction au sein de ces compartiments. Le rôle de l'hepcidine comme agent antimicrobien est bien établi [224] et comme le secteur plasmatique joue un rôle important dans les défenses naturelles contre l'inflammation, il est probable que l'hepcidine ait un rôle dans la protection cellulaire.

Les LPS modulent leurs effets via TLR4, pour l'induction de gènes proinflammatoires. Ces LPS, puissants inducteurs de cytokines proinflammatoires, sont responsables des chocs endotoxiques [225]. Le choc endotoxique est associé à une réponse proinflammatoire et à une hyposidérémie [226]. L'hepcidine a émergé comme le médiateur pathogène possible de l'hyposidérémie. Chez les souris avec cholestase, un prétraitement par hepcidine a renversé les effets indésirables de l'administration de LPS et a ainsi réduit la mortalité précoce. Dans ce modèle expérimental, un prétraitement par hepcidine recombinante a réduit de façon significative les cytokines proinflammatoires induites par les LPS et les lésions hépatocellulaires [227].

La protection myocardique a pour but de prévenir la dysfonction myocardique post-ischémique réversible et la mort cellulaire myocardique irréversible (infarctus du myocarde) qui se produisent à la suite d'une ischémie myocardique et/ou de lésion d'ischémie-reperfusion. La circulation extra-corporelle (CEC) et la période nécessaire d'ischémie-reperfusion au cours des interventions de chirurgie cardiaque sont des situations qui favorisent la majoration du niveau de stress oxydant. Les lésions de reperfusion se produisent, par exemple, après un pontage aorto-coronarien lorsque le myocarde ischémié est à nouveau réalimenté. Ses manifestations les plus graves sont l'arythmie et la sidération myocardique, qui sont associées à la production de radicaux libres [228,229]. Le rôle du fer dans une lésion de reperfusion a été démontré par des preuves indirectes : pendant le syndrome de reperfusion, la liaison du fer à la déféroxamine, un chélateur du fer, protège le myocarde soumis à une séquence d'ischémie-reperfusion. La diminution significative du niveau de l'apoptose dans les cœurs traités par déféroxamine pourrait être considérée

comme une preuve d'un lien étroit entre la chélation du fer, le stress oxydant et la promotion de la mort par apoptose dans les lésions d'ischémie-reperfusion [230,231]. L'hypoxie aboutit à une upregulation importante de l'ARNm de l'hepcidine et de l'expression de la protéine dans le cœur, suggérant que l'hepcidine aurait un rôle important dans le développement des pathologies cardiaques [232]. La circulation extra-corporelle est un modèle pratique et très pertinent pour étudier de nouveaux biomarqueurs d'insuffisance rénale aiguë (IRA). L'hepcidine urinaire a été suggérée comme biomarqueur potentiellement candidat d'IRA [233]. Dans une étude clinique, les relations entre les variations d'hepcidine sérique, les concentrations d'hepcidine urinaire, et le ratio hepcidine/créatinine urinaires ont été examinées dans une cohorte de patients subissant une chirurgie cardiothoracique sous CEC. L'hepcidine urinaire et le rapport hepcidine/créatinine se révèlent être des biomarqueurs d'IRA après CEC, avec une association inverse entre l'augmentation à 24 heures et le risque d'IRA dans les cinq premiers jours post-opératoires [234]. Récemment, il a été rapporté que les taux d'hepcidine sérique et d'hepcidine urinaire augmentaient immédiatement après l'intervention ainsi qu'à 24 heures post-opératoires [235]. Dans cette étude de 100 patients subissant une chirurgie cardiaque, des concentrations basses plasmatique et urinaire d'hepcidine préopératoires étaient des facteurs prédictifs de mortalité intra-hospitalière. Ces résultats suggèrent que l'hepcidine joue un rôle important dans la modulation et la détermination de l'évolution et de l'issue des maladies inflammatoires.

L'insuffisance cardiaque chronique (ICC) est une maladie cardio-vasculaire caractérisée par un taux élevé de mortalité. L'anémie est une comorbidité commune chez ces patients et est associée à un mauvais pronostic. Cependant, la physiopathologie exacte de l'anémie chez ces patients n'est pas encore totalement comprise et représente un processus complexe et multifactoriel [236]. Les patients présentant une ICC et qui deviennent anémiques ont des taux plus élevés d'hepcidine sérique [237].

Au final, comme nous l'avons déjà précisé ci-dessus, plusieurs travaux suggèrent que les concentrations d'hepcidine pourraient être utilisées pour déterminer le risque cardiovasculaire. L'hypothèse actuelle est celle que l'augmentation de la concentration d'hepcidine pourrait aggraver le risque cardiovasculaire en modifiant les concentrations en fer intracellulaires des macrophages et en augmentant leur potentiel athérogène [238].

IV. Objectifs de l'étude

Le rôle et la multiplicité des fonctions attribuées au fer, liées à son métabolisme et à sa régulation dans diverses pathologies à composantes inflammatoires (aiguës et chroniques), soulèvent des questions quant à son implication dans l'initiation et le décours des pathologies cardiovasculaires et notamment en phase aiguë d'infarctus du myocarde (IDM). Il interagirait dans cette pathogenèse à différents niveaux et aurait également un rôle majeur dans la survenue de la dysfonction endothéliale. Son rôle apparaît majeur dans le stress oxydant via ses capacités d'oxydo-réduction. Au cours de ces dernières années, il est apparu que des hormones participeraient de manière majeure dans la régulation de certaines étapes du métabolisme du fer. Ainsi, depuis la découverte de l'hepcidine, de nombreux travaux ont étudié son rôle et son implication dans plusieurs pathologies cardiovasculaires, essentiellement dans l'insuffisance cardiaque. En revanche, seules quelques études ont été réalisées chez des patients en phase aiguë d'IDM. Au cours de nos travaux de Thèse, un nouveau facteur régulateur du métabolisme du fer, l'érythroferrone, assimilé à la myonectine, a été découvert. Parallèlement à nos études qui étaient ciblées sur la relation entre le métabolisme du fer et les incidences fonctionnelles qui caractérisent la phase aiguë de l'IDM, nous avons également souhaité étudier d'autres biomarqueurs émergents du stress oxydant, à savoir les dérivés méthylés de la L-arginine. Ce volet nous a permis d'apprécier de manière biologique la « réactivité » de la cellule endothéliale.

Devant l'opportunité de travailler à la fois dans un laboratoire et dans un environnement clinique disposant d'un observatoire des Infarctus de Côte d'Or (RICO), nous nous sommes proposés d'étudier, chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde, en lien avec les variables biologiques « classiques » et les paramètres cliniques, la signification des paramètres « traditionnels » du statut du fer, des deux protéines impliquées dans la régulation du fer, l'hepcidine et l'érythroferrone (via la myonectine), ainsi que de deux dérivés méthylés de la L-arginine, l'ADMA et la SDMA.

Ainsi, le but de notre travail de Doctorat a été :

- (1) D'identifier et de quantifier les taux circulants d'hepcidine et de myonectine chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde
- (2) De relier ces indices biochimiques circulants aux marqueurs traditionnels représentant le statut et le métabolisme du fer dans l'organisme ainsi qu'aux paramètres fonctionnels recueillis chez ces patients
- (3) D'identifier et de quantifier les taux circulants d'ADMA et de SDMA chez ces patients, de les relier aux paramètres fonctionnels, d'apprécier si ces composés pouvaient

apporter des renseignements dans la validation de la mise en œuvre de certains traitements et d'orienter la prise en charge de ces patients.

Certains rappels, que nous avons évoqués dans cette étude bibliographique, apparaissent dans les revues suivantes où nous apparaissions comme co-auteurs :

1) Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system

Aurélie Gudjoncik^{1,2}, Charles Guenancia^{1,2}, Marianne Zeller¹, Yves Cottin^{1,2}, Catherine Vergely¹ and Luc Rochette¹

¹ Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM) Inserm UMR866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, France

² Service de Cardiologie CHU Bocage, Dijon, France

Parue dans ***Molecular Nutrition & Food Research***. 2014, 00, 1–18.

2) The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target?

Luc Rochette¹, Aurélie Gudjoncik^{1,2}, Charles Guenancia^{1,2}, Marianne Zeller¹, Yves Cottin^{1,2}, Catherine Vergely¹

¹ Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM) Inserm UMR866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, France

² Service de Cardiologie CHU Bocage, Dijon, France

Parue dans ***Pharmacology & Therapeutics***. 146 (2015) 35–52.

Ces revues sont intégrées dans ce document de Thèse ci-après.

REVIEW

Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system

Aurélie Gudjoncik^{1,2}, Charles Guenancia^{1,2}, Marianne Zeller¹, Yves Cottin^{1,2}, Catherine Vergely¹ and Luc Rochette¹

¹ Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM) Inserm UMR866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, France

² Service de Cardiologie CHU Bocage, Dijon, France

The redox state of the cell is predominantly dependent on an iron redox couple and is maintained within strict physiological limits. Iron is an essential metal for hemoglobin synthesis in erythrocytes, for oxidation–reduction reactions, and for cellular proliferation. The maintenance of stable iron concentrations requires the coordinated regulation of iron transport into plasma from dietary sources in the duodenum, from recycled senescent red cells in macrophages, and from storage in hepatocytes. The absorption of dietary iron, which is present in heme or non-heme form, is carried out by mature villus enterocytes of the duodenum and proximal jejunum. Multiple physiological processes are involved in maintaining iron homeostasis. These include its storage at the intracellular and extracellular level. Control of iron balance in the whole organism requires communication between sites of uptake, utilization, and storage. Key protein transporters and the molecules that regulate their activities have been identified. In this field, ferritins and hepcidin are the major regulator proteins. A variety of transcription factors may be activated depending on the level of oxidative stress, leading to the expression of different genes. Major preclinical and clinical trials have shown advances in iron-chelation therapy for the treatment of iron-overload disease as well as cardiovascular and chronic inflammatory diseases.

Received: January 17, 2014

Revised: March 24, 2014

Accepted: April 7, 2014

Keywords:

Cardiovascular / Disease / Iron / Oxidative stress / Redox

1 Introduction

The term “oxidative stress” is frequently used in a number of biochemical, physiological, and pathophysiological situations. It describes the result of increased reactive species production and/or a decrease in their elimination. Indeed, aging is the result of a progressive vicious spiral in which oxidative stress plays a major role. Oxidative stress has been identified as critical in most of the key steps in the pathophysiology of cardiovascular diseases. Whether the cell is considered a unicellular organism or a component of organ tissue, it is possible to distinguish various intracellular sources of free radicals. The generation of reactive oxygen species (ROS) is significantly enhanced in the failing myocardium, as has been unequivocally shown by studies of human patients [1–3]. A large body of evidence shows the involvement of cellular free radicals in the redox regulation of normal physiological functions as well as the pathogenesis of various diseases [4]. Oxidative stress is associated with an imbalance of prooxidant factors and direct and/or indirect antioxidants. Thus, cells have developed an elaborate intracellular antioxidant defense system to protect themselves from oxidative damage. The redox state of the cell is predominantly dependent on

Correspondence: Dr. Luc Rochette, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM) Inserm UMR866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France
E-mail: Luc.rochette@u-bourgogne.fr

Abbreviations: AF, atrial fibrillation; ALA, 5-aminolevulinic acid; ALAS, ALA synthase; AMI, acute myocardial infarction; CHF, chronic heart failure; CO, carbon monoxide; CRT, cardiac resynchronization therapy; DAMPs, damage-associated molecular patterns; DMT1, divalent metal transporter 1; EPO, erythropoietin; ESA, erythropoietin-stimulating agent; FPN1, ferroportin 1; FRDA, Friedreich's ataxia; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; HIF, hypoxia-inducible factor; HO, heme oxygenase; ICD, immunogenic cell death; ID, iron deficiency; IRPs, iron regulatory proteins; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; MI, myocardial infarction; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NF- κ B, nuclear factor kappa B; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NOX, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; Nrf2, nuclear factor erythroid-related factor 2; PLC, phospholipase C; RNOS, reactive nitrogen and oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; SR, sarcoplasmic reticulum; Tf, transferrin; TfR, Tf receptor; TLR, toll-like receptor; Trx, thioredoxin

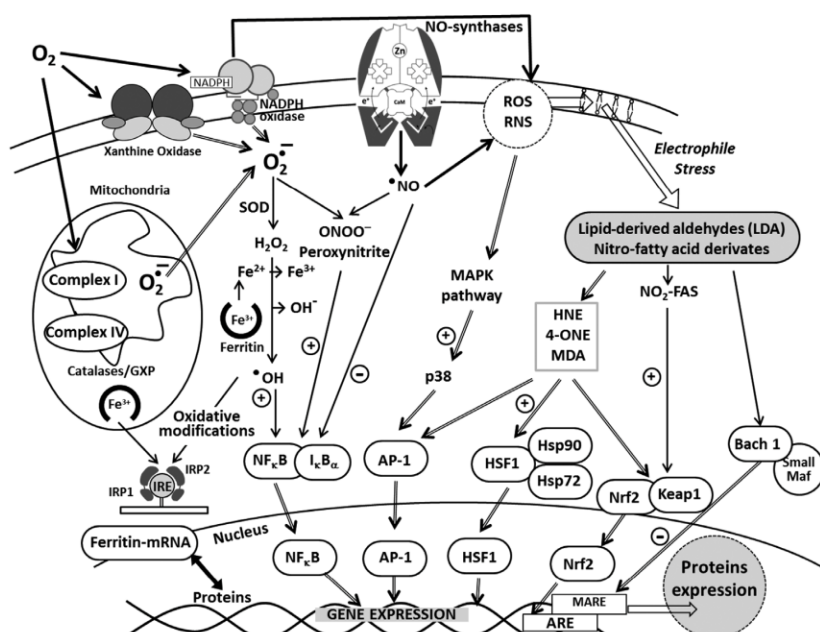


Figure 1. Diagram showing elements of the unifying mechanisms of adaptive response to oxidative and electrophile stress; oxidative modifications associated with iron metabolism. ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; endogenous and exogenous electrophiles/activators (see text for more details) can alter transcription factors and signaling complexes (AP-1, HSF1, NF- κ B/I- κ B, Nrf2-Keap1, and Bach-1). Subsequent nuclear translocation and the induction of ARE-driven genes result in upregulated environmental stress response and protein expression. IRP1 and IRP2 regulate expression of iron metabolism genes. The regulation of ferritin synthesis by iron is mainly due to posttranscriptional regulation through the binding of IRP1 and IRP2 to an iron-responsive elements (IRE) located in the 5' UTR of ferritin mRNA.

an iron (and copper) redox couple and is maintained within strict physiological limits [5]. Within the cells, iron is in a dynamic equilibrium mainly between four compartments as follows: vesicular iron, the labile iron pool, functional iron, and storage iron [6]. It is of pivotal importance to understand (1) the possible mechanisms of how different iron compartments may be implicated in local oxidative stress and (2) the spatial and temporal constraints of reactive species signaling, and the functional role of the antioxidant responses.

2 Sources and metabolism of reactive nitrogen and oxygen species (RNOS) and redox signaling

2.1 ROS and reactive nitrogen species (RNS)

The cellular (reduction–oxidation) redox environment refers to the reduction potential or reducing capacity in cellular compartments (Fig. 1). Cellular redox status is regulated by the balance between cellular oxidant and reductant levels. Oxidative and reductive stress can trigger redox cascades and affect the environment of the cell, for example, exposure to various xenobiotics might determine if a cell will proliferate, differ-

entiate, or die [7]. Free radicals have emerged as important regulators of many physiological and pathological processes through redox processes. High levels of free radical production that overwhelm cellular antioxidant defense systems may damage biomolecules, and deregulate signaling pathways. Oxidative stress occurs during a profusion of pathological processes, including cardiovascular disease, atherosclerosis, diabetes, inflammation, and apoptosis [8].

2.1.1 Definition and sources of ROS and RNS

Free radicals can be defined as molecules or compounds that contain one or more unpaired electron thus making them highly reactive. Radicals derived from oxygen (ROS) and nitrogen (RNS: derived from nitric oxide [NO]) are the largest class of radical species generated in living systems; ROS and RNS are collectively referred to as RNOS. RNOS are products of cell metabolism and have either beneficial or deleterious effects, depending on the concentration reached in the area of the cells [9, 10]. RNOS include superoxide ($O_2^{\cdot-}$), the hydroxyl radical ($\cdot OH$), carboxyl radical ($CO_2^{\cdot-}$), $\cdot NO$, and ($\cdot NO_2$) as well as the nonradical species hydrogen peroxide

(H₂O₂), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen, and carbon monoxide (CO).

Several cell sources produce ROS under normal physiological conditions, including the mitochondrial electron transport chain, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX), cytochrome P450, lipoxygenases, cyclooxygenases, xanthine oxidases, peroxisomal enzymes, and, under certain conditions, endothelial NO synthases (NOSs) [11]. Five multiprotein complexes constitute the respiratory chain embedded in the inner membrane of the mitochondria. Complexes I and III are the main sites of O₂^{•−} generation. An important source of ROS produced in endothelial cells is from oxidases (xanthine oxidases, NADPH oxidases). Xanthine oxidase catalyzes the sequential hydroxylation of hypoxanthine to yield xanthine and uric acid. The enzyme exists in two forms that differ primarily in their oxidizing substrate. The dehydrogenase form is preferentially used. Activation of NADPH oxidases is increased in the stimulation of a number of cell surface receptors, such as the angiotensin II receptor, which is particularly important in hypertension and heart failure. Upon stimulation by angiotensin II, the activity of NADPH oxidases is increased in endothelial and smooth muscle cells, suggesting that in the presence of an activated renin–angiotensin system (either local or circulating), dysfunction due to increased vascular production of superoxide anions is to be expected [12, 13]. The stimulation of angiotensin receptor 1 by angiotensin II may lead to phospholipase C and D activation, both of which produce diacylglycerol. Phospholipase C also produces inositol triphosphate. Diacylglycerol and IP₃-mediated calcium release activates protein kinase C [14]. Phosphorylation of the p47phox subunit by protein kinase C is required to enable binding of this subunit with others and thus to activate NADPH oxidases.

The major RNS is endothelium-derived [•]NO. Under physiological conditions, in the presence of substrate (L-arginine) and cofactors (tetrahydrobiopterin) endothelial NOS produces [•]NO. It is a potent gaseous mediator widely accepted as a key determinant of endothelial function produced by endothelial NOSs. Enzymatic sources of ROS implicated in disease are uncoupled NOSs (which generate injurious superoxide rather than vasoprotective NO), xanthine oxidoreductase, mitochondrial respiratory enzymes, and NADPH oxidase. Of the many ROS-generating enzymes, NADPH oxidase, of which there are seven homologues (termed Nox 1–5, Duox1,2), appears to be particularly important in cardiovascular disease [15]. NO has potent vasodilator, anti-inflammatory, and anti-thrombotic properties [16, 17]. The free radical [•]NO has a half-life of only a few seconds in an aqueous environment. [•]NO reacts with molecular oxygen and ROS to generate a range of oxidation products. One well-characterized RNS-forming reaction is that of [•]NO with O₂^{•−}. This reaction occurs at nearly diffusion-limited rates to produce peroxynitrite, ONOO[−], which itself is strongly oxidizing, and when protonated, undergoes homolytic scission to produce hydroxyl radical ([•]OH) and nitrogen dioxide ([•]NO₂). Additional reac-

tive radicals derived from other endogenous molecules such as CO and hydroperoxyl can be formed in living systems.

2.1.2 Controls of ROS and RNS: enzymatic and nonenzymatic components

The rigorous control of ROS levels is essential for cell survival owing to the toxicity of ROS at high levels. Elaborate intracellular antioxidant defense systems exist in the different parts of the cells to protect cells from oxidative damage. An antioxidant can be defined as any substance that when present in very low concentrations compared to that of an oxidizable substrate significantly delays or inhibits the oxidation of that substrate. A complex network of antioxidants includes both enzymatic and nonenzymatic components that regulate ROS production within the cell, both spatially and temporally. The transcriptional control of the antioxidant enzyme system is another key mechanism in the maintenance of cell redox homeostasis. Normal cells maintain redox homeostasis with low basal ROS levels and have spare antioxidant capacity to cope with higher levels of ROS and RNS. The antioxidants can be endogenous or exogenous, for example, ingested in the diet or as dietary supplements. Some dietary compounds that do not neutralize free radicals, but enhance endogenous activity may also be classified as antioxidants. There is intense interest in flavonoids due to their antioxidant and chelating properties and their possible role in the prevention of chronic and age-related diseases.

An endogenous scavenger, such as glutathione, exists in both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) states. The balance between GSH/GSSG and pyridine nucleotides (NADH/NAD, NAD(P)H/NADP) determines the cellular redox status and the level of oxidative stress [18]. Nonenzymatic antioxidants can be classified further into directly acting antioxidants (e.g., scavengers and chain-breaking antioxidants) and indirectly acting antioxidants (e.g., chelating agents). Antioxidants scavenge free radicals, thus preventing free radical chain reactions. Antioxidant vitamins (i.e., vitamins C, E, A, and folic acid) are involved in some of the main defense mechanisms of the body's nonenzymatic antioxidant systems. Several other antioxidants (N-acetylcysteine, lipoic acid, and glutathione) are able to reduce lipid peroxidation products [19–21]. Antioxidant defense enzymes, such as heme oxygenase 1 (HO-1), catalase, superoxide dismutase (SOD), peroxiredoxin, and glutathione reductase, are able to cause a significant decrease in lipid peroxidation products. The vascular wall also contains these various enzymes that can reduce the ROS burden [22].

Oxidative stress is able to induce deleterious modifications in a variety of cellular compounds: DNA, lipids, and proteins. ROS can attack endogenous molecules indirectly by reacting with cellular membrane phospholipids, resulting in the generation of secondary reactive intermediates. Phospholipids are present at high concentrations within PUFA residues and have been identified as prime targets for oxidation.

Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal are the major products of lipid peroxidation (Fig. 1) [23]. Malondialdehyde is suggested to have both mutagenic and carcinogenic effects [24] while 4-hydroxynonenal is proposed to have an effect on cellular signal transduction pathways. Lipids are susceptible to oxidative degradation caused by radicals, and during autoxidation (peroxidation) the chain reaction is mediated by peroxy radicals causing damage to biomembrane integrity. Endogenous antioxidants provide an active system of defense against lipid peroxidation. However, the effectiveness of their antioxidant action depends on several parameters, including localization. In this respect, the functions of endogenous antioxidant vitamins are very important as they are involved in the temporal and spatial monitoring of oxidative metabolic processes. Vitamin E (α -tocopherol) acts as a “chain-breaking” antioxidant in that it forms an α -tocopherol radical that stops the propagation of lipid peroxidation. α -Tocopherol radical can be converted back to vitamin E by the potent antioxidants vitamin C (ascorbic acid) and glutathione [25, 26]. Oxidative stress is associated with dysfunction of the mitochondria and ER, inducing apoptosis and protein misfolding. Mitochondria are endowed with an elaborate and well-defined multilevel antioxidant defense system of enzymes and nonenzymes to quench ROS. The scavenging system includes a number of endogenous processes that involve SODs, GSH, and thioredoxin (Trx) systems; peroxidases; and catalases. The major antioxidant enzymes possess transition metals or selenium in their active center. For example, there are three forms of SOD present in humans: cytosolic Cu, Zn-SOD, mitochondrial Mn-SOD, and extra cellular-SOD.

2.2 Transition metals and oxidative stress

Transition metals, including iron, copper, manganese, zinc, and selenium, play a prominent role in cell metabolism. Iron and copper participate in the Fenton reaction as an electron donor to hydrogen peroxide with the subsequent production of a potent ROS species, the hydroxyl radical. Iron is implicated in catalytic processes that stem from its redox reactivity, which enables it to transition between a reduced ferrous and oxidative ferric state [27]. Maintaining cellular iron content requires precise mechanisms to regulate its uptake, storage, and export. The amount of iron absorbed by enterocytes depends on the body's demands. One mechanism involved in iron homeostasis is regulated not only by cellular iron status, but also by ROS in cells that elicit defense mechanisms against iron toxicity and iron-catalyzed oxidative stress [28].

Like iron, copper is a redox-active metal that can transit from a reduced Cu^{1+} form to an oxidized Cu^{2+} state. Copper is critical in many cellular processes, including antioxidant defenses and iron oxidation. Cellular copper levels must also be tightly controlled, as the accumulation of copper can lead to oxidative stress [29]. Manganese is an essential trace metal and cofactor for the mitochondrial antioxidant enzyme Mn-SOD, as well as other enzymes, such as arginine synthase.

MnSOD appears to be an important contributor to cardiac mitochondrial and metabolic functions by reducing mitochondrial oxidative stress [30]. Selenium is an essential nutritional element to mammals, in that it is necessary for the active function of different oxidant enzymes, including glutathione peroxidase (GPx) and Trx reductases. Eight different isoforms of GPx (GPx1–8) have been identified in humans. GPx1 is the most abundant isoform and is present in the cytoplasm of many mammalian tissues where it reduces hydrogen peroxide to water [31]. Redox homeostasis is crucial for cell viability and normal cell function and is maintained by two major cellular antioxidant systems, including the glutathione system and the Trx system. Thioredoxin reductase reduces its major substrate Trx, but can also transfer electrons to low molecular weight compounds. Thioredoxin-dependent peroxidoreductins are the first-line defense against ROS and ONOO[−] and regulate H_2O_2 -mediated signal transduction. H_2O_2 can act as either a destructive oxidant or a second messenger [32].

2.3 RNOS and mitochondria

The mitochondria are the major source of ROS production within the cell, and high levels of ROS production are probably associated with a variety of pathophysiological conditions. The majority of ROS in the heart appear to come from uncoupling of the mitochondrial electron transport chain at the level of complexes I and III, although the view that mitochondria are a major source of intracellular ROS has been challenged [33]. When ROS production exceeds the capacity of detoxification, oxidative damage to proteins, DNA (mtDNA and nDNA), and membrane lipids occurs [34]. Each mitochondrion has two specialized membranes the outer mitochondrial membrane and the inner mitochondrial membrane that encloses the matrix. There is a narrow intermembrane space between these two membranes. The outer mitochondrial membrane is a major source of ROS in particular by complexes I and III and monoamine oxidases (mostly the A isoform), thus contributing to the ROS generated by mitochondria under pathological conditions. Under physiological conditions, the production of ROS is estimated to account for about 2–5% of the total oxygen uptake by the organism [35].

Phospholipids, and especially cardiolipin, are crucial for mitochondrial energy metabolism. Indeed, among the specific phospholipids, cardiolipin is known to provide essential structural and functional support to several proteins involved in oxidative phosphorylation [36]. Cardiolipin also plays an active role in mitochondria-dependent apoptosis by interacting with cytochrome c. Cardiolipin and cytochrome c can form a complex called cytochrome c–cardiolipin peroxidase that under oxidative stress can lead to the release of cytochrome c, a proapoptotic factor.

Oxidative stress accompanied by calcium overload and ATP depletion induces mitochondrial permeability transition with the formation of pathological, nonspecific mitochondrial permeability transition pores in the mitochondrial inner

Table 1. Nonheme and heme sources of iron

Nonheme iron food source			Heme iron food source		
Food	ng/100 g	%DV	Food	ng/100 g	%DV
Chocolate (dark)	17	97	Lamb liver	23	129
Parsley	10	55	Oysters	6.6	37
Soybeans	9	50	Beef liver	6.1	34
Lentils	9	50	Beef lean only	3.6	20
Beans navy	7.5	41	Beef 85% lean	2.6	14
Beans black	6.7	37	Chicken	1.1	6
Grapes (dry) seedless	3.3	18	Tuna	0.9	5
Dandelion	3.2	17	Crab	0.9	5
Spinach	2.7	15	Pork	0.8	5
Bread (white)	2	11	Shrimp	0.3	2

DV, daily value.

DVs are reference numbers developed by the Food and Drug Administration (FDA).

membrane [37]. It has been demonstrated that a specific NOS (mitochondria NOS) was localized in cardiac mitochondria [38]. NO has multiple targets in mitochondria, including metalloproteins containing iron–sulfur (Fe–S) clusters that are highly sensitive to direct oxidative modification by NO [39]. The ability of mitochondria NOS to regulate mitochondrial O₂ uptake and H₂O₂ production through the interaction of NO with the respiratory chain has recently been studied [40].

3 Iron metabolism and oxidative stress

3.1 Body iron metabolism

3.1.1 Nutritional sources of iron

The maintenance of stable extracellular and intracellular iron concentrations requires the coordinated regulation of iron transport into plasma from dietary sources in the duodenum, from recycled senescent red cells in macrophages, and from storage in hepatocytes. In humans, the most widely used indices of Fe status are hemoglobin concentration, transferrin saturation, and serum ferritin. Iron deficiency (ID) and its associated anemia may contribute to reduced energetic efficiency, lower aerobic capacity, decreased endurance, and fatigue.

ID is the most common nutritional deficiency in the world. When iron intake fails to meet physiological or increased demands for iron, for example, owing to bleeding or inadequate absorption, iron stores become depleted and ID develops. Various types of ID exist in clinical conditions. Common classification differentiates between absolute iron deficiency, functional iron deficiency, and iron sequestration [41]. Oral iron therapy is often adequate to treat absolute iron deficiency and mild to moderate cases of ID. In cases of severe ID, anemia of chronic disease, and functional iron deficiency, intravenous (iv) iron therapy is often more effective. A number of oral and iv iron preparations are available. Oral iron preparations include iron(II) salts, polysaccharide iron(III) complexes, and

combinations of iron, for example, with folic acid or vitamin C [42].

There are three sources of iron in the diet: native food iron (either heme or nonheme iron), fortification iron (nonheme iron that has been intentionally added to food during manufacture), and contaminant iron (nonheme that is unintentionally incorporate into food as a result of either chemical reactions or mechanical processing during food preparation) [43]. A variety of nonheme and heme sources of iron are listed in Table 1. The chemical forms of iron in food influence the amount absorbed through the gastrointestinal tract and into the bloodstream. The relatively low bioavailability of iron from cereal grains and legumes is attributed to the phytic acid content of these foods. Significant data indicate that inhibitors of iron absorption include phytate, polyphenols, soy protein, and calcium, and enhancers include animal tissue and ascorbic acid [44]. Nutritional iron comes from two sources, heme and nonheme. Heme iron is obtained from meat sources and is more readily absorbed than nonheme iron obtained from the consumption of grains and vegetables. Heme is absorbed as the stable porphyrin complex that is unaffected by other food components. Heme is hydrophobic and thus has been proposed to diffuse passively through plasma membranes.

The absorption of heme iron is five to ten times greater than that of nonheme iron. Although heme represents only 10–15% of dietary iron in meat-eating populations, it may account for nearly 40% of total absorbed iron. Because the absorption of heme iron is constant and independent of meal composition, the contribution of heme iron can be readily calculated from dietary records [45].

Recently, however, an intestinal heme transporter was identified and named heme carrier protein 1. This transporter is abundantly expressed on the brush border of enterocytes in the duodenum [46]. Concerning nonheme iron, it exists in the form of “free” complexes. The absorption of iron is markedly influenced both by the iron status of the subject and a great number of dietary factors. The absorption of iron from the diet is thus determined more by meal composition than by the amount of iron present in the diet.

Eight enzymes, which are divided between the mitochondria and cytoplasm, are involved in the heme biosynthesis pathway. Heme is generated in the mitochondrial matrix. The first step in mammalian heme biosynthesis is catalyzed by the enzyme 5-aminolevulinate acid (ALA) synthase (ALAS). ALAS catalyzes the condensation of glycine with succinyl-CoA to form ALA and CO₂. The mature protein is located in the mitochondrial matrix. Once ALA is produced by ALAS, it is exported out of the mitochondrial matrix to reach the second pathway enzyme. The terminal step of heme synthesis is the insertion of ferrous iron into the protoporphyrin IX macrocycle to produce protoheme IX (heme) [47]. This is catalyzed by the enzyme ferrochelatase that is synthesized in the cytoplasm as a preprotein and is translocated to the mitochondrial matrix, where it is associated with the inner mitochondrial membrane [48].

3.1.2 Importance of heme oxygenases in enterocytes

Despite the clear importance of dietary heme as a source of body iron, the mechanism by which the enterocyte takes up heme and catabolizes it to utilize the iron is poorly understood. Heme is degraded inside internalized vesicles within 2–3 h of heme uptake by receptor-mediated endocytosis. The role of HO localized in enterocytes has now been demonstrated [49]. HO is an enzyme that catalyzes the mixed function oxidation of heme using cytochrome P-450; NADPH; and molecular oxygen producing CO, iron, and biliverdin [50]. Three isoforms of HO have been characterized: an inducible form (HO-1), which is upregulated especially in the spleen and liver in response to various types of stress, and two constitutive forms (HO-2 and HO-3). HO-1 and HO-2 are the products of distinct genes (*ho-1*, *ho-2*, also specified as *hmx1*, *hmx2*). HO-1 occurs at a high level of expression in the spleen and other tissues that degrade senescent red blood cells, including specialized reticuloendothelial cells of the liver and bone marrow, but is also present in enterocytes [51]. HO-2 is constitutively expressed in selected tissues (brain, liver, gut, and testis) and is involved in signaling and regulatory processes. HO-2 has three cysteine residues that have been proposed to modulate the affinity for heme, whereas HO-1 has none. It is likely that the cysteine residues in HO-2 are involved in some form of protein–protein interactions related to the signaling roles of the protein [52]. The existence of a third HO isoform, HO-3, was reported in the rat. The HO-3 transcript was found in a series of organs, including spleen, liver, kidney, and brain [53]. Clearly, it appears that the role of HO-1 and HO-2 in enterocytes needs to be investigated in pathological situations.

3.1.3 Physiopathological consequences of iron deficiency or accumulation

Iron is necessary for cells due to its ability to transport oxygen and electrons. Recently, the health effects of iron ex-

cess or deficiency have received increased attention as iron has been purported to play a role in the etiology of several chronic diseases, including diabetes, cardiovascular disease, and cancer. Iron has relevant biological functions, for example, the formation of hemoglobin, myoglobin, and numerous enzymatic groups. For a long time, the influence of ID was underestimated especially in terms of the worsening of cardiovascular diseases and the development of anemia. In contrast and paradoxically, excess iron accumulation causes organ dysfunction through the production of ROS. The iron redox couple mediates the transfer of single electrons through the reversible oxidation/reduction reactions of Fe²⁺ and Fe³⁺. Iron is an essential metal for hemoglobin synthesis in erythrocytes, oxidation–reduction reactions, and cellular proliferation [54].

The total amount of iron in a 70-kg adult is approximately 4 g, of which two thirds is the iron in red blood cells and 300 mg is in the myoglobin of muscles. The majority of this iron comes from the recycling of senescent erythrocytes by macrophages of the reticuloendothelial system (about 20 mg/day; Fig. 2). Most of the iron in plasma is directed to the bone marrow for erythropoiesis. More than 2 million new erythrocytes are produced every second by the bone marrow, requiring a daily supply of at least 20–30 mg of iron. Therefore, a majority of the iron comes from the recycling of senescent erythrocytes by macrophages of the reticuloendothelial system. Only 1–2 mg of the daily iron supply is derived from intestinal absorption, which, under a steady state, is sufficient only to replace the insensible iron loss. Significant amounts of iron are also present in macrophages (up to 600 mg), whereas excess body iron (~1 g) is stored in the liver. To ensure adequate iron content, mammalian cells regulate iron levels through uptake and export (Fig. 3). Macrophages export Fe²⁺ from their plasma membrane via ferroportin (FPN), in a process coupled by reoxidation of Fe²⁺ to Fe³⁺ by ceruloplasmin and followed by the loading of Fe³⁺ to transferrin (Tf). Tf is the major iron transporter protein in the body [55]. Exported iron is scavenged by Tf that maintains Fe³⁺ in a redox-inert state and delivers it into tissues. Iron enters the cell from the bloodstream in a complex with Tf, which binds to Tf receptor (TfR) on the plasma membrane, followed by receptor-mediated endocytosis [4, 56, 57]. Under physiological conditions, plasma Tf is hyposaturated (to approximately 30%) and displays a very high iron-binding capacity. TfR expression is controlled by a variety of cellular conditions, including iron and oxygen status.

The absorption of dietary iron, which is present in either a heme or nonheme form, is carried out by mature villus enterocytes of the duodenum and proximal jejunum. Much of the iron that enters the lumen of the duodenum in the diet is in the oxidized or ferric form and, therefore, must be reduced before it can be taken up by enterocytes [58]. The reduction of iron is probably carried out enzymatically by a brush border ferric reductase. Identification of the transporters and other proteins functioning in the absorption of dietary nonheme and heme iron has greatly enhanced the

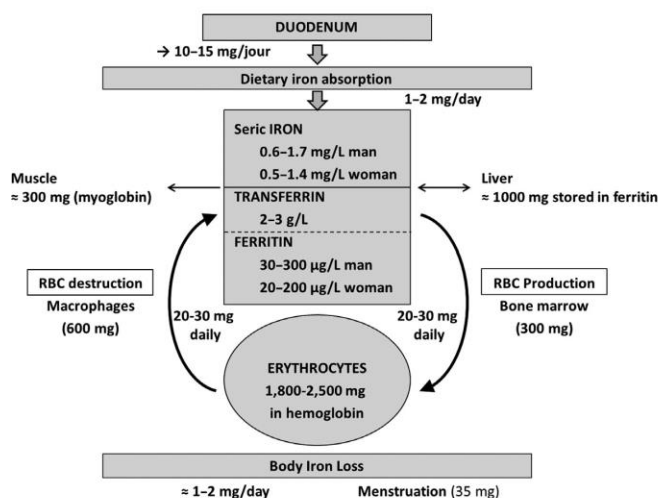


Figure 2. Iron distribution in the adult human body. A 70-kg adult has about 4 g of total body iron. Most of iron is circulating in the hemoglobin of the red blood cell (RBC). The body absorbs only 1–2 mg daily from a diet containing 10–15 mg of iron.

understanding of this process, which is central to the control of body iron content. Nonheme iron is absorbed through the action of divalent metal transporter 1 (DMT1) and duodenal cytochrome b, which are mammalian plasma ferric reduc-

tase enzymes that catalyze the reduction of ferric to ferrous ion in the process of iron absorption. These reductases are present at the apical membrane in the proximal small intestine. There are two isoforms of DMT1 protein that differ at

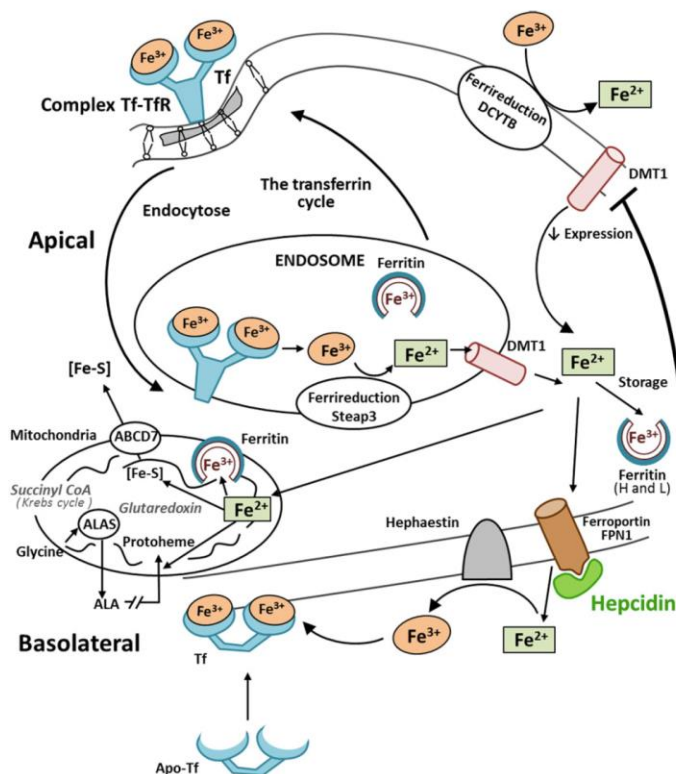


Figure 3. Control of iron homeostasis in the enterocyte. Fe^{3+} -Tf binds to TfR on the cell surface and undergoes receptor-mediated endocytosis. The released Fe^{3+} is reduced to Fe^{2+} by the ferrireductase 6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3 within the endosome before export from the endosome by a DMT1. Fe^{2+} that is not utilized or stored in ferritin is exported from the endosome by a DMT1. Fe^{2+} that is not utilized or stored in ferritin is exported from the endosome by a DMT1. Inside the mitochondrial matrix, Fe can be directed to different pathways, including iron-sulfur (Fe-S) cluster biogenesis. The clusters in the mitochondria are tightly regulated by a transporter: ATP-binding cassette transporter. The first step in mammalian heme biosynthesis is catalyzed by the enzyme ALAS. ALAS catalyzes the condensation of glycine with succinyl-CoA to form ALA and CO_2 . The terminal step of heme synthesis is the insertion of Fe^{2+} into the protoporphyrin to produce protoheme (heme).

their C-terminus. They have tissue-specific roles in iron absorption and exhibit different subcellular trafficking [59]. The amount of iron absorbed by enterocytes is influenced by a variety of factors, including variations in body iron stores, red cell levels, hypoxia, inflammation, and pregnancy [60].

The Tf–TfR complex is internalized to a unique endosomal compartment where acidification leads to the release of ferric iron. The ferric iron is then reduced to ferrous iron and transported across the endosomal membrane by the DMT1. The endosomal ferrireductase responsible for the reduction of ferric iron in erythroid cells was recently identified as the 6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3 (Steap3) protein [61].

Multiple physiological processes are involved in maintaining iron homeostasis. These include its storage at the intracellular and extracellular levels. The control of iron balance in the whole organism requires communication between sites of uptake, utilization, and storage [62]. Key protein transporters and the molecules that regulate their activities have recently been identified. Ferritins and hepcidin are the major regulator proteins.

Ferritins are composed of 24 subunits that fold in a 4-helical bundle to form an almost spherical protein shell. Ferritin can accumulate up to 4500 iron atoms as a ferrihydrite mineral in a protein shell and releases these iron atoms when there is an increase in the cell's need for bioavailable iron [63, 64] (Fig. 4A). There is a strong equilibrium between ferritin-bound iron (Fe^{3+}) and the labile iron pool in cells (Fe^{2+}), by which ferritin prevents the formation of ROS mediated by the Fenton reaction. Various cell types contain a transient cytosolic pool of iron, presumably bound to low molecular mass intracellular chelates, such as citrate, various peptides, ATP, AMP, or pyrophosphate. This labile iron pool is redox-active. The concentration of this labile iron pool is determined by the rates of iron uptake, utilization for incorporation into iron proteins (cytosol, mitochondria, and nucleus), storage in ferritin, and iron export from the cell.

Two functionally and genetically distinct ferritin subunits exist as follows: L-ferritin and H-ferritin (also known as light chain and heavy chain ferritin). Ferritin is found in the cytoplasm, nucleus, and mitochondria of cells. Serum ferritin has been thought to reflect iron stores in the body and to increase as a secreted byproduct of intracellular ferritin synthesis. Even though cellular iron is stored primarily in the cytoplasm, mitochondria use most of the metabolically active iron [65].

Because of its important function in the storage of iron, ferritin is ubiquitous in tissues, serum, and in multiple other locations within the cell. Iron is imported through endocytosis of Fe^{3+} -loaded Tf, which interacts with TfRs in a tightly regulated feedback loop. Iron regulatory proteins 1 and 2 (IRP1 and IRP2) record cytosolic iron concentrations and posttranscriptionally regulate the expression of iron metabolism genes. These actions are implicated in the optimization of cellular iron availability. IRP1 and IRP2 bind to iron-responsive elements located in regions of mRNAs that

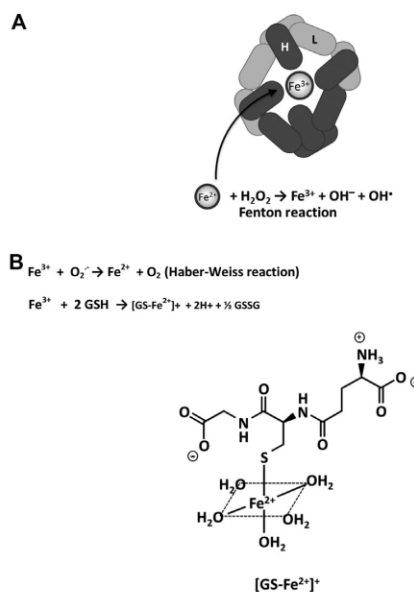


Figure 4. Ferritin and iron metabolism. (A) Ferritin is composed of 24 subunits that can be heavy (H) or light (L), with various ratios of H to L in different cell types and physiological conditions. Ferritin H has ferroxidase activity to convert Fe^{2+} to Fe^{3+} inside ferritin. Ferritin, when binding a $[4\text{Fe-4S}]$ cluster, is a functioning (cytoplasmic) aconitase. The majority of iron–sulfur (Fe–S) clusters are made in the mitochondria. (B) Fe^{3+} is rapidly reduced to Fe^{2+} in the presence of glutathione, the reducing of GSH being sufficient to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} at pH 7. GS– Fe^{2+} binds to glutaredoxins, proteins that are required for iron cluster assembly and heme biosynthesis.

encode proteins involved in iron uptake, storage, utilization, and export (Fig. 1) [62]. Iron metabolism is also transcriptionally regulated by the action of hypoxia-inducible factors (HIFs) that consist of a cytosolic protein (HIF-1 α) and a nuclear HIF-1 β subunit and form a DNA-binding heterodimer [66].

The recently discovered iron regulatory hormone, hepcidin, plays a critical role in controlling iron absorption through its ability to bind to and control the cell surface expression of FPN, FPN being a transmembrane protein that transports ferrous iron. Produced by the liver and secreted into the bloodstream, hepcidin regulates iron metabolism by inhibiting iron release from cells, including duodenal enterocytes. Human hepcidin is a 25 amino acid peptide. The structure of bioactive hepcidin is a simple hairpin with eight cysteines that form four disulfide bonds in a ladder-like configuration [67]. When iron stores are adequate or high, the liver produces hepcidin that circulates to the small intestine. The iron exporter FPN is required for iron transport from iron exporting cells. However, ferrous iron must be oxidized to ferric iron by ferroxidases before the iron can bind to Tf.

FPN is also the receptor for hepcidin [68]. Hepcidin binds to FPN1, which is present on the cell surface, and induces the phosphorylation of FPN, thus triggering the internalization of the hepcidin–FPN complex, leading to the ubiquitination and lysosomal degradation of both proteins. Hepcidin deficiency results in the development of systemic iron overload caused by excessive iron absorption. In the absence of hepcidin, FPN expression on the basolateral surface of enterocytes is increased, thus increasing the transport of dietary iron into the plasma. Copper-containing ferroxidase hephaestin assists by converting Fe^{2+} to Fe^{3+} that is then bound by Tf. Moreover, HIF-1 α and HIF-2 α have been shown to increase intestinal iron absorption, iron uptake into erythroid progenitors and heme synthesis, and to suppress hepcidin production thus ensuring an adequate supply of iron to support erythropoiesis [69,70]. Besides being produced by the liver, hepcidin is also believed to be produced by macrophages, fat cells, and the heart, but at a much lower level. The relevance of the extrahepatic production of hepcidin is still unclear, but it could play a role in the local regulation of iron fluxes [71].

3.2 Mitochondria and iron

Mitochondria represent a significant store of iron within cells, as iron is required for the functioning of respiratory chain protein complexes. The mechanism for intracellular iron trafficking to mitochondria is incompletely understood. It is accepted that cells use iron in mitochondria for the synthesis of heme and iron–sulfur (Fe–S) clusters (Fig. 3). The sequential flow of electrons in the respiratory chain, from a low reduction potential substrate to O_2 , is mediated by protein-bound redox cofactors. In mitochondria, heme, together with flavin, iron–sulfur, and copper cofactors mediates this multielectron flow [72]. The insertion of a ferrous iron atom into the porphyrin macrocycle by the enzyme ferrochelatase creates heme. It is now well demonstrated that mitochondria perform crucial roles in iron metabolism in that they synthesize heme, assemble iron–sulfur (Fe/S) proteins, and participate in cellular iron regulation [73]. Fe–S clusters are important cofactors of numerous proteins involved in electron transfer, and metabolic and regulatory processes [74].

The respiratory chain relies on iron-containing redox systems in the form of complexes I–III with Fe–S clusters and cytochromes with heme as prosthetic groups. As we previously reported, Complexes I and III are the main sites of $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation. Complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) oxidizes NADH from the tricarboxylic acid cycle and β -oxidation, and transports protons across the inner membrane. It is a major contributor to the cellular production of ROS. The redox reaction of complex I is catalyzed in the hydrophilic domain; it comprises NADH oxidation by a flavin mononucleotide. The energy transduction by complex I comprises NADH oxidation by a flavin mononucleotide, intramolecular electron transfer from the flavin to bound quinone along a chain of (Fe–S) clusters, quinone reduction, and proton translocation

[75]. Apart from complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase), the mitochondrial cytochrome bc1 complex (complex III; ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase) has been identified as the main producer of superoxide and ROS within the mitochondrial respiratory chain. The formation and assembly of the respiratory chain enzymes is a complicated process that requires the assistance of a multitude of additional proteins and Fe–S clusters. The trafficking and storage of Fe–S clusters in the mitochondria is tightly regulated by a transporter: ATP-binding cassette transporter [76]. Furthermore, complex III generated ROS seem to act as second messengers in the context of cardioprotective ischemic and pharmacological preconditioning [77].

Studies have investigated changes in systemic iron homeostasis in animals and humans with cardiovascular diseases and characterized the intrinsic defects in iron regulatory pathways of failing cardiomyocytes. It has been demonstrated that the accumulation of iron in mitochondria can cause or exacerbate cardiomyopathy. This is the case in Friedreich's ataxia (FRDA), a human genetic disease caused by GAA triplet expansion in the FXN gene-causing frataxin deficiency [78]. Frataxin deficiency in FRDA causes mitochondrial iron dysmetabolism. Treatment of patients with a combination of the mitochondria-permeable iron chelator deferiprone and an antioxidant partially reversed the cardiac phenotype observed in FRDA, thus supporting the role of mitochondrial iron in the pathophysiology of cardiac dysfunction. In heart failure, it has been demonstrated that iron accumulated in the mitochondria. The activities of mitochondrial Fe–S cluster proteins were reduced in these hearts, and the defect in complex III activity was specifically attributed to the lack of an Fe–S cluster center [79]. On the basis of a number of biochemical arguments, it has been suggested that GSH plays a role in iron metabolism (Fig. 4B). However, it was concluded that GSH might not be directly involved or play an essential role in iron delivery to the mitochondrion [80]. Fe^{3+} is rapidly reduced to Fe^{2+} in the presence of GSH: the reducing potential of GSH being sufficient to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} at pH 7. In addition to an Fe^{2+} buffering role, Fe^{2+} -GS (glutathione synthase) binds to glutaredoxins, proteins that are required for iron cluster assembly and heme biosynthesis.

4 Oxidative stress and cardiomyocytes

4.1 Cardiomyocyte viability

During the early postnatal period, cardiomyocyte replication in the mammalian myocardium becomes undetectable. The number of cardiomyocytes of mature mammalian heart remains constant throughout life [81]. In adult hearts, mitotic division of cardiac myocytes appears undetectable as cardiomyocytes become terminally differentiated. The majority of mature cardiomyocytes are growth arrested at the G0 or G1 phase. The population of cardiomyocytes was thought to remain stable in number and with a one-to-one ratio to the

number of capillary microvessels providing oxygen and substrate delivery, not only during postnatal physiological growth of the heart, but also in the adult heart [82]. In these conditions, persistent stress leads to an ultrastructural remodeling in which cardiomyocyte death exceeds cardiomyocyte renewal, resulting in progressive heart failure. Recently, studies revealed that mammalian cardiomyocytes retain some capacity for division and identified endogenous cardiac progenitor cells in the heart; but the turnover rate of these cells is certainly limited. However, there is no consensus yet about the possibility of new cardiac myocyte generation [83].

Major sources of ROS are present in the myocardium [3], and paradoxically, a low level of antioxidant defenses exists in this tissue compared with other tissues such as liver. The activities of three enzymes (SODs, catalases, and GPx), which are able to detoxify activated oxygen, were determined in both the heart and liver. Cardiac muscle contains 150 times less catalase and nearly four times less SOD than does the liver. GPx activities were, however, similar in the two tissues [84, 85]. In myocardium, as in some other tissues, the reaction of radicals in the presence of O₂, or singlet oxygen, with some amino acids, peptides, and proteins yields hydroperoxides. Protein hydroperoxides are capable of initiating further radical chain reactions both intra- and intermolecularly, in particular in cardiomyocytes, thus inducing heart failure [86].

In cardiomyocytes, the mitochondria are located near calcium-release sites on the sarcoplasmic reticulum (SR) and can capture a large quantity of the released calcium. Accumulating evidence supports the critical role of biochemical cross-talk between the SR and mitochondria in normal cardiomyocyte viability and excitation contraction (EC) coupling. The SR and mitochondria have different individual functions, but the coordination between these two cellular organelles is essential to support synchronous cardiomyocyte contraction/relaxation and to facilitate adaptation to changing metabolic demands. Mitochondrial ROS production can modify EC coupling. A number of Ca²⁺ channels or transporters, and also myofilaments are sensitive to redox modifications [87]. Furthermore, mitochondrial ion channels, such as the inner mitochondrial anion channel, the permeability transition pore, or uncoupling proteins, are activated by ROS [88].

Another mechanism related to oxidative stress and concerning the myocardium is immunity. Although autoimmunity is a well-established pathogenetic mechanism in several endocrine, rheumatic, and neurological disorders, it has only recently gained more attention in cardiac diseases. Recent studies suggest that the heart possesses an intrinsic system that is intended to limit tissue injury. It is suggested that this intrinsic stress response is mediated, at least in part, by a family of pattern recognition receptors that belong to the innate immune system [89]. Depending on individual genetic predisposition, heart-directed autoimmune reactions are supposed to emerge as a consequence of cardiomyocyte injury induced by inflammation, ischemia, or exposure to cardiotoxic substances [90].

The discovery and characterization of the toll-like receptor (TLR) family has led to better understanding of the innate immune system and its function in the different organs, such as those of the cardiovascular system. Through these TLRs, cardiomyocytes respond to endogenous or exogenous signals that may influence the pathophysiological responses to dilated cardiomyopathy [91]. Moreover, heart failure of diverse origin is also now recognized to have an important immune component, with TLR signaling influencing the process of cardiac remodeling and prognosis. Therefore, the inhibition of TLR signaling may be of great therapeutic benefit in several forms of heart failure [92].

4.2 RNOS, cardiomyocytes, and reticulum stress

The ER is an organelle that plays an essential role in many cellular processes, such as the folding of secretory and membrane proteins, calcium homeostasis, and lipid biosynthesis. The ER supports the biosynthesis of approximately one third of all cellular proteins in eukaryotic cells. To achieve the proper folding of proteins, the lumen of the ER is a special environment [93]. Evidence of an intimate relationship between the ER and mitochondria has accumulated. These close contacts establish extensive physical links that allow the exchange of lipids and calcium and they coordinate pathways involved in cell life and death [94]. Various factors, such as oxidative stress and disturbances of calcium homeostasis, both of which interfere with ER function, lead to the accumulation of unfolded proteins. The resulting ER stress triggers the unfolded protein response [95]. Conditions that perturb cellular energy levels, the redox state or Ca²⁺ concentration reduce the protein folding capacity of the ER. Cells have evolved a series of adaptive and protective strategies. If unresolved, ER stress is lethal to cells via ER stress-induced apoptosis [96].

The important role of maintaining Ca²⁺ homeostasis within the cell is consequently dependent upon the ER and its many Ca²⁺-binding chaperones, including heat shock proteins (HSP) and calreticulin (CRT). CRT is integral to the quality control of protein folding and Ca²⁺ storage and release within the ER. CRT is a central Ca²⁺-buffering protein that regulates Ca²⁺ storage and release within the ER [97]. Cell-surface CRT exposure is an important process that targets the cell for immunogenic cell death (ICD) [98]. The translocation of CRT to the cell surface can be induced by anthracyclines. Furthermore, CRT regulates the activity of Ca²⁺-ATPase, providing dynamic control of ER Ca²⁺ homeostasis [99, 100].

5 Cellular signaling in the cardiovascular system

5.1 (NADPH) oxidases and free radicals

All NOX family members are transmembrane proteins that transport electrons across biological membranes to reduce

oxygen to superoxide. There are conserved structural properties of NOX enzymes that are common to all family members, but activation mechanisms and tissue distribution of the different members of the family are markedly different [101]. The physiological functions of NOX family enzymes include cellular signaling, regulation of gene expression, and cell differentiation. NOX enzymes contribute to a wide range of pathological processes, such as the regulation of immunomodulation and cellular proliferation [102].

As we reported, the generation of $O_2^{\cdot-}$ and NO may lead to the production of the harmful molecule $ONOO^-$. It may result in S-nitrosylation and tyrosine nitration of proteins with a concomitant change in their function. It is a potent trigger of oxidative protein, DNA damage, including DNA strand breakage and base modification. It activates the nuclear enzyme poly-ADP ribose polymerase, resulting in energy depletion and apoptosis/necrosis of cells. Peroxynitrite has been associated with the regulation of cell death [103, 104].

5.2 Oxidative stress, immunogenic regulation, and transcription factors

A variety of transcription factors may be activated as a result of oxidative stress, leading to the expression of different genes, including those for growth factors, inflammatory cytokines, chemokines, cell cycle regulatory molecules, and anti-inflammatory molecules. A new concept of ICD has recently been proposed. The immunogenic characteristics of this cell death mode are mediated mainly by damage-associated molecular patterns (DAMPs), most of which are recognized by pattern recognition receptors. Some DAMPs (e.g., CRT and adenosine triphosphate) are actively emitted by cells undergoing ICD, whereas others are emitted passively (e.g., high-mobility group box 1 protein) [105]. Some DAMPs, such as high-mobility group box 1 protein, can be inactivated by oxidation. The ability of anticancer drugs such as anthracyclines to induce ICD was shown to depend on the induction of ER stress. The combined action of ROS and ER stress activates danger signaling pathways that help to traffic DAMPs to the extracellular space. The immunogenicity of ICD was found to be diminished in the presence of antioxidants [106].

In order to prevent oxidative stress, the cell must respond to ROS by activating an antioxidant defense system. Antioxidant enzymes play a major role in reducing ROS levels. The redox regulation of transcription factors is thus significant in determining the gene expression profile and cellular response to oxidative stress. Increasing the cellular antioxidant capacity by upregulating antioxidant detoxification genes is critical in cellular adaptation to oxidative stress and protection from oxidative damage. The antioxidant genes are regulated by a highly homologous enhancer termed the antioxidant responsive element (ARE), or electrophile response element [107]. Bach 1, a transcription factor, forms a heterodimer with Maf (*Musca domestica* antifungal) oncoproteins and binds to the Maf-recognition element (MARE). Among the various tran-

scription factors, the activation of nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) is decisive for a wide range of processes associated with oxidative stress.

5.2.1 Nrf2

The Nrf2-Keap1 (Kelch-like erythroid cell derived protein with CNC homology (ECH) associated protein 1) signaling pathway (Nrf2-Keap1 system) is one of the most important cell defense and survival pathways. This system is a key factor for cell protection from oxidative and electrophilic insults that contribute to maintain the redox cellular microenvironment [108]. Nrf2 binding to ARE elements also triggers antioxidant programs that scavenge intracellular ROS [109]. Nrf2 is referred to as the “master regulator” of the antioxidant response, modulating the expression of hundreds of genes, including not only the familiar antioxidant enzymes, but large numbers of genes that control numerous processes, such as immune and inflammatory responses [110]. It is important to point out that the redox-dependent Nrf2 system plays a central role for HO-1 induction in response to oxidative stress. There are several critical regulatory domains present in a 10-kb region of the 5'-flanking sequence of the HO-1 gene. Two of the most highly studied enhancer regions, called E1 and E2, contain stress-response elements that structurally resemble the ARE. The major positive transcriptional regulator of the HO-1 gene that acts on StREs is Nrf2. Nrf2 is ubiquitinated by forming a complex with Keap1. Keap1 targets Nrf2 for ubiquitin-dependent degradation and, hence, represses Nrf2-dependent gene expression. Some HO-1 inducers of oxidative stress may prevent Keap1-dependent degradation of Nrf2, thereby resulting in the nuclear accumulation Nrf2. Accumulated or stabilized Nrf2 may bind to StRE regions to form complexes with the small Maf proteins, leading to the initiation of HO-1 gene transcription [111]. In response to nitrosative stress, the activation of Nrf2 signaling leads to the induction of HO-1 as a protective mechanism against inflammatory damage. LPS-induced inducible NOS (iNOS) expression was suppressed by pretreatment with HO-1 inducers in Nrf2^{+/+} macrophages [112].

5.2.2 NF- κ B

The activation of NF- κ B transcription factor is critical for a wide range of processes, such as immunity and inflammation, as well as cell development, growth, and survival. NF- κ B transcription factors consist of homo- or heterodimers of a group of five proteins, namely p65, RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 and its precursor p105), and NF- κ B2. The NF- κ B pathway is activated by a variety of stimuli, including cytokines, ionizing radiation, and oxidative stress. Redox modulations of the NF- κ B pathway have been widely demonstrated. Oxidative stress can lead to chronic

inflammation by activating a variety of transcription factors, including NF- κ B, and inflammation itself has a reciprocal relationship with oxidative stress [113].

Under basal conditions, NF- κ B is contained in the cytoplasm by inhibitors of NF- κ B (I- κ B). In response to a wide range of signals, the regulatory NF- κ B subunits, p50 and p65, dissociate from I- κ B and subsequently translocate to the nucleus. In the absence of stimuli, NF- κ B is found in cytoplasm bound to the inhibitory I- κ B proteins (I- κ B α , I- κ B β , I- κ B γ , I- κ B δ , and Bcl3) [114]. In response to stimuli, including cytokines, mitogens, and oxidative stress, I- κ B proteins are rapidly phosphorylated by I- κ B kinase. Oxidative stress results in lipid peroxidation products or the depletion of reduced GSH and subsequent increases in cytosolic oxidized forms. GSSG, which is produced in response to oxidative stress, causes rapid ubiquitination and phosphorylation and thus subsequent degradation of I- κ B, which is a critical step for NF- κ B activation. By modulating a wide variety of transcription factors, cellular metabolism may be regulated.

In summary, Nrf2 modulates the anti-inflammatory cascade through the inhibition of NF- κ B, and regulates cellular antioxidant responses. Oxidative stress and inflammation are two components of the natural host response to injury and are important etiologic factors in atherogenesis. The Nrf2/ARE pathway has been identified as an endogenous atheroprotective system for antioxidant protection and the suppression of redox sensitive inflammatory genes [115].

6 Iron metabolism and cardiovascular diseases

Dysfunction in the failing myocardium may result from oxidative stress disequilibrium. Growing evidence suggests that modifications in oxidative stress may be induced by ionic metals, such as iron. In patients with heart failure consecutive to dilated cardiomyopathy, we demonstrated alterations in iron levels in different parts of the myocardium and that these were related to functional parameters. These findings revealed a relationship between iron metabolism disturbances and the severity of heart diseases [3].

6.1 Coronary heart diseases (CHDs)

Observational studies have indicated that higher exposure to iron may be associated with a higher risk of CHD. The epidemiologic evidence, however, is still ambiguous. Some studies have found no association or an inverse association between iron and CHD incidence or mortality. Recently, the characteristics of 32 separate cohorts from 21 studies were reported [116]. In this quantitative meta-analysis of prospective cohort studies, total iron intake was inversely associated with the incidence of CHD, whereas heme-iron intake was positively associated with incidence. Nonheme iron was not found to be associated with CHD incidence. In contrast, heme iron

increased the risk of CHD. An hypothesis of these results is in relation with the iron bioavailability, heme iron is absorbed at a much greater rate than is nonheme iron [117].

It has been proposed that a state of sustained iron depletion or mild ID exerted a primary protective action against CHD—the so called “iron hypothesis”; the protective effect of iron depletion, which may have multiple beneficial consequences, is due to decreased availability of redox-active iron in vivo. One persistent criticism of the iron hypothesis is that atherosclerosis may not be a prominent feature of hereditary hemochromatosis (HH). HH is a clinically and genetically heterogeneous late-onset autosomal recessive disorder that leads to excess iron accumulation in multiple tissues, including the heart. Epidemiological evidence of the possible effect of HFE gene variations on CHD is equivocal. HH can be caused by HFE mutations, and HFE gene variations were shown to be associated with CHD and atherosclerosis [118, 119]. Recently, the goal of one study was to assess the contribution of four HFE gene variants to the risk of CHD. Some HFE gene mutations were shown to be associated with iron overload and CHD [120]. Interestingly, HFE mutations were associated with a 70% increased risk of CHD in women but not in men [121].

One of the most interesting aspects of CHD epidemiology is the gender difference. In all age groups, women have a lower risk of myocardial infarction (MI) than do men. Epidemiological observations and the results of recent controlled clinical trials suggest that it is not estrogen that protects women. An alternative hypothesis was suggested, namely that the lower risk of heart disease in women may be due to gender differences in iron metabolism. It has been suggested that lower body iron stores, and not the loss of ovarian function, explained the differences between men and women in the development of CHD [122].

6.2 MI

Studies indicate that high consumption of red and/or processed meat is related to an increased risk of cardiovascular death. These associations have been ascribed, at least partly, to the heme iron content in red meat [123]. Prospective studies have investigated the association between heme iron and nonheme iron intake and the risk of fatal and nonfatal AMI (where AMI is acute MI). The results did not support the hypothesis that dietary iron in general increases the risk of coronary disease. They suggested, however, that a high intake of heme iron was associated with an increased risk of MI [124, 125]. A recent prospective study examined heme iron and nonheme iron intake in relation to the risk of fatal and nonfatal AMI separately. In this study, a positive association between heme iron intake and fatal AMI was particularly pronounced in men with low intakes of calcium, magnesium, and zinc. It was hypothesized that in the conditions of low mineral intake, the interactions between iron and mineral intake may lead to increased iron absorption [126].

6.3 Arrhythmia

Left ventricular and atrial function in patients with pathologies, such as HH or β -thalassemia, may be affected directly by iron deposition. The association between cardiac arrhythmia and HH has been well documented. Most of the published studies have described cases of cardiac arrhythmia in the presence of heart failure due to iron overload. The main clinical finding was progressive congestive heart failure (CHF) with arrhythmia, and autopsy confirmed excessive siderosis of the heart [127]. It is therefore difficult to determine whether the cardiac arrhythmia detected in subjects with HH is directly linked to systemic iron overload rather than to heart failure. Recently, a study reported that the incidence of both supraventricular and ventricular ectopy tended to be greater in the combined HH groups than in age- and gender-matched volunteer control subjects [128].

In thalassemia, electrocardiogram abnormalities are common. Heart rate modifications and prolonged corrected QT interval (QTc) were present, regardless of cardiac iron status. Repolarization abnormalities, including QT/QTc prolongation, left shift of the T-wave axis, and interpretation of ST/T-wave morphology, were the strongest predictors of cardiac iron [129]. Concerning the incidence of iron overload on atrial functions, studies have demonstrated that atrial volume and function are decreased in these conditions. In subjects without detectable cardiac iron, the left atrial ejection fraction declined with age [130]. Patients suffering from iron-overload cardiomyopathy have impaired systolic and diastolic function, and increased susceptibility to atrial fibrillation (AF). The development of AF remains poorly understood and is likely to vary significantly among different AF pathologies. AF is classified as paroxysmal (paroxysmal AF, PAF), persistent, or permanent AF depending on the timing and duration of episodes. In all these pathologies, studies have documented the long-term benefits of iron-chelation therapy on electrocardiographic abnormalities [131, 132].

6.4 Anemia in patients with heart disease

Approximately one third of patients with CHF and 10–20% of those with CHD also have anemia [133]. The treatment of anemia in patients with CHF and reduced left ventricular ejection fraction has traditionally focused on erythropoietin-stimulating agents (ESAs) [59]. Recently, large randomized controlled trials of ESA and iv iron supplementation therapy have been completed. ESA therapy did not show any improvement in clinical outcomes, but iv iron supplementation may be of benefit in improving HF symptoms [134]. In patients with CHF, erythropoietin (EPO) is highly expressed, and a close correlation between EPO and CHF has been demonstrated [135]. The correction of anemia with EPO has reduced morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease, and recent studies have shown that the same approach was not always beneficial in CHF patients. The use of EPO in

patients with cardio-renal-anemia syndrome was associated with an increased risk of death, along with a trend toward an increased risk of CV events and stroke [136].

6.5 Atherosclerosis

The mechanism whereby iron may stimulate atherogenesis has been intensively investigated. Many excellent reviews on current knowledge with regard to atherosclerosis are available. Atherogenesis is characterized by inflammatory changes, leading to plaque formation and then to plaque rupture and arterial thrombosis. Atherosclerotic lesions are preceded by fatty streaks, accumulations of lipid-burdened cells, below the endothelium. Most of the cells in these fatty streaks are macrophages, together with T cells. The transendothelial migration of leukocytes is a fundamental inflammatory mechanism in atherogenesis. This process is in part mediated by the interaction between endothelial adhesion molecules and their ligands on monocytes [137]. Epidemiological studies and experimental data suggest that iron is involved in the onset of atherosclerosis. The relationship between iron and atherosclerosis is complex and remains contradictory. Oxidative stress has been implicated in the etiology of atherosclerosis, and transition metals such as iron aggravate oxidative stress. Iron plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis, primarily by acting as a catalyst for the atherogenic modification of LDL. Furthermore, macrophages play a key role in atherogenesis through their proinflammatory action, which involves the production of IL-1 β and tumor necrosis factor. In our laboratory, we demonstrated that in rabbits, hypercholesterolemia induced increased levels of superoxide iron deposition in the aorta. Our experimental model focused on the very early stage of atherogenesis when macrophages adhere to the endothelial layer [138].

Proinflammatory cytokines induce iron uptake by monocytes and macrophages. Iron promotes monocyte recruitment at the endothelium by modulating the expression of cell adhesion molecules on the endothelium. Iron chelators prevent these iron-mediated events [139].

Experimental evidence, relating to molecular chemistry, supports the oxidative hypothesis of atherosclerosis: excess iron generates oxidative stress and contributes to the pathogenesis of the disease. In clinical trials, the evidence concerning the specific role of iron in atherogenesis is often contradictory [140]. In patients with atherosclerotic lesions, iron has been detected in coronary plaques. In biopsied coronary arteries of patients with ischemic cardiomyopathy and atherosclerosis, we observed that iron content was high and associated with an increase in lipid peroxidation [1]. A majority of data are consistent with the hypothesis that high iron levels may contribute to atherosclerosis as one factor in a multifactorial disease. However, some epidemiological data suggest that high-stored iron levels are an independent risk factor for coronary artery disease [141]. In addition, iron-chelation therapy using desferrioxamine has been shown to slow down

the early stages of atherosclerosis, probably by decreasing iron levels [142]. Patients with coronary artery disease had impaired endothelium-dependent vasodilation in response to methacholine compared with healthy control subjects, and deferoxamine improved the blood flow response to methacholine in patients with coronary artery disease. Iron chelation thus appeared to improve NO-mediated, endothelium-dependent vasodilation in these patients [143].

7 Conclusions

If oxidative events are the basis for a number of pathologies, the evident therapy for all of them should be the use of antioxidants. However, no clear benefit of antioxidant therapy has yet been demonstrated in clinical intervention studies [144]. In contrast, it appears that iron plays a central role in the formation and the scavenging of ROS and RNS. It is therefore important to understand the mechanisms associated with the development of dysfunctional iron homeostasis. It is of pivotal importance to understand the precise mechanisms of how different iron compartments may be implicated in local oxidative stress. Iron-chelation therapy may present a novel way to interrupt the cycle of catalytic iron-induced oxidative stress and tissue injury [145, 146]. Iron chelators may be of therapeutic benefit in many pathological conditions. Advances have been made in major preclinical and clinical trials on iron-chelation therapy for the treatment of iron-overload disease as well as cardiovascular and chronic inflammatory diseases.

The authors wish to thank Martine Goiset for secretarial assistance and Philip Bastable for English assistance. This work was supported by grants from French Ministry of Research, from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and from the Régional Council of Burgundy.

The authors have declared no conflict of interest.

8 References

- [1] Rochette, L., Tatou, E., Vergely, C., Maupoil, V. et al., Regional heterogeneity of decreased myocardial norepinephrine and increased lipid peroxidation levels in patients with end-stage failing heart secondary to dilated or ischemic cardiomyopathy. *J. Heart Lung Transplant.* 2008, 27, 767–774.
- [2] Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S., Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011, 301, H2181–H2190.
- [3] Rochette, L., Tatou, E., Maupoil, V., Zeller, M. et al., Atrial and vascular oxidative stress in patients with heart failure. *Cell. Physiol. Biochem.* 2011, 27, 497–502.
- [4] Koskenkorva-Frank, T. S., Weiss, G., Koppenol, W. H., Burckhardt, S., The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, 65, 1174–1194.
- [5] Santos, C. X., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C. et al., Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 50, 777–793.
- [6] Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., Loreal, O., Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1820, 403–410.
- [7] Schafer, F. Q., Buettner, G. R., Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 1191–1212.
- [8] Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., Rossi, R., Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2009, 46, 241–281.
- [9] Halliwell, B., Gutteridge, J. M., The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 18, 125–126.
- [10] Vergely, C., Maupoil, V., Clermont, G., Bril, A., et al., Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003, 420, 209–216.
- [11] Montezano, A. C., Touyz, R. M., Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012, 110, 87–94.
- [12] Oudot, A., Martin, C., Busseuil, D., Vergely, C. et al., NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 40, 2214–2222.
- [13] Richard, C., Lauzier, B., Delemasure, S., Talbot, S. et al., Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008, 52, 278–285.
- [14] Lyle, A. N., Griendling, K. K., Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 2006, 21, 269–280.
- [15] Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., Guzik, T. J., Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul. Pharmacol.* 2012, 56, 216–231.
- [16] Gkaliagkousi, E., Ferro, A., Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front. Biosci.* 2011, 16, 1873–1897.
- [17] Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J. C., Cottin, Y. et al., Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013.
- [18] Madamanchi, N. R., Runge, M. S., Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, 61C, 473–501.
- [19] Halliwell, B., Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc. Res.* 2000, 47, 410–418.

- [20] Ghibu, S., Richard, C., Vergely, C., Zeller, M. et al., Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009, *54*, 391–398.
- [21] Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M. et al., Direct and indirect antioxidant properties of alpha-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, *57*, 114–125.
- [22] Li, H., Horke, S., Forstermann, U., Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013, *34*, 313–319.
- [23] Schopfer, F. J., Cipollina, C., Freeman, B. A., Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem. Rev.* 2011, *111*, 5997–6021.
- [24] Riggins, J. N., Marnett, L. J., Mutagenicity of the malondialdehyde oligomerization products 2-(3'-oxo-1'-propenyl)-malondialdehyde and 2,4-dihydroxymethylene-3-(2,2-dimethoxyethyl)glutaraldehyde in *Salmonella*. *Mutat. Res.* 2001, *497*, 153–157.
- [25] Halliwell, B., Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 2011, *32*, 125–130.
- [26] Sharma, M. K., Buettner, G. R., Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, *14*, 649–653.
- [27] Rines, A. K., Ardehali, H., Transition metals and mitochondrial metabolism in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013, *55*, 50–57.
- [28] Terman, A., Kurz, T., Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013, *18*, 888–898.
- [29] Uriu-Adams, J. Y., Keen, C. L., Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* 2005, *26*, 268–298.
- [30] Wenzel, P., Schuhamacher, S., Kienhofer, J., Muller, J. et al., Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 2008, *80*, 280–289.
- [31] Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M., Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1830*, 3289–3303.
- [32] Sengupta, R., Holmgren, A., Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013, *18*, 259–269.
- [33] Brown, G. C., Borutaite, V., There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 2012, *12*, 1–4.
- [34] Camara, A. K., Bienengraeber, M., Stowe, D. F., Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Front. Physiol.* 2011, *2*, 13.
- [35] Drose, S., Brandt, U., Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, *748*, 145–169.
- [36] Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, *48*, 1286–1295.
- [37] Javadov, S., Kuznetsov, A., Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin d. *Front. Physiol.* 2013, *4*, 76.
- [38] Kanai, A. J., Pearce, L. L., Clemens, P. R., Birder, L. A. et al., Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, *98*, 14126–14131.
- [39] Bouton, C., Chauveau, M. J., Lazereg, S., Drapier, J. C., Recycling of RNA binding iron regulatory protein 1 into an aconitase after nitric oxide removal depends on mitochondrial ATP. *J. Biol. Chem.* 2002, *277*, 31220–31227.
- [40] Zaobornyj, T., Ghafourifar, P., Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012, *303*, H1283–H1293.
- [41] Weiss, G., Goodnough, L. T., Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, *352*, 1011–1023.
- [42] Qunibi, W. Y., The efficacy and safety of current intravenous iron preparations for the management of iron-deficiency anaemia: a review. *Arzneimittelforschung* 2010, *60*, 399–412.
- [43] Heath, A. L., Fairweather-Tait, S. J., Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2002, *15*, 225–241.
- [44] Lim, H. H., Yang, S. J., Kim, Y., Lee, M. et al., Combined treatment of mulberry leaf and fruit extract ameliorates obesity-related inflammation and oxidative stress in high fat diet-induced obese mice. *J. Med. Food* 2013, *16*, 673–680.
- [45] Sharp, P. A., Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2010, *80*, 231–242.
- [46] Latunde-Dada, G. O., Simpson, R. J., McKie, A. T., Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem. Sci.* 2006, *31*, 182–188.
- [47] Ishizuka, M., Abe, F., Sano, Y., Takahashi, K. et al., Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int. Immunopharmacol.* 2011, *11*, 358–365.
- [48] Byrne, S. L., Krishnamurthy, D., Wessling-Resnick, M., Pharmacology of iron transport. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013, *53*, 17–36.
- [49] Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 1969, *244*, 6388–6394.
- [50] Rochette, L., Cottin, Y., Zeller, M., Vergely, C., Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol. Ther.* 2013, *137*, 133–152.
- [51] West, A. R., Oates, P. S., Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008, *23*, 150–158.
- [52] Varfaj, F., Lampe, J. N., Ortiz de Montellano, P. R., Role of cysteine residues in heme binding to human heme oxygenase-2 elucidated by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 2012, *287*, 35181–35191.
- [53] Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y. et al., Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004, *336*, 241–250.

- [54] Buehler, P. W., Alayash, A. I., Redox biology of blood revisited: the role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity. *Antioxid. Redox. Signal.* 2005, **7**, 1755–1760.
- [55] Iancu, T. C., Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism. *J. Neural. Transm.* 2011, **118**, 329–335.
- [56] Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Mammalian iron transport. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, **66**, 3241–3261.
- [57] Bayeva, M., Chang, H. C., Wu, R., Ardehalii, H., When less is more: novel mechanisms of iron conservation. *Trends Endocrinol. Metab.* 2013, **24**, 569–577.
- [58] Knutson, M. D., Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.* 2010, **30**, 149–171.
- [59] McKie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A. et al., An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001, **291**, 1755–1759.
- [60] Frazer, D. M., Anderson, G. J., Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005, **289**, G631–G635.
- [61] Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., Fleming, M. D., The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood* 2006, **108**, 1388–1394.
- [62] Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., Leibold, E. A., Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, **1823**, 1468–1483.
- [63] Koorts, A. M., Viljoen, M., Ferritin and ferritin isoforms I: structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch. Physiol. Biochem.* 2007, **113**, 30–54.
- [64] Watt, R. K., Hilton, R. J., Graff, D. M., Oxidoreduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, **1800**, 745–759.
- [65] MacKenzie, E. L., Iwasaki, K., Tsuji, Y., Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox. Signal.* 2008, **10**, 997–1030.
- [66] Peyssonnaud, C., Nizet, V., Johnson, R. S., Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle* 2008, **7**, 28–32.
- [67] Ganz, T., Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2006, **507**, 29–35.
- [68] Ganz, T., Systemic iron homeostasis. *Physiol. Rev.* 2013, **93**, 1721–1741.
- [69] Evstatiev, R., Gasche, C., Iron sensing and signalling. *Gut* 2012, **61**, 933–952.
- [70] Palaneeswari, M. S., Ganesh, M., Karthikeyan, T., Devi, A. J., Mythili, S. V., Hepcidin-minireview. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013, **7**, 1767–1771.
- [71] Ganz, T., Nemeth, E., Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, **1823**, 1434–1443.
- [72] Kim, H. J., Khalimonchuk, O., Smith, P. M., Winge, D. R., Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, **1823**, 1604–1616.
- [73] Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J. et al., The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, **1823**, 1491–1508.
- [74] Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H. P., Hausmann, A. et al., Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, **1763**, 652–667.
- [75] Hirst, J., Mitochondrial complex I. *Annu. Rev. Biochem.* 2013, **82**, 551–575.
- [76] Berry, E. A., De Bari, H., Huang, L. S., Unanswered questions about the structure of cytochrome bc1 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, **1827**, 1258–1277.
- [77] Halestrap, A. P., Clarke, S. J., Khaliulin, I., The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, **1767**, 1007–1031.
- [78] Michael, S., Petrocine, S. V., Qian, J., Lamarche, J. B. et al., Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum* 2006, **5**, 257–267.
- [79] Elas, M., Bielanska, J., Pustelny, K., Plonka, P. M. et al., Detection of mitochondrial dysfunction by EPR technique in mouse model of dilated cardiomyopathy. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, **45**, 321–328.
- [80] Hider, R. C., Kong, X., Iron speciation in the cytosol: an overview. *Dalton Trans.* 2013, **42**, 3220–3229.
- [81] Buja, L. M., Vela, D., Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc. Pathol.* 2008, **17**, 349–374.
- [82] Rakusan, K., Cicutti, N., Flanagan, M. F., Changes in the microvascular network during cardiac growth, development, and aging. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1994, **40**, 117–122.
- [83] Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ. Res.* 2011, **109**, 941–961.
- [84] Doroshow, J. H., Locker, G. Y., Myers, C. E., Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J. Clin. Invest.* 1980, **65**, 128–135.
- [85] Noeman, S. A., Hamooda, H. E., Baalash, A. A., Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011, **3**, 17.
- [86] van Heerebeek, L., Franssen, C. P., Hamdani, N., Verheugt, F. W. et al., Molecular and cellular basis for diastolic dysfunction. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2012, **9**, 293–302.
- [87] Gao, W. D., Liu, Y., Marban, E., Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 1996, **94**, 2597–2604.
- [88] Dorn, G. W., 2nd, Maack, C., SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013, **55**, 42–49.
- [89] Mann, D. L., Topkara, V. K., Evans, S., Barger, P. M., Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell

- tolls. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2010, **121**, 34–50; discussion 50–31.
- [90] Jahns, R., Boivin, V., Schwarzbach, V., Ertl, G. et al., Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008, **41**, 454–461.
- [91] Vallejo, J. G., Role of toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Clin. Sci.* 2011, **121**, 1–10.
- [92] Liu, Y. Y., Cai, W. F., Yang, H. Z., Cui, B. et al., Bacillus Calmette-Guerin and TLR4 agonist prevent cardiovascular hypertrophy and fibrosis by regulating immune microenvironment. *J. Immunol.* 2008, **180**, 7349–7357.
- [93] Ron, D., Walter, P., Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007, **8**, 519–529.
- [94] Vannuvel, K., Renard, P., Raes, M., Arnould, T., Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J. Cell. Physiol.* 2013, **228**, 1802–1818.
- [95] Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A. E. et al., Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2013, **301**, 215–290.
- [96] Gorman, A. M., Healy, S. J., Jager, R., Samali, A., Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol. Ther.* 2012, **134**, 306–316.
- [97] Wang, W. A., Groenendyk, J., Michalak, M., Calreticulin signaling in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012, **44**, 842–846.
- [98] Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O. et al., Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2012, **12**, 860–875.
- [99] Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., Su, T. P., MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 2009, **19**, 81–88.
- [100] Simmen, T., Lynes, E. M., Gesson, K., Thomas, G., Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta* 2010, **1798**, 1465–1473.
- [101] Bedard, K., Krause, K. H., The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007, **87**, 245–313.
- [102] Paletta-Silva, R., Rocco-Machado, N., Meyer-Fernandes, J. R., NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, **14**, 3683–3704.
- [103] Ascenzi, P., di Masi, A., Sciorati, C., Clementi, E., Peroxynitrite—An ugly biofactor? *Biofactors* 2010, **36**, 264–273.
- [104] Ahmad, R., Rasheed, Z., Ahsan, H., Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2009, **31**, 388–396.
- [105] Krysko, O., Love Aaes, T., Bachert, C., Vandenabeele, P. et al., Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2013, **4**, e631.
- [106] Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P. et al., ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? *Trends Mol. Med.* 2012, **18**, 589–598.
- [107] Ray, P. D., Huang, B. W., Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 2012, **24**, 981–990.
- [108] Kensler, T. W., Wakabayashi, N., Biswal, S., Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007, **47**, 89–116.
- [109] Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsui, M. et al., Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 2004, **24**, 7130–7139.
- [110] Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., McCord, J. M., Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.* 2011, **32**, 234–246.
- [111] MacLeod, A. K., McMahon, M., Plummer, S. M., Higgins, L. G. et al., Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* 2009, **30**, 1571–1580.
- [112] Ashino, T., Yamanaka, R., Yamamoto, M., Shimokawa, H. et al., Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages. *Mol. Immunol.* 2008, **45**, 2106–2115.
- [113] Kim, Y. W., West, X. Z., Byzova, T. V., Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J. Mol. Med.* 2013, **91**, 323–328.
- [114] Gloire, G., Piette, J., Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2009, **11**, 2209–2222.
- [115] Freigang, S., Ampenberger, F., Spohn, G., Heer, S. et al., Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammatory activation and exacerbation of atherosclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2011, **41**, 2040–2051.
- [116] Hunnicutt, J., He, K., Xun, P., Dietary iron intake and body iron stores are associated with risk of coronary heart disease in a meta-analysis of prospective cohort studies. *J. Nutr.* 2014, **144**, 359–366.
- [117] Cook, J. D., Adaptation in iron metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990, **51**, 301–308.
- [118] Ellervik, C., Tybjaerg-Hansen, A., Grande, P., Appleyard, M. et al., Hereditary hemochromatosis and risk of ischemic heart disease: a prospective study and a case-control study. *Circulation* 2005, **112**, 185–193.
- [119] Shi, Y., Zhou, L., Huang, L. H., Lian, Y. T. et al., Plasma ferritin levels, genetic variations in HFE gene, and coronary heart disease in Chinese: a case-control study. *Atherosclerosis* 2011, **218**, 386–390.
- [120] Mascitelli, L., Goldstein, M. R., Hereditary hemochromatosis, iron, hepcidin, and coronary heart disease. *Med. Hypotheses* 2014, **82**, 402–403.

- [121] Pardo Silva, M. C., Njajou, O. T., Alizadeh, B. Z., Hofman, A. et al., HFE gene mutations increase the risk of coronary heart disease in women. *Eur. J. Epidemiol.* 2010, **25**, 643–649.
- [122] Mascitelli, L., Goldstein, M. R., Pezzetta, F., Explaining sex difference in coronary heart disease: is it time to shift from the oestrogen hypothesis to the iron hypothesis? *J. Cardio-vasc. Med.* 2011, **12**, 64–65.
- [123] Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A. M., Schulze, M. B. et al., Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies. *Arch. Intern. Med.* 2012, **172**, 555–563.
- [124] Ascherio, A., Willett, W. C., Rimm, E. B., Giovannucci, E. L. et al., Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. *Circulation* 1994, **89**, 969–974.
- [125] Klipstein-Grobusch, K., Grobbee, D. E., den Breeijen, J. H., Boeing, H. et al., Dietary iron and risk of myocardial infarction in the Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 1999, **149**, 421–428.
- [126] Kaluza, J., Larsson, S. C., Hakansson, N., Wolk, A., Heme iron intake and acute myocardial infarction: a prospective study of men. *Int. J. Cardiol.* 2014, **172**, 155–160.
- [127] Demant, A. W., Schmiedel, A., Buttner, R., Lewalter, T. et al., Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clin. Res. Cardiol.* 2007, **96**, 900–903.
- [128] Shizukuda, Y., Tripodi, D. J., Zalos, G., Bolan, C. D. et al., Incidence of cardiac arrhythmias in asymptomatic hereditary hemochromatosis subjects with C282Y homozygosity. *Am. J. Cardiol.* 2012, **109**, 856–860.
- [129] Detterich, J., Noetzli, L., Dorey, F., Bar-Cohen, Y. et al., Electrocardiographic consequences of cardiac iron overload in thalassemia major. *Am. J. Hematol.* 2012, **87**, 139–144.
- [130] Monte, I., Capodanno, D., Nicolosi, E., Licciardi, S. et al., Atrial and ventricular function in thalassemic patients with supra-ventricular arrhythmias. *Heart Int.* 2009, **4**, e3.
- [131] Gabutti, V., Piga, A., Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol.* 1996, **95**, 26–36.
- [132] Fabio, G., Minonzio, F., Delbini, P., Bianchi, A. et al., Reversal of cardiac complications by deferiprone and deferoxamine combination therapy in a patient affected by a severe type of juvenile hemochromatosis (JH). *Blood* 2007, **109**, 362–364.
- [133] Felker, G. M., Adams, K. F., Jr., Gattis, W. A., O'Connor, C. M., Anemia as a risk factor and therapeutic target in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004, **44**, 959–966.
- [134] Gaggin, H. K., Dec, G. W., The role of treatment for anemia as a therapeutic target in the management of chronic heart failure: insights after RED-HF. *Curr. Treat. Options Cardio-vasc. Med.* 2014, **16**, 279–288.
- [135] Ruifrok, W. P., Qian, C., Sillje, H. H., van Goor, H. et al., Heart failure-associated anemia: bone marrow dysfunction and response to erythropoietin. *J. Mol. Med.* 2011, **89**, 377–387.
- [136] Jackevicius, C., Fan, C. S., Warner, A., Clinical outcomes of erythropoietin use in heart failure patients with anemia of chronic kidney disease. *J. Card. Fail.* 2014, **20**, 327–333.
- [137] Hansson, G. K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, **352**, 1685–1695.
- [138] Collin, B., Busseuil, D., Zeller, M., Perrin, C. et al., Increased superoxide anion production is associated with early atherosclerosis and cardiovascular dysfunctions in a rabbit model. *Mol. Cell Biochem.* 2007, **294**, 225–235.
- [139] Rajendran, R., Minqin, R., Ronald, J. A., Rutt, B. K. et al., Does iron inhibit calcification during atherosclerosis? *Free Radic. Biol. Med.* 2012, **53**, 1675–1679.
- [140] Minqin, R., Watt, F., Huat, B. T., Halliwell, B., Correlation of iron and zinc levels with lesion depth in newly formed atherosclerotic lesions. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, **34**, 746–752.
- [141] Dabbagh, A. J., Shwaery, G. T., Keaney, J. F., Jr., Frei, B., Effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, **17**, 2638–2645.
- [142] Minqin, R., Rajendran, R., Pan, N., Tan, B. K. et al., The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, **38**, 1206–1211.
- [143] Duffy, S. J., Biegelsen, E. S., Holbrook, M., Russell, J. D. et al., Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, **103**, 2799–2804.
- [144] Wu, B. J., Kathir, K., Witting, P. K., Beck, K. et al., Antioxidants protect from atherosclerosis by a heme oxygenase-1 pathway that is independent of free radical scavenging. *J. Exp. Med.* 2006, **203**, 1117–1127.
- [145] Benderitter, M., Maupoil, V., Vergely, C., Dalloz, F. et al., Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: effects of iron chelators. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1998, **12**, 510–516.
- [146] Kontogiorghe, G. J., Pattichis, K., Neocleous, K., Kolnagou, A., The design and development of deferiprone (L1) and other iron chelators for clinical use: targeting methods and application prospects. *Curr. Med. Chem.* 2004, **11**, 2161–2183.



Associate editor: M. Curtis

The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target?



Luc Rochette^{a,*}, Aurélie Gudjoncik^{a,b}, Charles Guenancia^{a,b}, Marianne Zeller^a,
Yves Cottin^{a,b}, Catherine Vergely^a

^a Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-Métaboliques (LPPCM) Inserm UMR866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21033 DIJON, France

^b Service de Cardiologie CHU Bocage, DIJON, France

ARTICLE INFO

Available online 7 September 2014

Keywords:

Hepcidin

Iron

Redox

Inflammation

Homeostasis

ABSTRACT

The maintenance of stable extracellular and intracellular iron concentrations requires the coordinated regulation of iron transport into plasma. Iron is a fundamental cofactor for several enzymes involved in oxidation–reduction reactions. The redox ability of iron can lead to the production of oxygen free radicals, which can damage various cellular components. Therefore, the appropriate regulation of systemic iron homeostasis is decisive in vital processes. Hepcidin has emerged as the central regulatory molecule of systemic iron homeostasis. It is synthesized in hepatocytes and in other cells and released into the circulation. It inhibits the release of iron from enterocytes of the duodenum and from macrophages by binding to the iron exporter protein, ferroportin (FPN). FPN is a transmembrane protein responsible for iron export from cells into the plasma. Hepcidin is internalized with FPN and both are degraded in lysosomes. The hepcidin–FPN axis is the principal regulator of extracellular iron homeostasis in health and disease. Its manipulation via agonists and antagonists is an attractive and novel therapeutic strategy. Hepcidin agonists include compounds that mimic the activity of hepcidin and agents that increase the production of hepcidin by targeting hepcidin-regulatory molecules. The inhibition of hepcidin could be a potentially attractive therapeutic strategy in patients suffering from anaemia or chronic inflammation. In this review, we will summarize the role of hepcidin in iron homeostasis and its contribution to the pathophysiology of inflammation and iron disorders. We will examine emerging new strategies that modulate hepcidin metabolism.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	36
2. Systemic iron metabolism and the importance of iron storage	36
3. Diseases associated with iron deficiency or iron overload	37
4. The liver: the main regulator of iron metabolism and producer of iron-regulatory proteins (Fig. 1)	37
5. Levels, structures, and kinetics of hepcidin	38
6. Sources of extrahepatic hepcidin	40
7. Importance of the hepcidin-ferroportin interaction (Fig. 4)	42
8. Hepcidin: master regulator of iron metabolism	43
9. Regulation of hepcidin expression (Fig. 5)	43

Abbreviations: AA, amino-acid; ABCA1, ATP binding cassette transporter A1; ABCB, ATP binding cassette (ABC) transporter; AKI, acute kidney injury; AMI, acute myocardial infarction; ARE, antioxidant response element; ATP, adenosine triphosphate; CHD, coronary heart disease; CKD, chronic kidney disease; CHF, chronic heart failure; CO, carbon monoxide; COX, cyclooxygenase; CPB, cardiopulmonary bypass; CREBH, cyclic AMP response element-binding protein-H; CRP, C-reactive protein; DMT1, divalent metal transporter 1; EAM, experimental autoimmune myocarditis; EPO, erythropoietin; ER, endoplasmic reticulum; ESAs, erythropoietin-stimulating agents; FPN, ferroportin; GDF-15, growth differentiation factor-15; hHepc, human hepcidin; HIF, hypoxia-inducible factor; HJV, haemojuvelin; HMO1, high mobility group protein B1; HO, haem oxygenase; H₂S, hydrogen sulphide; HSP, heat shock protein; IL, interleukin; IRES, iron-responsive elements; IRPs, iron-regulatory proteins; JAK, Janus kinase; Keap, Kelch-like ECH-associated protein 1; LPS, lipopolysaccharide; Lrp1, lipoprotein receptor-related protein-1; α 2M, α 2-macroglobulin; MAL, MyD88 adapter-like; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NOX, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; Nr1h2, nuclear factor erythroid-related factor 2; PEG, polyethylene glycol; RNS, reactive nitrogen and oxygen species; ROS, reactive oxygen species; sHJV-Fc, soluble HJV-Fc fusion protein; SOD, superoxide dismutase; STAT, signal transducer and activator of transcription; SR, sarcoplasmic reticulum; Tf, transferrin; TIR, Tf receptors; TLRs, toll-like receptors; TPP, thiamine pyrophosphate; TRAM, TLR4–TRIF-related adapter molecule; TTFD, thiamine tetrahydrofurfuryl disulphide.

* Corresponding author at: Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM) Inserm UMR866, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, DIJON, France.

E-mail address: Luc.rochette@u-bourgogne.fr (L. Rochette).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.004>
0163-7258/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

10. Pharmacology: targeting the hepcidin–ferroportin axis ()	45
11. Hepcidin: an endogenous cytoprotective agent in cardiovascular pathophysiology and possible therapeutic targets?	49
12. Conclusion	49
Funding	49
Conflict of interest	50
Acknowledgments	50
References	50

1. Introduction

Iron is a fundamental cofactor for several enzymes involved in oxidation–reduction reactions due to its ability to exist in two ionic forms: ferrous ($\text{Fe} + 2$) and ferric ($\text{Fe} + 3$) iron. However, the redox ability of iron can lead to the production of oxygen free radicals, which can damage various cellular components. For this reason, iron levels in tissues must be tightly regulated (Ganz, 2013). Various molecules are involved in iron uptake and storage by hepatocytes and its export from hepatocytes, and systems describing the iron cycle have evolved. The discovery of the iron-regulating role of the hormone hepcidin, followed by the elucidation of its mechanism of action has led to better understanding of the physiopathology of human iron disorders (Munoz-Bravo et al., 2013; Waldvogel-Abramowski et al., 2014) and offers new clinical potential in terms of diagnosis and therapy. Hepcidin has emerged as the central regulatory molecule of systemic iron homeostasis. Knowledge on how hepcidin exerts its regulatory function and on the molecular processes that regulate hepcidin production is largely based on animal and in vitro studies. Hepcidin is a peptide secreted predominantly from hepatocytes. It down-regulates ferroportin, the only known iron exporter, and therefore inhibits iron efflux from duodenal enterocytes, macrophages and hepatocytes into the bloodstream (Ganz & Nemeth, 2012). Hepcidin expression is regulated positively by body iron load. Although the underlying mechanism of iron-regulated hepcidin expression has not been fully elucidated, several proteins have been identified that participate in this process. In this review, we will summarize the role of hepcidin in iron homeostasis and its contribution to the pathophysiology of inflammation and iron disorders. We will examine emerging new strategies to modulate hepcidin metabolism. The therapeutic manipulation of hepcidin activity may become an important approach in cardiovascular and metabolic disorders.

2. Systemic iron metabolism and the importance of iron storage

2.1. Iron distribution

The total amount of iron in a 70-kg adult is approximately 4 g, of which two thirds is the iron in red blood cells and 300 mg is in the myoglobin of muscles. The majority of this iron comes from the recycling of senescent erythrocytes by macrophages of the reticulo-endothelial system (about 20 mg/day) (Gudjoncik et al., 2014). Most of the iron in plasma is directed to the bone marrow for erythropoiesis. More than 2 million new erythrocytes are produced every second by the bone marrow, requiring a daily supply of at least 20–30 mg of iron. Only 1 to 2 mg of the daily iron supply is derived from intestinal absorption, which, under a steady state, is sufficient only to replace insensible iron loss. Significant amounts of iron are also present in macrophages (up to 600 mg) whereas excess body iron (~1 g) is stored in the liver. Each erythrocyte contains a billion atoms of iron; at normal rates of turnover, this concentration corresponds to the incorporation of 2×10^{20} atoms of iron per day. Consequently, anaemia is the cardinal sign of iron deficiency. The best characterized syndrome of iron overload is hereditary haemochromatosis (Vujic, 2014). The acquisition, transport, utilization and storage of iron are tightly controlled to meet physiological needs

and prevent excessive accumulation of the metal within cells. Mammals utilize distinct mechanisms to regulate iron homeostasis at the systemic and cellular levels (Lawen & Lane, 2013).

2.2. Proteins that exert crucial functions in the maintenance of systemic iron homeostasis

2.2.1. A range of regulatory mechanisms: general regulation

Several proteins, such as transferrin, ferritin, hemosiderin, hepcidin and ferroportin, exert crucial functions in the maintenance of systemic iron homeostasis. Macrophages play an important role in executing the regulatory events that lead to changes in systemic iron levels (Gammella et al., 2014). Schematically, the main site of iron absorption is the small intestine, but most iron is recycled by the monocyte–macrophage system via phagocytosis of senescent erythrocytes. In the circulation, iron is usually bound to transferrin (Tf), and most of the Tf-bound iron is utilized for bone marrow erythropoiesis (Gudjoncik et al., 2014). Within cells, iron is stored in the proteins ferritin or hemosiderin. Iron is the only micronutrient known to have a regulatory hormone, hepcidin, which responds to both nutrient status and infections. Hepcidin is mainly synthesized in the liver. It is a negative regulator and its production is increased during iron overload and inflammation. Intracellular iron is released into the circulation via ferroportin (FPT). The iron is donated to Tf and reutilized for bone marrow erythropoiesis. Hepcidin binds to the iron exporter FPT and leads to its degradation, thereby inhibiting intestinal iron absorption, cellular export and reticulo-endothelial iron release (Munoz et al., 2011).

2.2.2. Role of ferritin

Multiple physiological processes are involved in maintaining iron homeostasis. These include iron storage at the intracellular and extracellular levels. Ferritin is the major iron-storage protein. Typical ferritins are composed of 24 subunits, which fold into a 4-helix bundle and form an almost spherical protein shell. There is a strong equilibrium between ferritin-bound iron (Fe^{3+}) and the labile iron pool in cells (Fe^{2+}), by which ferritin prevents the formation of reactive oxygen species mediated by the Fenton reaction (Alkhateeb & Connor, 2013). Various cell types contain a transient cytosolic pool of iron, presumably bound to low-molecular-mass intracellular chelates, such as citrate, various peptides, ATP, AMP or pyrophosphate. This labile iron pool is redox-active and its concentration is determined by the rates of iron uptake, utilization for incorporation into iron enzymes, storage in ferritin and export from the cell (Cabantchik, 2014).

There are two functionally and genetically distinct ferritin subunits: L-ferritin and H-ferritin (also known as light-chain and heavy-chain ferritin). Ferritin is found in the cytoplasm, nucleus and mitochondria of cells. Serum ferritin has been thought to reflect iron stores in the body and to increase as a secreted by-product of intracellular ferritin synthesis. Cellular iron is stored primarily in the cytoplasm, but organelles such as mitochondria are the main users of metabolically active iron (MacKenzie et al., 2008).

The regulation of ferritin synthesis by iron is mainly due to post-transcriptional regulation through the binding of IRP1 and IRP2 to iron-responsive elements (IRE) located in the 5' UTR of ferritin mRNA. Both IRP1 and IRP2 are expressed ubiquitously in most tissues. In

addition to iron-mediated regulation, oxidative stress is able to modulate the activity of IRP1 and IRP2. This process is regulated at the transcriptional level through an antioxidant-responsive element (ARE) (Tsuji, 2005). The role of nitric oxide (NO) in the regulation of the IRP/IRE system is well established (Hentze et al., 2004). NO induces the expression of FPN, the transmembrane protein responsible for iron export from macrophages, and is associated with activating the transcription factor nuclear erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) (Nairz et al., 2013). Given the established regulatory circuits between nitric oxide synthase (NOS) activity and iron homeostasis, it has been hypothesized that iron homeostasis and NO biology are interconnected. Recent studies showed that haemoglobin α haem iron in the oxygenated Fe^{2+} state and NOS are in a macromolecular complex and can form a direct protein–protein interaction (Straub et al., 2012).

2.2.3. Role of transferrin

Cellular iron homeostasis is accompanied by the coordinated regulated expression of ferritin and other proteins including Tf. Cells have transferrin receptors (TfR) that mediate iron metabolism. Iron is imported through the endocytosis of Fe^{3+} -loaded Tf that interacts with its TfRs (TfR1 and TfR2) in a tightly regulated feedback loop controlled at the genetic and protein level. Tf is a monomeric protein of 76–81 kDa comprising two structurally similar lobes (termed N- and C-lobes), each of which contains a single iron-binding site. Plasma Tf is a powerful chelator, capable of binding iron tightly but reversibly. Iron chelation by Tf serves to maintain Fe^{3+} in a soluble form in a redox-inert state, thus preventing the generation of toxic free radicals (Gkouvatsos et al., 2012). TfR1 (also known as CD71) is ubiquitously expressed at low levels in most normal human tissues. TfR2 is a protein that is highly homologous to TfR1 but whose expression is largely restricted to hepatocytes. Serving as the main port of entry for iron bound Tf into cells, TfR1 is a type II receptor that resides on the outer cell membrane. The Tf–TfR complex is internalized via clathrin-coated pits and then metabolized in the lysosome (Daniels et al., 2012). Iron homeostasis is controlled by Tf as well as in other ways. In this context, a relationship exists between TfRs and peptides such as hepcidin, which appears to be involved in the final common pathway towards which the components of the regulatory network converge to control tissue iron metabolism.

A decade ago, hepcidin, an antimicrobial peptide with iron-regulatory properties, was discovered and found to play a significant role in iron regulation in health and disease. Hepcidin is predominantly synthesized in hepatocytes, secreted from hepatocytes and excreted through the kidney. In iron deficiency or in haemorrhagic or haemolytic anaemia, the production of hepcidin in hepatocytes decreases. When this happens, both iron absorption in the duodenum and the release of iron from stores are greatly increased. In patients with anaemia or chronic disease, hepcidin is over-expressed (Polin et al., 2013). In the following chapters of this review, we will describe the structures and functions of hepcidin and examine emerging new pharmacological strategies that modulate hepcidin metabolism.

3. Diseases associated with iron deficiency or iron overload

3.1. Iron deficiency

The symptoms and signs of iron deficiency are partly explained by the presence of anaemia. Iron deficiency will result from any condition in which dietary iron intake does not meet the body's demands; for this reason, rapidly growing children and premenopausal women are at the highest risk. Iron deficiency caused by dietary insufficiency is usually secondary to intestinal blood loss. Congenital and acquired abnormalities of the intestinal epithelium can also result in iron deficiency. The combination of mild-to-moderate anaemia and hypoferraemia is often seen in chronic infections, inflammatory disorders, haematological malignancies, and some solid tumours. Inflammation anaemia has

also been called the “anaemia of chronic disease,” (Corwin & Krantz, 2000). The influence of iron deficiency was underestimated especially in terms of worsening of cardiovascular diseases and of developing anaemia (Ebner & von Haehling, 2013). Approximately one third of patients with congestive heart failure (CHF) and 10% to 20% of those with coronary heart disease (CHD) also have anaemia. Anaemia is associated with more symptoms, a greater hospitalization rate and increased mortality rates in patients with CHF and CHD (Kansagara et al., 2013).

3.2. Iron overload: haemochromatosis

Iron overload leads to excessive iron deposition in a wide variety of tissues. The rapid and massive influx of iron into the plasma can cause an early-onset organ disorder called juvenile haemochromatosis, which includes heart failure and endocrine insufficiency. Primary (hereditary) haemochromatosis and secondary iron overload (hemosiderosis) is reaching epidemic levels worldwide. In genetic haemochromatosis and in β -thalassaemia, iron overload is the primary cause of liver cirrhosis, diabetes, and heart failure. Over 85% of all cases of haemochromatosis are due to mutations in the haemochromatosis protein, which is involved in iron metabolism. Human haemochromatosis protein also known as the HFE protein is a protein encoded by the HFE gene (Moyer et al., 2011). The cardiac and endocrine systems are particularly susceptible to rapid iron loading. In cells, iron induces an increase in oxidative stress and limits high-energy electron transport required for mitochondrial respiration (Murphy & Oudit, 2010). Four meta-analyses of the studies examining the association between four HFE gene variants and the risk of coronary heart diseases were recently conducted. HFE gene mutations were shown to be associated with iron overload and cardiovascular diseases (Lian et al., 2013).

The management of iron overload and the treatment of iron toxicity by chelation in patients with acquired iron overload (e.g. transfusion-dependent anaemia) have been shown to reduce iron burden and improve survival. Iron chelators are best known for their ability to sequester iron from the cell or organism and to function as an antioxidant by preventing the Fenton reaction. Three iron chelating agents: Deferoxamine, Deferiprone and Deferasirox are currently available (Munoz et al., 2011). Other orally active iron chelators are currently under development and one, FBS0701, is in a clinical trial. FBS0701 has been shown to bind Fe^{3+} with very high affinity and selectivity and has demonstrated a no-observable-adverse-effect level at least 4 times greater than that obtained with deferasirox suggesting a favourable clinical safety profile (Ma et al., 2012; Neufeld et al., 2012).

4. The liver: the main regulator of iron metabolism and producer of iron-regulatory proteins (Fig. 1)

The liver is the central regulator of systemic iron balance. Hepatocytes not only store iron, but also play a crucial role in iron metabolism by producing Tf, the iron carrier protein, and hepcidin, a hormone involved in regulating iron metabolism. As we reported previously, hepcidin is mainly synthesized in hepatocytes, secreted from hepatocytes, and excreted through the kidney. Schematically, extracellular circulating iron in the plasma is present as soluble Tf-bound iron, and when there is excess iron, it binds to serum proteins or citric acid. Human serum albumin is known to be a low-affinity iron-binding protein and it has been proposed as a ligand for the non-transferrin-bound iron (NTBI) pool that exists in the sera of iron-overload patients. Hepatocytes express both TfR1 and TfR2. TfR1 expression is controlled by the level of iron within cells, and is regulated by the iron-regulatory proteins (IRP)–iron-responsive elements (IRE) regulatory system (Cairo & Recalcati, 2007). Fe^{2+} -Tf binds with TfR1 on the cell membrane surface to form a complex that, as mentioned above, is then transported into hepatocytes by endocytosis. The released ferrous iron is transported from the interior of the endosome to the cytosol by divalent metal transporter 1 (DMT1).

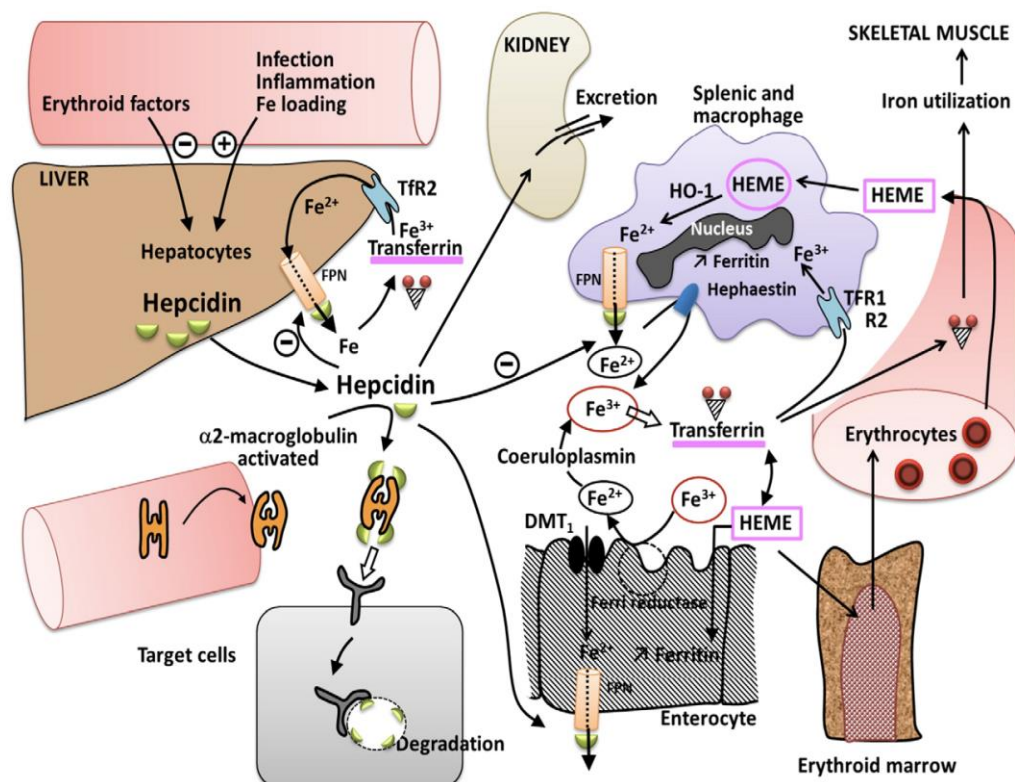


Fig. 1. Regulation of systemic iron metabolism and hepcidin expression. Enterocytes incorporate iron via divalent metal transporter 1 (DMT1) located on the apical membrane upon reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by ferri-reductase. Hepatic hepcidin regulates the efflux of iron from the cells by regulating the activity of ferroportin (FPN). The synthesis and secretion of hepcidin by hepatocytes are influenced by iron levels in relationship with infection and inflammation. Hepcidin preferentially binds to the blood glycoprotein, activated $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2\text{M}$). Macrophages and spleen recognize damaged or senescent erythrocytes, phagocytize them and digest them to extract heme and iron. Haem is degraded through the action of haem oxygenase-1 (HO-1) to release iron. Macrophages export Fe^{2+} via FPN, in a process coupled by re-oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} . Hephaestin assists by converting Fe^{2+} to Fe^{3+} , which is then bound by transferrin (Tf). Tf possesses receptors (TfR) that mediate iron metabolism.

A growing body of evidence suggests that dysregulation of iron metabolism contributes to age-related pathologies. Hepatocyte senescence correlated positively with hepatic iron concentrations, serum ferritin and oxidative stress. The mechanisms that contribute to iron retention with ageing are unclear, but might involve enhanced iron uptake, or reduced iron export in these tissues, potentially resulting from the dysregulation of iron transport proteins (Wood et al., 2014). Iron retention generates oxyradicals and contributes to the peroxidation of lipids and proteins in membranes, thus leading to cellular toxicity. This process is thought to contribute to hepatocellular necrosis and apoptosis and the development of hepatic fibrosis in pathologies associated with iron retention (Ramm & Ruddell, 2010). The hypothesis according to which iron overload could be harmful has been extensively and controversially discussed in relationship with oxidative stress. In patients, the correlation between haemochromatosis and an established marker of oxidative stress, the urinary excretion of 8-iso-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ has been demonstrated (Kom et al., 2006). A recent study in rats investigated whether or not iron supplement facilitated the onset of induced type-2 diabetes by the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) and exacerbated oxidative/nitrosative stress in association with hepatic dysfunction. Both diabetes and elevated amounts of liver iron caused hepatic disease, resulting in increased liver injury including fibrosis, inflammation and hepatocellular necrosis (Li et al., 2012). These results were similar to the

conclusions of studies in animal models of haemochromatosis (Klopfleisch & Olias, 2012). It is known that mutations in HFE or TFR2 cause hereditary haemochromatosis by impeding production of the liver's iron-regulatory hormone, hepcidin. The effects of disrupting HFE or TFR2, either alone or together, on liver iron loading and injury in mouse models of hereditary haemochromatosis were investigated. Liver F2-isoprostanol levels were higher, and copper/zinc and manganese superoxide dismutases (SODs) activities lower in mutant animals than in wild-type mice (Delima et al., 2012). In conclusion, there is now strong evidence that iron overload plays an important role in the initiation and progression of hepatic injury through its ability to catalyze the formation of ROS thus inducing oxidative stress that is not compensated for by endogenous antioxidant mechanisms.

5. Levels, structures, and kinetics of hepcidin

5.1. Levels of hepcidin

Hepcidin was discovered by three laboratories working independently (Krause et al., 2000; Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001). The laboratory of Tomas Ganz invented the name hepcidin, because the gene is highly expressed in the liver (hep-) and was found to possess some microbicidal activity (-cidin). The bacteriostatic effects of iron-binding proteins had already been recognized in the 1940s. It was

noted that specific iron-binding proteins in egg white (ovotransferrin) and blood (transferrin) inhibited the growth of certain bacteria—an effect easily reversed by adding iron. There are considerable differences in hepcidin levels depending on the method used to make the measurement. Absolute hepcidin concentrations differed widely between the assays (Laarakkers et al., 2013).

To date, concentrations of the biomarker hepcidin have only been assessed in the sera of relatively small series of healthy volunteers and patients. In a large, well-phenotyped sample of the general population ($n = 2998$), a recent study assessed age- and sex-stratified reference ranges of serum hepcidin concentrations. Variations in hepcidin concentrations over age differed between men and women. Men showed a stable hepcidin concentration, although a non-significant trend towards an age-related increase in serum hepcidin was previously reported in a study of 65 men. In women, serum hepcidin concentration was substantially higher for postmenopausal than for premenopausal women. The median serum hepcidin concentration in men was 7.8 nM, while that in women was 4.1 nM for women younger than 55 years and 8.5 nM for women aged 55 years and older (Galesloot et al., 2011). There is currently no evidence to support either a primary or secondary circadian variation in hepcidin. However, circadian variations in hepcidin do exist and could be secondary to variations in iron intake during the day. Serum ferritin was shown to be the most important correlate of serum hepcidin concentration (Ashby et al., 2009). In the Nijmegen Biomedical Study, hepcidin and the hepcidin/ferritin ratio, which reflects hepcidin expression relative to iron stores, were significantly associated with the presence of atherosclerotic plaque in postmenopausal women (Galesloot et al., 2014). It has been hypothesized that high levels of hepcidin may increase cardiovascular risk by slowing or preventing the mobilization of iron from macrophages. (See later paragraph: Hepcidin: endogenous cytoprotective agent in cardiovascular pathophysiology and possible therapeutic targets).

5.2. Structure of hepcidin (Fig. 2)

Hepcidin is synthesized in the liver as an 84-amino-acid (AA) preprohormone, and is targeted to the secretion pathway by a 24-AA N-terminal targeting sequence. The resulting 60-AA pro-hepcidin is processed further into a mature C-terminal 25-AA active peptide (~2.7 kDa) that is secreted into the circulation. The human 25-amino-acid hepcidin peptide contains four disulphide bonds, and urinary hepcidin is rich in β -sheet. Hepcidin forms a simple hairpin stabilized

by four disulphide bonds (Ganz, 2005). Under physiological conditions, N-terminal truncated hepcidin-20, -22 and -24 peptides have been observed in the urine, but are absent from or exist at low concentrations in plasma. These smaller hepcidin isoforms mostly occur in plasma in diseases that are associated with significantly increased hepcidin concentrations, such as sepsis and kidney failure. Hepcidin concentrations were reported to be increased in patients with chronic kidney disease. This could be caused by inflammation, which frequently accompanies renal failure. However, even patients without significant inflammation have elevated hepcidin levels that progressively increase with the severity of the kidney disorder. Because hepcidin is cleared, at least partially, by filtration in the kidney, decreased kidney function probably contributes to this phenomenon. This hypothesis is supported by a number of studies that reported an inverse correlation between the glomerular filtration rate and the serum concentration of hepcidin (Peters et al., 2010). Hepcidin-25 has both antimicrobial and iron-regulatory activities, whereas hepcidin-22 and hepcidin-20 have only antimicrobial activity. Much is still unknown about the origin of the smaller isoforms. During prolonged storage of plasma at room temperature, it has been observed that a decrease in plasma hepcidin-25 was paralleled by an increase in the levels of the hepcidin-24, -22 and -20 isoforms. This means that all of the determinants for the conversion of hepcidin-25 to smaller inactive isoforms are present in the circulation, which may contribute to the functional suppression of hepcidin-25, which is significantly higher in patients with renal impairment (Laarakkers et al., 2013). We found that hepcidin was expressed predominantly in the hepatocytes around the portal veins in mouse liver. Interestingly, ferroportin staining was also found to be much more prominent in the periportal areas.

5.3. Hepcidin kinetics

Binding to carrier proteins may prevent circulating hepcidin from being freely filtered (Peters et al., 2010). Hepcidin preferentially binds to the blood glycoprotein, α_2 -macroglobulin (α_2 M) and to methylamine-activated α_2 M (α_2 M-MA). α_2 M, which is composed of subunits with tetrameric structures in vertebrates, protects the body against various infections, and hence, can be used as a biomarker for the diagnosis and prognosis of a number of diseases (Rehman et al., 2013). Hepcidin binds to the methylamine-activated form of α_2 M via four high-affinity binding sites. In addition to hepcidin binding, both α_2 Ms bind many hormones and cytokines such as IL-6. Hepcidin complexed with native and activated α_2 M significantly decreased FPN

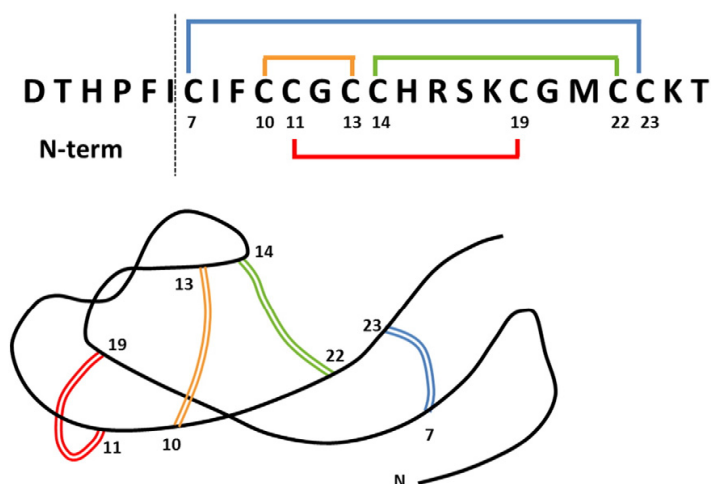


Fig. 2. Hepcidin: the amino-acid sequence and structure. Hepcidin is synthesized as an 84-amino-acid (AA) preproprotein. A furin-like proprotein convertase is responsible for cleavage of pro-hepcidin to hepcidin. The human 25-amino-acid hepcidin peptide contains four disulphide bonds. N-terminal domain interacts with ferroportin.

expression. Hecpudin bound to activated $\alpha_2\text{M}$ binds to the $\alpha_2\text{M}$ receptor: low density lipoprotein receptor-related protein-1 (Lrp1) on target cells. Activated $\alpha_2\text{M}$ is internalized by endocytosis via these receptors (Huang et al., 2013).

Hecpudin clearance is assumed to occur via cellular co-degradation with FPN at its sites of action, and via excretion by the kidneys. Because of its low molecular weight and small radius, unbound hecudin probably passes freely into the glomerular filtrate. Possible local tubular production of hecudin as well as possible defective tubular reabsorption of hecudin must also be taken into account in the interpretation of urine levels as a mirror of serum hecudin concentrations (Kulaksiz et al., 2005). Recently, hecudin-25 has been shown to have a direct correlation with creatinine and an inverse correlation with estimated glomerular filtration rate, suggesting that hecudin-25 levels increase as renal function deteriorates, possibly due to decreased renal clearance of hecudin-25 (Troutt et al., 2013).

6. Sources of extrahepatic hecudin

Apart from hepatocytes, which are the main source of circulating hecudin, other cell types such as macrophages, adipocytes, and heart and stomach cells express hecudin mRNA, but at a lower level. While extrahepatic hecudin expression is becoming established, the physiological role of hecudin in extrahepatic tissues is only partially understood. Extrahepatic hecudin production may play a role in the local regulation of iron fluxes.

6.1. Macrophages

Macrophages facilitate the rapid throughput of iron and strongly express FPN. The transport of iron across vacuolar membranes into the cytoplasm of macrophages involves DMT1, which is specific for ferrous iron. The necessary iron reduction is catalyzed by an erythroid endosomal ferric reductase, which is important for iron utilization in erythrocytes.

A sequence of events takes place in macrophage lysosomes when they phagocytose senescent erythrocytes. The hydrolytic environment of the phagolysosome digests the erythrocyte and its haemoglobin, releasing haem, which is then degraded by inducible haem oxygenase-1 (HO-1). Iron is released for cytoplasmic storage or export to blood plasma; these processes may be particularly influenced by hecudin. HO-1 acts within the phagolysosomes, and the released iron is transported across the phagolysosomal membrane. Macrophages are important producers of hecudin, and within macrophages, hecudin localizes in mycobacteria-containing phagosomes where it exerts its antimycobacterial activity (Layoun & Santos, 2012). In macrophages, the regulation of lipopolysaccharide (LPS)-inducible cytokines, which include several endogenous compounds such as TNF α , interleukin (IL) families and receptors, especially Toll-like receptors (TLRs) and IL-1R takes place. LPS-induced hecudin expression *in vivo* is dependent on TLR4, indicating that TLR signalling may be important for the activation of hecudin production in macrophages (Fig. 1) (Constante et al., 2006). In contrast to hecudin expression in hepatocytes, that in macrophages is positively regulated by gram-positive and gram-negative bacteria wall constituents through TLR2 and TLR4 (Layoun & Santos, 2012). Hecudin expression by macrophages increases following bacterial infection, and hecudin decreases iron release from macrophages in an autocrine and/or paracrine manner. Though circulating hecudin seems to be a relatively ineffective antimicrobial peptide, it was recently proposed that hecudin produced endogenously by macrophages and localized in the phagosome could play a role in host defences against tuberculosis by causing structural damage to the mycobacteria (Sow et al., 2011).

In monocytes, autocrine production of hecudin has been shown to down-regulate FPN expression, thereby contributing to iron sequestration within these cells (Theurl et al., 2008). The hecudin-mediated elevation of intracellular iron plays an important role in the cytokine

response of macrophages and hence subsequent immune responses (Layoun & Santos, 2012). It has recently been proposed that High Mobility Group Box-1 (HMGB1), which is released from irradiated tumour cells, acts as an endogenous TLR4 ligand (Apetoh et al., 2007). HMGB1 is a nuclear protein that can be released into the extracellular milieu from immune and non-immune cells in response to various stimuli. Extracellular HMGB1 contributes to the pathogenesis of numerous chronic inflammatory and autoimmune diseases, including sepsis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, chronic kidney disease and cancer. It has been suggested that there is some interplay between HO-1 and HMGB1 (Gong et al., 2008).

In atherosclerotic plaque, iron preferentially accumulates in macrophages where it can exert pro-oxidant activities (Yuan & Li, 2003). The physiology of hecudin suggests an additional mechanism by which iron depletion could protect against the progression of atherosclerotic lesions. Without hecudin, macrophages retain less iron. Hecudin may promote plaque destabilization by preventing iron mobilization from macrophages within atherosclerotic lesions. This process can be altered and the absence of this mobilization may result in increased cellular iron loads, thus inducing lipid peroxidation, which is associated with progression to foam cells (Sullivan, 2007).

Interestingly, it was recently demonstrated that after exposure to iron, differentiated macrophages (M2) completely changed their phenotype and acquired a phenotype oriented to iron release. The iron handling ability of M2 macrophages suggests they play a modulatory role in atherosclerosis. Hecudin decreased iron loading in M2 macrophages, whereas FPN expression increased. Expression of the HO-1 gene and NRF2, which are markers of oxidative stress, also increased markedly in M2 macrophages. Finally, these M2 macrophages are highly specialized in iron recycling associated with increasing FPN expression and a decrease in hecudin mRNA levels (Bories et al., 2013).

6.2. Adipocytes

Recent data suggest that adipocytes are capable of producing hecudin, and that this process is probably triggered by inflammatory stimuli. Hecudin mRNA and hecudin were present in adipose tissue, and mRNA levels in adipose tissue correlated with levels of IL-6 and C-reactive protein (CRP) (Bekri et al., 2006). Adipose tissue expressed hecudin at both the mRNA and protein level and this expression was enhanced in obese patients (Vuppalanchi et al., 2014). A lot of results point out that hecudin may play an important role in the hypoferrremia of inflammation in obese patients. There is a tight relationship between iron deficiency and obesity. Obesity seems to be associated with lower iron levels and higher iron stores, reflecting lower iron bioavailability, together with higher hecudin production and with higher levels of obesity-related inflammation markers (Coimbra et al., 2013). In this field, it has been reported that activin B was a new adipokine having a role in energy balance and insulin insensitivity associated with obesity (Dani, 2013). Interestingly, hecudin synthesis was induced by inflammatory signals including activin B and SMAD responded to activin B (Besson-Fournier et al., 2012; Akel et al., 2013).

Interactions between cells in the blood vessel wall and regional lipids are vital for normal vascular function, and they are disturbed in cardiovascular diseases. Perivascular adipocytes are present at the adventitial border of blood vessels. The secretion of mediators that regulate inflammation is a characteristic feature of adipocytes. These mediators can be divided into two categories: adipokines and cytokines. Adipose tissue is known to secrete IL-6, leptin and adiponectin (Rajsheker et al., 2010). As we reported, hecudin is rapidly induced by cytokines, including IL-6. In human volunteers, recombinant IL-6 infusion resulted in a 7.5-fold increase in urine hecudin levels, and serum iron decreased by 34% within 2 h. IL-6 neutralizing antibodies were used to show that there was an IL-6-dependent inflammation-mediated and regulatory-hecudin pathway (Nemeth et al., 2004a). It has been suggested that adipocytes are key regulators of metabolism in all tissues,

given their integrated sensing of nutritional stores and iron availability. Evidence now exists that adipocyte iron levels regulate adiponectin transcription and serum protein levels (Gabrielsen et al., 2012). High levels of leptin are found in obesity and also appear to contribute to the iron status observed in obesity. Leptin is capable of inducing hepatic hepcidin expression via the Janus kinase 2 (Jak2)/STAT3 signalling pathway, which is similar to IL-6-mediated hepcidin expression. STAT3 belongs to the signal transducer and activator of transcription (STAT) family of signal responsive transcription factors. In non-stimulated cells, STAT3 is kept in an inactive cytoplasmic form. The JAK2/STAT3 pathway is a stress-response mechanism that transduces signals from the cell surface to the nucleus, thereby modulating gene expression (Chung et al., 2007; Meli et al., 2013). Certain studies have reported that circulating hepcidin and leptin concentrations in obese patients are higher than those in normal-weight subjects. These observations support the idea that the poor iron status frequently observed in obese patients may be associated with the hepcidin-mediated inhibition of dietary iron absorption (Amato et al., 2010). As we previously reported in the underlying mechanism of iron-regulated hepcidin expression, several proteins that participate in this process have been identified. Among these, haemojuvelin (HJV) plays a particularly important role. A soluble form of haemojuvelin (s-HJV) exists in the blood. Recently, it has been reported that HJV was also expressed in adipocytes at mRNA and protein levels. Moreover, its mRNA expression was greatly increased in adipose tissue from obese individuals and correlated positively with hepcidin expression levels (Luciani et al., 2011).

6.3. Heart

It has been reported that increased levels of iron and iron-mediated injury play an important role in the development of a number of heart disorders, including iron-overload cardiomyopathy, acute myocardial infarction and coronary heart diseases (Tuomainen et al., 1998; Rochette et al., 2011). Heart cells have the ability to accumulate transferrin-bound iron via the Tf receptor and non-transferrin-bound-iron probably via the L-type Ca^{2+} channel. FPN-mediated iron export is dependent on the ferroxidase activity of the multicopper oxidases, ceruloplasmin and hephaestin (Qian et al., 2007). It has also been demonstrated that hepcidin was expressed in the heart; this implies that this protein might play a role in iron homeostasis in the heart. In vitro, it has been demonstrated that hepcidin was able to bind with FPN, internalize and degrade FPN, and thus decrease iron export from heart cells (Merle et al., 2007; Ge et al., 2009).

In our laboratory, we found that hepcidin was present in the myocardium. The protein was diffusely expressed in the myocardium (Fig. 3). Recently, cardiac expression of hepcidin in different conditions: rat experimental autoimmune myocarditis (EAM), rat acute myocardial infarction (AMI) and human myocarditis have been investigated. Hepcidin mRNA was moderately expressed in the heart of normal rats, but the expression of hepcidin mRNA in the heart of EAM rats was markedly greater than that in controls. In humans, the level of hepcidin/cytochrome oxidase mRNA in hearts with pathologically diagnosed myocarditis was significantly higher than that in hearts without

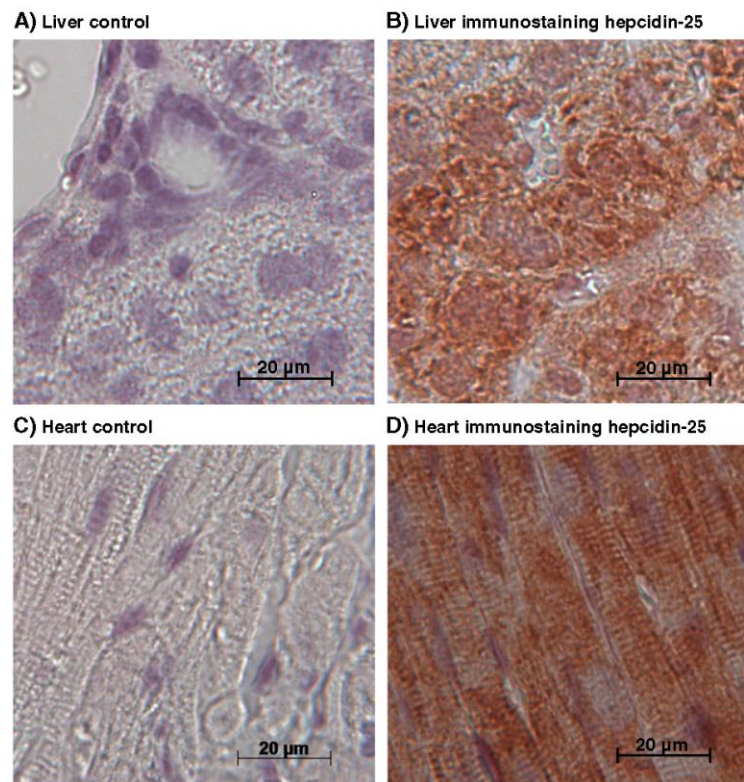


Fig. 3. Histology: Hepcidin expression in the liver and heart. Representative images of hepcidin-25 immunostained liver and heart sections. "After fixation in formalin and dehydration in alcohol, the samples were embedded in paraffin. Slices of 5 µm were cut and immunostained for hepcidin. Briefly, after antigen retrieval (citrate buffer pH6), slices were incubated with H_2O_2 3% in TBST (2×8 min) and saturated (Impress Kit serum plus BSA 3% in TBST) for 20 min. They were incubated with anti-hepcidin (1/50, Abcam—ab30760) overnight at 4 °C. After 3 rinses in TBST, the slices were incubated with Impress Kit Solution (Vector Lab—MP7401) for 30 min. After the revelation step with Nova Red Kit (Vector Lab—SK4800), they were counterstained in haematoxylin."

myocarditis. Finally, hepcidin expression is more strongly influenced by local environmental conditions than by systemic conditions; hepcidin mRNA levels correlated with those of IL-6 mRNA (Isoda et al., 2010). In hypoxic rat hearts, expression levels of hepcidin were highest at the myocardial intercalated disc area (Merle et al., 2007). Given this localization, it is logical to conclude that the presence of hepcidin in the intercalated disc area may be an important component in a local response to an inflammatory process.

Another condition that induces hepcidin expression is inflammation associated with cardiac diseases such as heart failure. Increases in pro-inflammatory cytokine levels and anaemia have been reported in patients with heart failure. It is possible that the increased level of inflammatory cytokines in the heart may induce hepcidin gene expression in cardiomyocytes (Nemeth et al., 2003). A large number of transgenic over-expression studies that investigated a wide array of intracellular signalling pathways in the hypertrophic response have been published. Using transgenic models, it appears that hepcidin in the heart plays a role in the regulation of iron homeostasis in an autocrine and paracrine fashion (Zhang et al., 2012).

6.4. Stomach

Given the established role of the stomach and gut in iron metabolism, it is tempting to speculate that the hepcidin system is implicated in the regulatory and antimicrobial functions of iron. A recent study showed that hepcidin was expressed in gastric parietal cells (Schwarz et al., 2012). In mice and rats, quantitative RT-PCR analyses revealed abundant hepcidin expression in the fundus/corpus part of the glandular stomach, and less ample expression in the antrum. The influence of hepcidin on gastric acid secretion and the regulation of gastric acid production may also contribute to local iron homeostasis. Hepcidin is also present in the bile (Strnad et al., 2011). Hepcidin was increased after treatment with proton pump inhibitors and reduced after the injection of histamine; these results suggest that hepcidin signalling serves as a mechanism to keep gastric acid secretion steady under normal and pathological conditions such as inflammation. Iron absorption is diminished during inflammation, and the mechanisms operating in the intestine to decrease iron absorption during inflammation have been poorly studied at the cellular level. Treatment with TNF alpha decreased intestinal iron absorption, but TNF appears to mediate hypoferrremia independently of hepcidin (Schubert et al., 2012). One study investigated

whether hepcidin was implicated in colon cancer-associated anaemia and whether it might play a role in colorectal carcinogenesis. Hepcidin is expressed by colorectal cancer tissue and thus may be a novel oncogenic signalling mechanism (Ward et al., 2008).

7. Importance of the hepcidin-ferroportin interaction (Fig. 4)

The interaction of hepcidin with FPN provides a mechanism for coordinating the entry of iron into the plasma with iron utilization and storage. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of hepcidin regulation in particular in relationship with FPN and its targets came from studying patients with a genetic iron-overloaded disorder such as haemochromatosis. These patients present mutations in genes that encode different proteins and they have low hepcidin levels relative to iron stores (Gao et al., 2009).

The main target of hepcidin is FPN, the transmembrane protein responsible for iron export from cells to plasma (Nemeth et al., 2004b). FPN protein is encoded by the SLC40A1 gene located on chromosome 2 (2q32). FPN gene mutations have been identified in different ethnic populations and some of the mutations are associated with autosomal dominant iron-overload disorder. To date, forty-five mutations in the SLC40A1 gene have been described in people of different ethnicity, and this number is set to increase as more mutations are discovered. In the majority of cases, FPN polymorphism is a result of a missense mutation (Kasvosve, 2013). Mutations in the FPN gene lead to autosomal dominant iron-overload diseases (Detivaud et al., 2013). Hepcidin binds to a highly conserved domain on an extracellular loop of FPN. The extracellular loop of FPN that interacts with hepcidin was identified from the observation that the Cys326 mutation in this loop resulted in FPN being resistant to hepcidin binding. It has been proposed that the free thiol of the Cys326 residue forms a disulphide bond with one of the cysteine residues in hepcidin (Clark et al., 2011). The concentration of FPN on the surface of cells depends on the rate of synthesis, the hepcidin/FPN interaction, the rate of internalization and the rate of cellular degradation. Once internalized, FPN is dephosphorylated and subsequently ubiquitinated. The inability to ubiquitinate FPN does not prevent hepcidin-induced internalization, but it inhibits the degradation of FPN. Ubiquitinated FPN is trafficked through the multivesicular body pathway en route to degradation in the endosome (De Domenico et al., 2007).

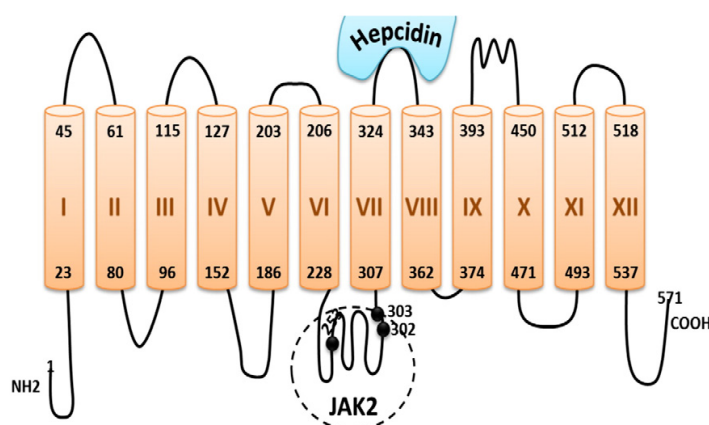


Fig. 4. Human ferroportin and functional domains (12 transmembrane regions that were 21–23 amino acids long). Hepcidin binds to a domain on an extracellular loop of ferroportin. Hepcidin exerts its influence on iron metabolism via down-regulation of FPN-mediated iron export. Janus kinase 2 (JAK2) binds to a cytoplasmic domain of ferroportin.

It has been demonstrated that the kinase responsible for the phosphorylation of FPN is JAK2. Binding of JAK2 to FPN is highly cooperative and requires hepcidin to bind to both monomers of the FPN dimer and both monomers to be capable of activating JAK2 (De Domenico et al., 2009). Studies have suggested that a thiol-disulphide exchange may occur during hepcidin binding to FPN (Preza et al., 2011). Once bound, JAK2 is autophosphorylated and then phosphorylates FPN, leading to FPN internalization (De Domenico et al., 2009).

In summary, excess iron induces an increase in hepcidin concentration, resulting in the internalization and degradation of FPN protein. Intracellular iron is then sequestered by binding to ferritin within cells, limiting the increase in plasma iron concentration and Tf saturation. Coupling the internalization of FPN to hepcidin levels could generate a homeostatic loop that regulates iron plasma levels and the tissue distribution of iron.

8. Hepcidin: master regulator of iron metabolism

When iron stores are adequate or high, the liver produces hepcidin, which circulates to the small intestine. FPN molecules are expressed on the basolateral membranes of enterocytes, and they transport iron from enterocytes to plasma transferrin. Hepcidin causes FPN to be internalized, thus blocking the pathway for the transfer of iron from enterocytes or macrophages to plasma. Macrophages export Fe^{2+} from their plasma membrane via FPN, in a process coupled with the re-oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} by ceruloplasmin and followed by the loading of Fe^{3+} onto Tf. Exported iron is scavenged by Tf, which maintains Fe^{3+} in a redox-inert state and delivers it into tissues. The copper-containing ferroxidase, hephaestin, assists by converting Fe^{2+} to Fe^{3+} , which is then bound by Tf.

As we previously reported, iron enters the cell from the bloodstream in a complex with Tf, which binds to receptors Tfr1 and Tfr2 on the plasma membrane, followed by receptor-mediated endocytosis. As stated above, human Tfr1 and Tfr2 are very similar, being 45% homologous and 60% similar in their primary structure (Anderson & Vulpe, 2009; Bayeva et al., 2013; Koskenkorva-Frank et al., 2013). Under physiological conditions, plasma Tf is hyposaturated (to ~30%) and displays a very high iron-binding capacity.

Different studies have revealed that expression of the hepcidin–FPN axis was regulated by different factors (exogenous and endogenous). At the molecular level, the pathways involved in this regulation are not well known. The effect of vitamin D on the hepcidin–FPN axis suggests that low vitamin D status may be a contributing factor to the anaemia of chronic kidney disease (CKD), which is characterized by impaired vitamin D status, which itself is closely associated with adverse CKD health outcomes. Recently, a study showed for the first time that vitamin D was a potent regulator of hepcidin in both monocytes and hepatocytes (Bacchetta et al., 2014). In conditions of vitamin D deficiency, elevated synthesis of hepcidin by hepatocytes may increase intracellular and systemic concentrations of hepcidin and thus decrease membrane expression of FPN in these cells. Direct transcriptional suppression of hepcidin gene (HAMP) expression mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D binding to the vitamin D receptor causes a decrease in hepcidin mRNA levels.

Studies have reported a decrease in hepcidin expression in response to hypoxia. However, the physiological relevance of hypoxia and its impact on hepcidin regulation are still uncertain and conflicting. In vivo, hypoxia could also suppress hepcidin indirectly through erythropoiesis and enhanced iron use. Hypoxia-inducible factor (HIF) may, however, contribute to hepcidin suppression indirectly via its effects on the breakdown of haemojuvelin (Silvestri et al., 2008). Moreover, HIF1 α and 2 α were shown to increase intestinal iron absorption, iron uptake into erythroid progenitors and haem synthesis, and to suppress hepcidin production thus ensuring an adequate supply of iron to support erythropoiesis (Evstatiev & Gasche, 2012; Palaneeswari et al., 2013). In the HIGHCARE study (HIGH altitude Cardiovascular Research carried out 3400–5400 m above sea level) the modifications induced

by acute and chronic exposure to hypobaric hypoxia on serum iron indices, EPO, IL-6, and hepcidin levels were investigated. Hepcidin levels decreased within 40 h after acute hypoxia exposure at 3400 m and reached the lowest level at 5400 m. This fall was associated with a rapid decrease in serum levels of ferritin. The strong correlation between serum ferritin and hepcidin during the study indicates that iron itself or the kinetics of iron use in response to hypoxia may signal hepcidin down-regulation (Piperno et al., 2011).

In the process of hepcidin regulation, the endoplasmic reticulum may play a role with regard to inflammation. The acute inflammatory response has been linked to endoplasmic reticulum (ER) stress, a state that is associated with disruption of ER homeostasis and the accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER. Overall, it appears that the regulation of hepcidin by ER stress links the cellular response involved in protein quality control to innate immunity and iron homeostasis. Apparently, hepcidin reacts not only to extracellular stimuli, such as iron fluctuations and cytokines, but also to stress signals arising within the cell (Vecchi et al., 2009; Oliveira et al., 2011).

Among the endogenous “mediators”, carbon monoxide (CO) and NO appear to play a role in this regulation. CO suppresses hepcidin expression elicited by IL-6 and endoplasmic reticulum-stress agents by inhibiting signal transducer and activator of transcription (STAT-3) phosphorylation and cyclic AMP response element-binding protein-1 (CREB) maturation, respectively. The induction of endoplasmic reticulum stress in mice resulted in increased hepatic and serum hepcidin (Shin et al., 2012). The anti-inflammatory action of CO is implicated in these different processes (Rochette et al., 2013).

Concerning NO, it has been hypothesized that iron homeostasis and NO biology are interconnected (see previous paragraph: Role of Ferritin). As we previously mentioned, the regulation of ferritin synthesis by iron is mainly due to post-transcriptional regulation through the binding of IRP1 and IRP2 to IRE and the NO-induced expression of FPN (Straub et al., 2012; Nairz et al., 2013). Several reports indicate a potential synergistic effect between NO and H_2S in controlling various biological responses of vascular function. It is interesting to note that the cytoprotective functions of low concentrations of H_2S are comparable to those of NO. Importantly, NO and hydrogen can react rapidly with metalloproteins such as iron–sulphur clusters (Kolluru et al., 2013; Yin et al., 2013).

9. Regulation of hepcidin expression (Fig. 5)

The expression of hepcidin is dependent on opposing signalling pathways: the combined effects of the various pathways will determine hepcidin levels. The systemic factors that alter hepcidin expression, such as anaemia or inflammation, are well established. However, the mechanism by which hepcidin production is regulated at the molecular level is still unclear.

HFE, the gene mutated in the most common form of hereditary haemochromatosis, plays a role in monitoring body iron status and then directing the adaptive hepcidin response. The HFE protein interacts with Tfr1 at a site that overlaps with the binding site for Tf. A close correlation between Tf levels and hepatic hepcidin mRNA expression has been demonstrated following haemolysis (Frazer et al., 2004). Furthermore, when Tf binds to Tfr2, the ERK1/ERK2 and p38 MAP-kinase pathways are activated, thus inducing hepcidin expression (Calzolari et al., 2006). As mentioned above, inflammation stimulates hepcidin expression, which in turn causes the hypoferrremia associated with inflammatory episodes. Although several pro-inflammatory cytokines have been shown to increase hepcidin expression, IL-6 has been the best studied. It stimulates hepcidin transcription through STAT3 signalling. Several microbial-derived Toll-like receptor (TLR) ligands can induce hepcidin expression, perhaps via the induction of IL-6 (Darshan & Anderson, 2009). The most recently described factor in the regulatory pathway in hepcidin expression is the BMP (bone morphogenetic protein)/SMAD (contraction of Sma and Mad) pathway: BMP/

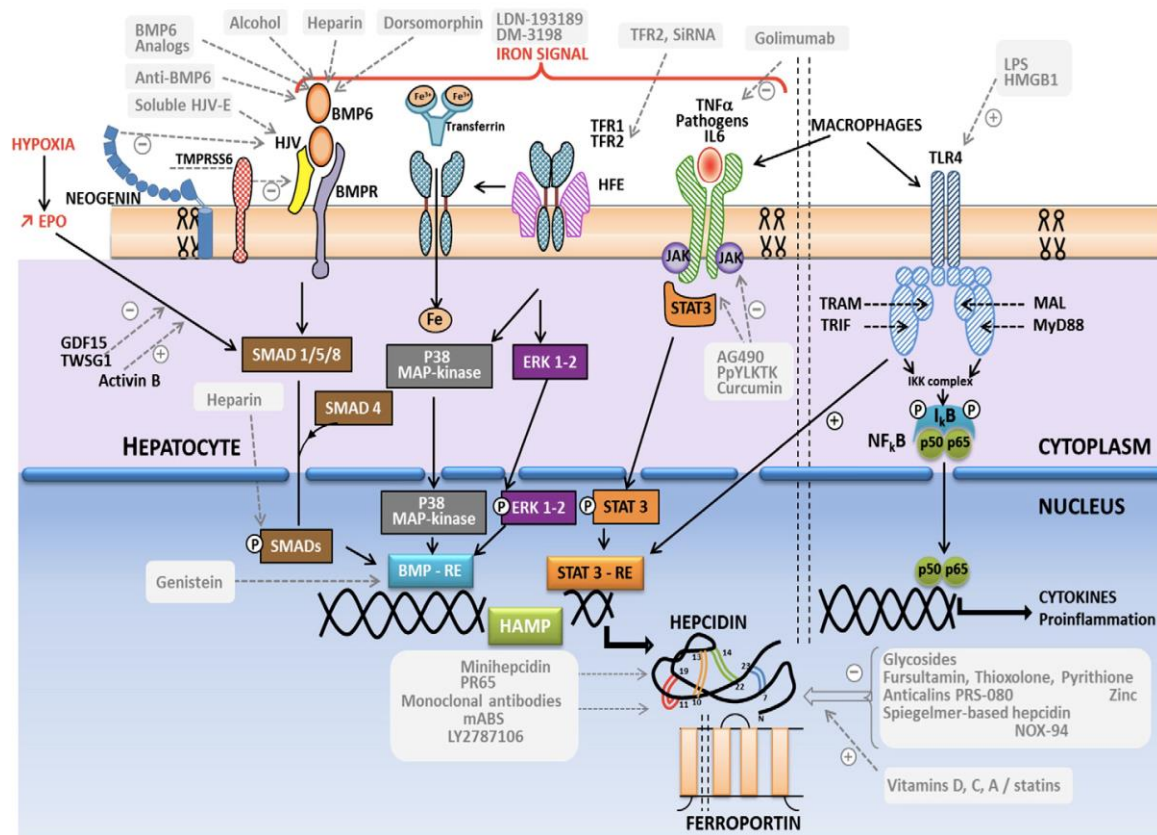


Fig. 5. Expression of hepcidin in hepatocyte and macrophages in response to iron signal and targeting of the hepcidin-ferroportin axis for human therapy. Hepcidin gene expression is up-regulated by inflammation and iron through the JAK/STAT and BMP/SMAD pathways respectively. The BMP-6 signal acts through its receptor (BMPR), and is modulated by haemojuvelin (HJV). TMPS56 cleaves membrane-bound HJV. BMPs can also signal through SMAD-independent pathways, notably via MAP kinases. Dorsomorphin inhibits BMP signalling through the SMAD pathway. SMAD complexes bind to BMP-responsive elements (BMP-Res). TNF, pathogens and IL-6 stimulate hepcidin synthesis via STAT-3 activation. The P38, MAP-kinase and ERK 1–2 pathways are activated in response of iron signals. Differric transferrin (Tf) binds to Tf-Receptor 1 (TfR-1) on the cell surface and the complex undergoes endocytosis. HFE is a protein that competes with Tf for binding to TfR1. TLR signalling requires interactions of the receptor domains of the receptor and adaptor proteins. Hepcidin expression in macrophages is regulated mainly through TLR4 receptors associated with adaptor proteins (TRAM, TRIF, MAL, MyD88). Hepcidin mRNA expression in macrophages induced by LPS or HMGB1 depends on NF- κ B. For simplicity, not all factors involved with expression are described in this figure. Pharmacological options (shaded parts). BMP-RE: bone morphogenetic protein-responsive element; hepcidin gene (*HAMP*, 19q13) HAMP: The HAMP (present in histidine kinases, adenylate cyclases, methyl accepting proteins and phosphatases).

SMAD. It has also been demonstrated that dorsomorphin, a selective inhibitor of BMP-responsive SMAD phosphorylation, blocked the IL-6 mediated induction of hepcidin (Yu et al., 2008). It appears that the coordinated regulation of hepcidin expression by BMP and IL-6 may involve crosstalk at the level of signal transduction. These effects are influenced by the cellular microenvironment. The human genome encodes 20 B.P. (Miyazono et al., 2010). BMP6 is the specific endogenous regulator of hepcidin (Camaschella, 2009). Mutations in the genes encoding the ligand BMP6, the BMP co-receptor HJV, and the intracellular signalling molecule SMAD4 are associated with suppressing hepcidin expression. These actions are associated with tissue iron overload.

It is now recognized that the BMP6–HJV–SMAD signalling pathway plays a major role in hepcidin regulation and iron homeostasis (Babitt & Lin, 2010). Stimulation by BMP6 and/or iron induces an increase in BMP6–HJV–SMAD pathway activity, possibly through a mechanism involving HFE and TfR2, leading to binding of SMAD complexes to BMP-responsive elements (BMP-REs) on the hepcidin promoter and the up-regulation of hepcidin transcription. The BMPs act by binding to complexes of two type I and two type II receptors (BMPR-I and BMPR-II) and modulating the expression of target genes through

different signal transduction pathways. Signalling through the SMAD proteins is now characterized. The constitutively active kinase domains of type II receptors phosphorylate type I receptors, and this in turn activates the SMAD signalling pathway through phosphorylation of receptor SMADs (SMAD1, SMAD5 and SMAD8). These associate with co-SMADs (SMAD4) to form a heteromeric complex that translocates to the nucleus and stimulates the expression of a wide range of target genes, including the gene encoding hepcidin (Anderson & Darshan, 2008). BMPs can also signal through SMAD-independent pathways, notably via MAP kinases (Nohe et al., 2004).

There are important interactions between the different pathways, and the involvement of other members of the regulatory network, such as growth differentiation factor-15 (GDF-15), has also been reported. GDF15 expression is associated with cellular stress or apoptosis in several tissues. The unprocessed translated form of GDF-15 (pre-pro-GDF-15) is 308 AA long and includes the signal sequence (29 AA), the propeptide (167 AA) and a mature protein (112 AA), which contains a cysteine that binds for the transforming growth factor- β superfamily (Tanno et al., 2010). GDF-15 has been found to be expressed by mature erythroblasts, which occur in diseases due to increasingly ineffective

erythropoiesis such as thalassemia. It has been demonstrated that GDF-15 protein suppresses hepcidin secretion (Tanno et al., 2007, 2010). Erythroblast expression of a second molecule named twisted gastrulation: Twisted Gastrulation Gene 1 (TWSG1) was explored as a potential erythroid regulator of hepcidin. TWSG1 interferes with BMP-mediated hepcidin expression and may act with GDF15 to deregulate iron homeostasis in thalassemia. SMAD signalling pathways are implicated in the cellular actions of GDF-15 and TWSG1 (Tanno et al., 2009).

Recently, several studies have demonstrated that oestrogens regulate hepcidin expression via G-coupled protein 30 (GPR30)–BMP6-dependent signalling, indicating that oestrogen decreases iron absorption in the intestine. GPR30 has been localized to both the cell plasma membrane and the endoplasmic reticulum and has been reported to mediate the action of oestrogen as a steroid receptor. New data suggest that oestrogen directly participates in the regulation of hepatic hepcidin expression (Ikeda et al., 2012).

As we previously reported, hepcidin expression in macrophages is regulated mainly through TLR2 and TLR4 receptors. The autocrine regulation of iron accumulation in macrophages by hepcidin may affect the levels of pro-inflammatory cytokine production. TLR2- and TLR4-mediated hepcidin up-regulation was completely abrogated in myeloid differentiation factor 88 (MyD88)–/– macrophages, suggesting that MyD88 signalling is required for hepcidin induction through TLRs (Layoun & Santos, 2012). TLR signalling requires interactions of the Toll/IL-1 receptor (TIR) domains of the receptor and adaptor proteins. The interaction surfaces in the TLR4 TIR domain for the TLR4–TLR4, TLR4–MyD88 adapter-like (MAL), and TLR4–TRIF-related adaptor molecule (TRAM) interaction have been identified (Bovijn et al., 2012).

All of the clinical observations point to iron-responsive regulatory pathways and suggest that oxidative stress could be involved in IL-6 signalling for hepcidin production. During inflammation, cells are exposed to persistently elevated concentrations of superoxide and H₂O₂. This condition requires the tight regulation of iron homeostasis to prevent tissue damage via Fenton reactions. In neutrophils and macrophages, the membrane-associated NADPH oxidase (NOX2) generates superoxide that is converted to H₂O₂ by SODs (Brechard & Tschirhart, 2008). Recently, it has been shown that very low concentrations of H₂O₂ were sufficient for the potent up-regulation of hepcidin in hepatoma cells and primary hepatocytes, as H₂O₂ acts synergistically with other inducers of hepcidin, such as IL-6. The effect of H₂O₂ on hepcidin is mainly mediated via STAT3, which is the classical inflammatory pathway for the regulation of hepcidin (Millonig et al., 2012).

10. Pharmacology: targeting the hepcidin–ferroportin axis (Table 1)

The hepcidin–FPN axis is the principal regulator of extracellular iron homeostasis in health and disease. Its manipulation via agonistic and antagonistic pathways is an attractive and novel therapeutic strategy. Hepcidin agonists include compounds that mimic the activity of hepcidin and agents that increase the production of hepcidin by targeting hepcidin-regulatory molecules. Advances are being made in this area through the development of small molecule modulators of hepcidin regulation pathways, neutralizing antibodies to hepcidin, and supra-active mini-hepcidins. Antagonists may prevent hepcidin-mediated FPN internalization by at least three distinct mechanisms: (1) preventing the interaction between hepcidin and FPN, (2) inhibiting hepcidin-induced ubiquitination of FPN, and (3) inhibiting the endocytosis pathway for FPN internalization.

10.1. Direct and indirect hepcidin agonists

10.1.1. Mini-hepcidin: hepcidin analogues (7–9 amino-acid peptides)

The use of natural hepcidin as a potential replacement therapy in hepcidin-deficient conditions has major limitations. The half-life of natural hepcidin is very short due to its rapid renal excretion. Oral

absorption of hepcidin would be low due to its large size (~2.7 kDa). A series of 7- to 9- amino-acid peptides, “mini-hepcidins,” that mimic the activity of hepcidin has been developed. The rationale for their design was facilitated by the identification of the region on hepcidin and FPN molecules that is critical for their binding. Mutagenesis studies and biomolecular modelling indicated that the first 9 amino acids of the hepcidin N-terminus were important for hepcidin activity. Synthetic N-terminal peptides were further engineered to increase their bioavailability (Preza et al., 2011). Unnatural amino acids were introduced to increase resistance to proteolysis, and fatty acids were conjugated to prolong the half-life in the circulation and potentially increase oral absorption. One mini-hepcidin (PR65) has been tested. From the N to the C terminus, the primary sequence of PR65 was (all L-amino acids): iminodiacetic acid, threonine, histidine, diphenylalanine, β-homo proline, arginine, cysteine, arginine, and β-homo phenylalanine. The C-terminal carboxamide was derivatized with polyethylene glycol (PEG) linker and palmitic acid groups (Preza et al., 2011; Ramos et al., 2012). Minihepcidins could be useful for the prevention of iron overload, or may be used in combination with phlebotomy or chelation for the treatment of existing iron overload (Fung & Nemeth, 2013). Recently, a number of cyclic hepcidin analogues have been designed and synthesized with the aim to produce a cyclized hepcidin that maintains activity relative to native hepcidin. Cyclization of hepcidin results in highly stable peptides with a hepcidin-like fold. However, they do not induce FPN internalization in vitro (Clark et al., 2013).

10.1.2. TMPRSS6 a membrane serine protease

TMPRSS6 also called matriptase-2 and produced by the liver is a type II plasma membrane serine protease (TTSP). The 811-AA human protein is synthesized as an inactive zymogen and autoactivated by proteolytic cleavage. TMPRSS6 mRNA expression has been demonstrated to be induced by erythropoietin and hypoxia and by acute iron deprivation at the protein level. Haemojuvelin (HJV) was the first biologically relevant exogenous substrate for matriptase-2 to be identified (Lee, 2009). TMPRSS6 is mutated in iron-refractory iron-deficiency anaemia. It inhibits hepcidin expression by depressing BMP/SMAD signalling. In both animals and humans, mutations in TMPRSS6 result in elevated hepcidin expression and defective iron absorption, which consequently lead to iron-deficiency anaemia (Delbini et al., 2010). Studies that identified TMPRSS6 variants associated with haematological parameters, suggest that TMPRSS6 is crucial in the control of iron homeostasis and normal erythropoiesis (Cau et al., 2010). It has been demonstrated that the treatment of mouse models of HH (*Hfe*^{−/−}) and β-thalassemia intermedia with TMPRSS6 siRNA formulated in lipid nanoparticles increased hepcidin expression and lessened iron loading in both experimental models (Schmidt et al., 2013).

10.1.3. BMP6 analogues and small molecule activators of STAT/SMAD pathways

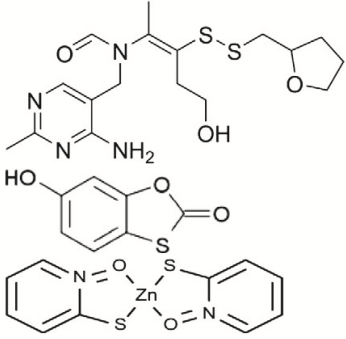
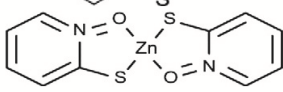
BMP6–SMAD signalling is one of the main regulatory mechanisms in the control of hepcidin expression. HFE interacts with the BMP6–SMAD signalling pathway, downstream of BMP6, to regulate hepcidin expression (Corradini et al., 2010). One technical challenge is to generate antibodies that can specifically recognize BMP6 without significant cross-reactivity to other BMPs. BMP6-like agonists may have a role to play as a new concept in therapeutic strategy.

A small-scale chemical screening study in zebrafish embryos identified the isoflavone genistein as an enhancer of hepcidin transcription (Zhen et al., 2013). Genistein is a soy-derived biologically active isoflavone that exhibits diverse health-promoting effects. A growing body of evidence shows that genistein presents pleiotropic effects. It influences lipid homeostasis and insulin resistance, and counteracts inflammatory processes (Nagaraju et al., 2013). The treatment of HepG2 cells with genistein increased both hepcidin transcript levels and promoter activity. The effect of genistein on hepcidin expression did not depend on increased cellular iron uptake, but was impaired by mutation of

Table 1
Direct and indirect Hepcidin agonists and antagonists.

Direct and indirect hepcidin agonists	
Mini-hepcidin	
P65	
Monoclonal antibodies	
LY2787106	
Serine protease	
TMPS6	
BMP6 analogues	
Genistein	
Anticalins	
PRS-080	
PRS-110	
Spiegelmers	
NOX-H94	
NOX-H94002	
Inhibitors of Hepcidin production	
Targeting the BMP-HJV-SMAD pathway	
–Dorsomorphin	
–Dorsomorphin derivatives	
LDN-193189	
DM-3189	
Anti-cytokine agents	
–anti-TNFα antibody	
Golimumab	
STAT3 inhibitors	
–AG 490	

Table 1 (continued)

– PpYLKTL	H-Pro-Tyr-(PO ₃ H ₂)-Leu-Lys-Thr-Lys-Ala-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Leu-Ala-Ala-Pro-OH
Pharmacological compounds with hepcidin antagonistic properties	
Fursultiamin	
Thioxolone	
Pyrrhithione zinc	
Vitamin C	
Vitamin A	
Vitamin D	
Statins	

either BMP response elements or the STAT3-binding site in the hepcidin promoter (Zhen et al., 2013). Genistein and other candidate molecules may subsequently be developed into new therapies for iron-overload syndromes.

10.2. Direct and indirect hepcidin antagonists

10.2.1. Antibodies, short interference RNA and antisense oligonucleotides against hepcidin

10.2.1.1. Monoclonal antibodies. Strategies have been developed that neutralize hepcidin activity by directly binding to the hepcidin peptide through monoclonal antibodies (mAbs), engineered protein and RNA-based binders. High-affinity antibodies specific for human hepcidin (hHepc) have been generated, and hHepc knock-in mice have been produced. Hepcidin mRNA suppression or antibody-mediated neutralization was able to overcome inflammation-induced anaemia in a mouse model (Sasu et al., 2010). RNA interference (RNAi) and gene-silencing antisense oligonucleotides that target transcription or translation of hepcidin are other approaches to develop therapeutic strategies for inflammation-induced anaemia. Antisense oligonucleotides that inhibit the translation of hepcidin or its regulators, such as HJV, are currently in the discovery stages of development.

Surface markers, such as CD2, CD3, CD4, CD25, and CD52, expressed on T-cells have been discovered and are now specific therapeutic targets. CD52 mAb targets the cell surface CD52 and is effective in depleting lymphocytes through cytolytic effects *in vivo*. The aim of a recent study was to investigate the therapeutic effect of anti-mouse CD52 mAb on Fe-deficient anaemia in inflammatory bowel disease. The results indicated that anti-CD52 therapy may ameliorate Fe-deficient anaemia (Wang et al., 2014). Human or humanized mAbs against hepcidin have been developed by scientists at Lilly (US Patent 7820163) and Amgen (US Patent Application 12/022515). To examine the contribution of hepcidin to inflammatory anaemia, and the effect of mAbs, a mouse model of inflammation-induced anaemia was required (Sasu et al., 2010). A humanized monoclonal antibody against hepcidin is in a phase I human trial. This study will evaluate the safety of LY2787106 in patients with cancer and anaemia.

10.2.1.2. Anti-BMP6 monoclonal antibody and antisense oligonucleotides. Anti-BMP6 monoclonal antibody therapy is another option to specifically block BMP6-mediated hepcidin regulation. The administration of

anti-BMP mAb in healthy mice decreased hepatic hepcidin expression and increased serum iron levels (Andriopoulos et al., 2009). In the Hfe transgenic mouse model of excess hepcidin and iron-deficiency anaemia, treatment with anti-BMP6 improved the anaemia by lowering hepcidin levels (Corradini et al., 2010).

Antisense oligonucleotides that inhibit the translation of hepcidin or its regulators such as HJV are in the discovery stages of development. Systemic delivery of antisense molecules results in preferential delivery to the liver, making them possible agents to target hepcidin (Graham et al., 1998). RNA-based targeting of hepcidin regulators, such as HJV antisense oligonucleotides and Tfr2 siRNA, is under development. Treatment with Tfr2 siRNA potentially decreased hepcidin mRNA in a rat model of inflammation-induced anaemia (Querbes et al., 2012).

10.2.2. Anticalins: specific anti-hepcidin and Spiegelmer-based hepcidin

Anticalins are a novel class of compounds, with applications in hepcidin pharmacology. They are engineered derivatives of naturally occurring binding proteins called lipocalins. Lipocalins are mediators in a context of inflammation. They present high target specificity, good tissue penetration and low immunogenicity. They are involved in the transport of small hydrophobic molecules such as steroids and lipids into the cell. Due to their compact molecular architecture (they comprise a single polypeptide chain), they could be of interest as a therapy (Gebauer & Skerra, 2012). Recently, anticalin PRS-080, which specifically binds human hepcidin with sub-nanomolar affinity, has been described. It is a selective specific inhibitor that blocks the interaction between hepcidin and the FPN receptor. Significant dose-dependent and hepcidin-specific iron mobilization was observed in Cynomolgus monkeys, following a single 3 mg/kg *i.v.* bolus of PRS-080. A programme is currently under way to organize the first human clinical trial.

Different Spiegelmer-based hepcidin binders have now been identified. Spiegelmers are L-enantiomeric oligonucleotides that can be designed to inhibit pharmacologically relevant target molecules. They bind to the targets in a manner comparable to antibodies. Given their non-natural, mirror-image nature, Spiegelmers are nuclease-resistant and immunologically passive. Spiegelmers can fold into distinct three-dimensional structures that generate high-affinity ligands (Klussmann et al., 1996). The best binding Spiegelmer, NOX-H94, has been modified to the L-oligonucleotide itself (NOX-H94002) and its PEGylated variant NOX-H94. NOX-H94 is a structured mirror-image L-oligoribonucleotide that binds human hepcidin with high affinity, thereby blocking its biological function (Schwoebel et al., 2013).

10.2.3. Inhibitors of hepcidin production

Inhibition of hepcidin is a potential therapeutic approach to improve the utilization of iron from intracellular stores in patients suffering from anaemia of chronic inflammation.

10.2.3.1. Targeting the BMP6–HJV–SMAD pathway. As the BMP pathway plays a key role in stimulating hepcidin transcription, sequestration of BMP ligands could decrease hepcidin expression. Heparin, a glycosaminoglycan widely used as an anticoagulant, is known to bind BMPs. The treatment of mice with pharmacological doses of heparin inhibited liver hepcidin mRNA expression and SMAD phosphorylation, reduced spleen iron concentrations, and increased serum iron (Poli et al., 2011). Heparins are efficient hepcidin inhibitors both in vitro and in vivo, but their anticoagulant activity limits their therapeutic use. Non-anticoagulant heparins, produced by N-acetylation and oxidation/reduction (glycol-split) that abrogates antithrombin binding affinity, have recently been studied. These non-anticoagulant compounds impair BMP/SMAD signalling with no evident adverse effect in vivo (Poli et al., 2014). They may offer a strategy for the treatment of diseases with high hepcidin levels. Inhibition of BMP type I receptor signalling by small molecule inhibitors was also effective in moderating iron-restricted anaemia. Through a structure–activity relationship study of dorsomorphin derivatives, optimized compounds (LDN-193189 or DM-3189) with higher activity and specificity on BMP type I receptors have been also developed (Cuny et al., 2008). LDN-193189 lowers hepcidin levels, mobilizes spleen iron stores, increases serum iron and iron incorporation into reticulocytes (Sun et al., 2013).

Concerning these compounds derived from dorsomorphin, various important off-target effects persist. Programmes that aim to identify selective modulators have been developed. The challenge lies in the synthesis of potent and biologically available selective inhibitors of BMP type I receptor kinases. In this domain, 4-quinolylvinyl substituted dorsomorphin helped to highlight novel roles of this receptor system in pathophysiological processes (Hong & Yu, 2009).

Evidence of interplay between cholesterol and iron metabolism, has been demonstrated in macrophages. Data suggest that reducing intracellular free iron levels within macrophages by increasing the expression of macrophage FPN may be a promising strategy to increase the expression of cholesterol efflux transporters (Saeed et al., 2012). LDN-193189, a small molecule inhibitor of BMP signalling, has been studied. Serum iron levels were significantly higher following treatment with LDN-193189. Peritoneal macrophages isolated after treatment with LDN-193189 showed reduced intracellular iron and hydrogen peroxide production. To evaluate the effect on atherosclerosis, ApoE^{−/−} mice on a high-cholesterol diet were treated with LDN-193189. Significant reductions were found in intraplaque Oil Red O-positive lipid area, total plaque area, and plaque severity, along with elevated ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) immunoreactivity within plaque macrophage-rich regions. These findings suggest that LDN-193189 increases the expression of ABCA1 in macrophages within atherosclerotic plaques, thus limiting plaque progression.

Soluble HJV-Fc fusion protein (sHJV-Fc) is another agent that prevents the interaction between BMPs and their receptors. sHJV is known to bind BMP6, and this results in decreased SMAD signalling in the cell and decreased hepcidin expression. sHJV is a soluble fragment of the membrane-linked BMP co-receptor HJV, and the soluble and membrane form have opposing effects on hepcidin expression. In this context, the pharmacological inhibition of hepcidin expression via this pathway results in the mobilization of iron from the reticulo-endothelial system, stimulation of erythropoiesis and the correction of anaemia (Theurl et al., 2011).

Alcohol consumption has long been associated with changes in iron homeostasis. Anaemia and iron deficiency can be due to gastrointestinal blood loss arising from the complications of alcohol abuse. Iron-mediated cell signalling has been reported to be involved in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease (Harrison-Findik, 2009).

The mechanism was recently shown to involve inhibition of the BMP–SMAD pathway. The inhibition of BMP receptor activation and signalling by alcohol may involve various mechanisms such as hypoxia in the liver and inhibition of SMADs binding to hepcidin promoter (Gerjevic et al., 2012).

10.2.3.2. Anti-cytokine agents. Another targeting pathway is via anti-cytokine agents, since hepcidin expression is strongly induced by IL-6/STAT3. The benefit of these agents used to treat inflammatory diseases may be provided by reducing hepcidin expression. Anti-TNF α antibody (golimumab) in patients with rheumatoid arthritis is associated with a continuous decrease in hepcidin levels (Doyle et al., 2013).

Targeting the erythropoietic pathway may also be a pharmacological strategy. A single injection of erythropoietin (EPO) in human volunteers results in a rapid reduction of serum hepcidin (Ashby et al., 2010). Erythropoiesis-stimulating agents such as prolyl hydroxylase inhibitors have been tested in clinical trials. The increased production of EPO was able to lower hepcidin. Unfortunately, however, these biological effects were associated with major detrimental disorders (Schwoebel et al., 2013).

10.2.3.3. STAT3 inhibitors. The high level of hepcidin expression linked to the STAT3 pathway led to the testing of STAT3 inhibitors. Treatment with small molecule STAT3 inhibitors such as AG490 and the synthetic peptide inhibitor of STAT3 (PpYIKTK) abolished hepcidin expression in mice. AG490 inhibits the phosphorylation of STAT3 by JAK2, while the PpYIKTK disrupts phospho-STAT3 dimerization, which is required for binding target genes (Fatih et al., 2010). In anaemia, AG490 could be a possible strategy to attenuate hepcidin-mediated biological actions in order to enhance iron uptake through enterocytes and iron release from macrophages. Another STAT3 inhibitor is curcumin. It has been proposed as a therapeutic adjuvant during inflammation, and its potential iron chelating activity has been reported (Aggarwal & Shishodia, 2006). Another way to inhibit hepcidin production is associated with blocking antibodies to the IL-6 ligand. This strategy resulted in hepcidin lowering effects. Siltuximab, previously known as CNTO 328, is a chimeric, immunoglobulin (Ig) G κ mAb that binds and neutralizes human IL-6 with high affinity and specificity with potential therapeutic effects (van Rhee et al., 2010).

10.2.3.4. Pharmacological compounds with hepcidin antagonistic properties. One group of compounds with hepcidin antagonistic properties are cardiac glycosides. Nanomolar concentrations of cardiac glycosides prevent the internalization of FPN. These concentrations are much lower than those known to cause adverse effects (Riganti et al., 2011).

Small molecules identified as hepcidin antagonists such as fursultiamin, thioxolone, and pyrithione zinc are FDA-approved compounds that contain a sulphur moiety with potential thiol-directed chemical reactivity. These compounds prevent the interaction between hepcidin and FPN. Fursultiamin, a vitamin B1 derivative, is the thiamine derivative, thiamine tetrahydrofurfuryl disulphide (TTFD), which is absorbed from the intestinal tract and converted into thiamine pyrophosphate (TPP). It plays an important role as a cofactor for enzymes of the metabolic pathways involved in the production of adenosine triphosphate (ATP). Because fursultiamin prevents hepcidin-mediated endocytosis of FPN, it is hypothesized that fursultiamin may prevent FPN ubiquitination and thus interfere with the hepcidin/FPN interaction (Fung et al., 2013).

Recent advances in our understanding of the molecular mechanisms of iron regulation reveal that the production of hepcidin may be regulated by the vitamin environment. As we reported previously, in conditions of vitamin D deficiency, elevated synthesis of hepcidin by hepatocytes may increase intracellular and systemic concentrations of hepcidin and decrease membrane expression of FPN in these cells. On the other hand, iron bioavailability seems to be regulated by antioxidant vitamins. Correlations between biomolecule oxidation products and

iron status biomarkers have been observed in numerous studies (Cottin et al., 1998; de Valk & Marx, 1999). It has been proposed that hepcidin was able to protect tissue by inhibiting lipid peroxidation through indirect processes involving iron metabolism. The relationship between antioxidants and hepcidin mobilization appears complex given the versatility of iron as an oxidizing/reducing agent. The relationship between an antioxidant such as vitamin C and hepcidin expression has not yet been clearly explained. However, it is known that in patients with chronic renal failure, treatment with high doses of EPO or vitamin C can correct the functional iron deficiency (Pinto et al., 2008). In a human liver carcinoma cell line (HepG2), it has been reported that vitamin C directly inhibits hepcidin expression (Chiu et al., 2012). Concerning the effect of vitamin A deficiency on iron status; vitamin A metabolites have been shown to affect the regulation of the synthesis and catabolism of proteins involved in iron metabolism. Vitamin A deficiency increased liver hepcidin mRNA levels (Schroeder et al., 2007; Arruda et al., 2009).

A number of studies have highlighted the association between increased inflammatory indices and a reduced response to erythropoietin-stimulating agents (ESAs). It has been suggested that statins may have a positive impact on ESA responsiveness. A recent study showed that simvastatin significantly suppressed the mRNA expression of hepcidin in HepG2 cells (Chang et al., 2013). Statins, which are inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl co-enzyme A reductase, not only reduce lipid levels, but also have numerous pleiotropic effects. In fact, the precise molecular mechanisms responsible for changes in hepcidin mRNA expression are still unclear (Ha et al., 2009). Statin therapy may improve responsiveness to erythropoietin-stimulating agents in patients with end-stage renal disease. Recent studies suggest that statins increase the erythropoiesis response by targeting hepcidin and iron regulation pathways, independently of erythropoietin (Chang et al., 2013). One possible interpretation of these results is that the antioxidant properties of statins may be implicated in these effects (Sicard et al., 2007, 2008).

11. Hepcidin: an endogenous cytoprotective agent in cardiovascular pathophysiology and possible therapeutic targets?

The presence of hepcidin in body fluids raises questions about its function within these compartments. The role of hepcidin as an antimicrobial agent is well established (Verga Falzacappa & Muckenthaler, 2005) and given that body fluids play an important role in the natural defences against inflammation, it is conceivable that hepcidin plays a role in cellular protection.

It is now well established that LPS mediates its effects through TLR4, for the induction of pro-inflammatory genes. LPS, potent inducers of pro-inflammatory cytokines, are responsible for endotoxemic shock (Lecour et al., 2002). Endotoxemic shock is associated with a pro-inflammatory response and hypoferrremia. Hepcidin has emerged as the possible pathogenic mediator of hypoferrremia (Paya et al., 1995). In cholestatic mice, pre-treatment with hepcidin reversed the adverse effects of LPS administration and thus reduced early mortality. In this experimental model, pre-treatment with recombinant hepcidin significantly reduced LPS-induced pro-inflammatory cytokines and hepatocellular injury (Huang et al., 2012).

Myocardial protection aims to prevent reversible post-ischemic cardiac dysfunction and irreversible myocardial cell death (myocardial infarction) that occur as a consequence of myocardial ischemia and/or ischemic-reperfusion injury. Cardiopulmonary bypass (CPB) and the necessary period of ischemia-reperfusion are situations in cardiac surgery that promote oxidative stress. Reperfusion injury occurs, for example, after coronary artery bypass grafting when the ischemic myocardium is again provided with a supply of blood. Its most serious manifestations are arrhythmia and myocardial stunning, which are associated with free radical production (Clermont et al., 2002; Goudeau et al., 2007). The role of iron in reperfusion injury has been shown by indirect evidence: during reperfusion syndrome, the binding of iron to the

chelator desferrioxamine protects the myocardium subjected to ischemia-reperfusion. The significant decrease in apoptosis in hearts treated with desferrioxamine could be considered evidence of a close link between iron chelation, oxidative stress and the promotion of apoptotic death in ischemia-reperfusion injury (Dobsak et al., 2002; Galaris et al., 2006). As we previously reported, hypoxia resulted in the strong up-regulation of hepcidin mRNA and protein expression in the heart. The regulated expression of hepcidin in the heart suggests that hepcidin may play an important role in the development of cardiac diseases (Merle et al., 2007). CPB is a convenient and highly relevant model to study novel biomarkers of acute kidney injury (AKI). Urinary hepcidin has been suggested as a candidate biomarker of AKI (Ho et al., 2009). In a clinical study, the relationship between changes in serum hepcidin, urinary hepcidin concentrations, and the urinary hepcidin/creatinine ratio were examined in a cohort of patients undergoing cardiothoracic surgery with CPB. Urinary hepcidin and the hepcidin/creatinine ratio were shown to be biomarkers of AKI after CPB, with an inverse association between its increase at 24 h and the risk of AKI in the first five post-operative days (Prowle et al., 2012). In a recent study, it was reported that serum hepcidin and urinary hepcidin increased immediately post-operatively and at 24 h (Haase-Fielitz et al., 2013). In this study of 100 patients undergoing cardiac surgery, low preoperative urine and plasma hepcidin concentrations were predictors of in-hospital mortality. These results suggest that hepcidin plays an important role in modulating and determining the course and outcome of inflammation-mediated diseases.

Chronic heart failure (CHF) is a cardiovascular disease with a high rate of mortality. Anaemia is a common comorbidity in these patients, and is associated with a worse prognosis. However, the pathophysiology of anaemia in these patients is still not very well understood and is thought to be a complex and multifactorial process (Anand, 2008). Patients with CHF who became anaemic had higher levels of hepcidin (Martinez-Ruiz et al., 2012).

Finally, as mentioned above, several reports suggest that hepcidin concentrations could be used to determine cardiovascular risk. It has been hypothesized that increased hepcidin concentrations may aggravate cardiovascular risk by modifying intracellular iron concentrations of macrophages and by increasing their atherogenic potential (Lapenna et al., 2007).

12. Conclusion

Iron is the only micronutrient known to have a regulatory hormone, hepcidin, that responds to both nutrient status and infections. Hepcidin acts to block both iron absorption in the gut and iron release from macrophages through a common mechanism. The discovery of the hormonal iron-regulating role of hepcidin, followed by the elucidation of its mechanism of action has led to better understanding of the pathophysiology of human iron disorders. Positive regulators of hepcidin, which lead to reduced ferroportin and decreased availability of iron, include increased circulating iron and inflammatory cytokines. Measuring levels of hepcidin could be useful in diagnosing several cardiovascular dysfunctions associated with haematological diseases. Iron-overload diseases are typically insidious and cause progressive and irreversible organ injury before clinical symptoms appear. In addition, better understanding of the relationship between the structure and function of hepcidin and the hepcidin-FPN complex may lead to the design of hepcidin antagonists and agonists for human therapy. The development of research in this domain offers new clinical potential in terms of diagnosis and therapy.

Funding

This work was supported by grants from the French Ministry of Research, from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from the Regional Council of Burgundy.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank Martine Goiset for secretarial assistance and Philip Bastable for English assistance. The authors acknowledge the essential technical contribution of Andre Bouchot (Histologie – Plateau Technique Imagerie Cellulaire).

References

- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71, 1397–1421.
- Akel, S., Bertolotto, D., & Ruscetti, F. W. (2013). Crosstalk between the Smad and the mitogen-activated protein kinase pathways is essential for erythroid differentiation of erythroleukemia cells induced by TGF- β , activin, hydroxyurea and butyrate. *J Leuk (Los Angel)* 1.
- Alkhateeb, A. A., & Connor, J. R. (2013). The significance of ferritin in cancer: anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1836, 245–254.
- Amato, A., Santoro, N., Calabro, P., Grandone, A., Swinkels, D. W., Perrone, L., et al. (2010). Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes (Lond)* 34, 1772–1774.
- Anand, I. S. (2008). Anemia and chronic heart failure implications and treatment options. *J Am Coll Cardiol* 52, 501–511.
- Anderson, G. J., & Darshan, D. (2008). Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat Chem Biol* 4, 15–16.
- Anderson, G. J., & Vulpe, C. D. (2009). Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci* 66, 3241–3261.
- Andriopoulos, B., Jr., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S. A., Chen, S., Grgurevic, L., et al. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41, 482–487.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., et al. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050–1059.
- Arruda, S. F., Siqueira, E. M., & de Valencia, F. F. (2009). Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition* 25, 472–478.
- Ashby, D. R., Gale, D. P., Busbridge, M., Murphy, K. G., Duncan, N. D., Cairns, T. D., et al. (2009). Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 75, 976–981.
- Ashby, D. R., Gale, D. P., Busbridge, M., Murphy, K. G., Duncan, N. D., Cairns, T. D., et al. (2010). Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica* 95, 505–508.
- Babbitt, J. L., & Lin, H. Y. (2010). Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* 55, 726–741.
- Bacchetta, J., Zaritsky, J. J., Sea, J. L., Chun, R. F., Lisse, T. S., Zavala, K., et al. (2014). Suppression of iron-regulatory hepcidin by vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 25, 564–572.
- Bayeva, M., Chang, H. C., Wu, R., & Ardehali, H. (2013). When less is more: novel mechanisms of iron conservation. *Trends Endocrinol Metab* 24, 569–577.
- Bekri, S., Gual, P., Anty, R., Luciani, N., Dahman, M., Ramesh, B., et al. (2006). Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131, 788–796.
- Besson-Fournier, C., Latour, C., Kautz, L., Bertrand, J., Ganz, T., Roth, M. P., et al. (2012). Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* 120, 431–439.
- Bories, G., Colin, S., Vanhoutte, J., Derudas, B., Copin, C., Fanchon, M., et al. (2013). Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages. *Circ Res* 113, 1196–1205.
- Bovijn, C., Ulrichts, P., De Smet, A. S., Cateeuw, D., Beyaert, R., Tavernier, J., et al. (2012). Identification of interaction sites for dimerization and adapter recruitment in Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 287, 4088–4098.
- Brechar, S., & Tschirhart, E. J. (2008). Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol* 84, 1223–1237.
- Cabantchik, Z. I. (2014). Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol* 5, 45.
- Cairo, G., & Recalcati, S. (2007). Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev Mol Med* 9, 1–13.
- Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S., Sposi, N. M., Stafsnes, M., Fecchi, K., et al. (2006). TIR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* 119, 4486–4498.
- Camascella, C. (2009). BMP6 orchestrates iron metabolism. *Nat Genet* 41, 386–388.
- Cau, M., Melis, M. A., Congiu, R., & Galanelli, R. (2010). Iron-deficiency anemia secondary to mutations in genes controlling hepcidin. *Expert Rev Hematol* 3, 205–216.
- Chang, C. C., Chiu, P. F., Chen, H. L., Chang, T. L., Chang, Y. J., & Huang, C. H. (2013). Simvastatin downregulates the expression of hepcidin and erythropoietin in HepG2 cells. *Hemodial Int* 17, 116–121.
- Chiu, P. F., Ko, S. Y., & Chang, C. C. (2012). Vitamin C affects the expression of hepcidin and erythropoietin receptor in HepG2 cells. *J Ren Nutr* 22, 373–376.
- Chung, B., Matak, P., McKie, A. T., & Sharp, P. (2007). Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 human hepatoma cells. *J Nutr* 137, 2366–2370.
- Clark, R. J., Preza, G. C., Tan, C. C., van Dijk, J. W., Fung, E., Nemeth, E., et al. (2013). Design, synthesis, and characterization of cyclic analogues of the iron regulatory peptide hormone hepcidin. *Biopolymers* 100, 519–526.
- Clark, R. J., Tan, C. C., Preza, G. C., Nemeth, E., Ganz, T., & Craik, D. J. (2011). Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem Biol* 18, 336–343.
- Clemont, G., Vergely, C., Jazayeri, S., Lahet, J. J., Goudeau, J. J., Lecour, S., et al. (2002). Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 96, 80–87.
- Coimbra, S., Catarino, C., & Santos-Silva, A. (2013). The role of adipocytes in the modulation of iron metabolism in obesity. *Obes Rev* 14, 771–779.
- Constante, M., Jiang, W., Wang, D., Raymond, V. A., Bilodeau, M., & Santos, M. M. (2006). Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G229–G237.
- Corradini, E., Schmidt, P. J., Meynard, D., Garuti, C., Montosi, G., Chen, S., et al. (2010). BMP6 treatment compensates for the molecular defect and ameliorates hemochromatosis in Hfe knockout mice. *Gastroenterology* 139, 1721–1729.
- Corwin, H. L., & Krantz, S. B. (2000). Anemia of the critically ill: “acute” anemia of chronic disease. *Crit Care Med* 28, 3098–3099.
- Cottin, Y., Doise, J. M., Maupoil, V., Tanniere-Zeller, M., Dalloz, F., Maynadie, M., et al. (1998). Plasma iron status and lipid peroxidation following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* 12, 236–241.
- Cuny, G. D., Yu, P. B., Laha, J. K., Xing, X., Liu, J. F., Lai, C. S., et al. (2008). Structure–activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4388–4392.
- Dani, C. (2013). Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)* 37, 163–166.
- Daniels, T. R., Bernabeu, E., Rodriguez, J. A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D. A., et al. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta* 1820, 291–317.
- Darshan, D., & Anderson, G. J. (2009). Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biomaterials* 22, 77–87.
- De Domenico, I., Lo, E., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2009). Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3800–3805.
- De Domenico, I., Ward, D. M., Langelier, C., Vaughn, M. B., Nemeth, E., Sundquist, W. L., et al. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18, 2569–2578.
- de Valk, B., & Marx, J. J. (1999). Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 159, 1542–1548.
- Delbini, P., Vaja, V., Graziadei, G., Duca, L., Nava, I., Refaldi, C., et al. (2010). Genetic variability of TMPRSS6 and its association with iron deficiency anaemia. *Br J Haematol* 151, 281–284.
- Delima, R. D., Chua, A. C., Tirmitz-Parker, J. E., Gan, E. K., Croft, K. D., Graham, R. M., et al. (2012). Disruption of hemochromatosis protein and transferrin receptor 2 causes iron-induced liver injury in mice. *Hepatology* 56, 585–593.
- Detivaud, L., Island, M. L., Jouanolle, A. M., Ropert, M., Bardou-Jacquet, E., Le Lan, C., et al. (2013). Ferroportin diseases: functional studies, a link between genetic and clinical phenotype. *Hum Mutat* 34, 1529–1536.
- Dobsak, P., Siegelova, J., Wolf, J. E., Rochette, L., Eicher, J. C., Vasku, J., et al. (2002). Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegia and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model. *Pathophysiology* 9, 27.
- Doyle, M. K., Rahman, M. U., Frederick, B., Birbara, C. A., de Vries, D., Toedter, G., et al. (2013). Effects of subcutaneous and intravenous golimumab on inflammatory biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: results of a phase 1, randomized, open-label trial. *Rheumatology (Oxford)* 52, 1214–1219.
- Ebner, N., & von Haehling, S. (2013). Iron deficiency in heart failure: a practical guide. *Nutrients* 5, 3730–3739.
- Evstatiev, R., & Gasche, C. (2012). Iron sensing and signalling. *Gut* 61, 933–952.
- Fatih, N., Camberlein, E., Island, M. L., Corlu, A., Abgueguen, E., Detivaud, L., et al. (2010). Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *J Mol Med (Berl)* 88, 477–486.
- Frazer, D. M., Inglis, H. R., Wilkins, S. J., Millard, K. N., Steele, T. M., McLaren, G. D., et al. (2004). Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut* 53, 1509–1515.
- Fung, E., & Nemeth, E. (2013). Manipulation of the hepcidin pathway for therapeutic purposes. *Haematologica* 98, 1667–1676.
- Fung, E., Sugianto, P., Hsu, J., Damoiseaux, R., Ganz, T., & Nemeth, E. (2013). High-throughput screening of small molecules identifies hepcidin antagonists. *Mol Pharmacol* 83, 681–690.
- Gabrielsen, J. S., Gao, Y., Simcox, J. A., Huang, J., Thorup, D., Jones, D., et al. (2012). Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 122, 3529–3540.
- Galaris, D., Barbouti, A., & Korantzopoulos, P. (2006). Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des* 12, 2875–2890.
- Galesloot, T. E., Holveijn, S., Kiemeny, L. A., de Graaf, J., Vermeulen, S. H., & Swinkels, D. W. (2014). Serum hepcidin is associated with presence of plaque in postmenopausal women of a general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 446–456.
- Galesloot, T. E., Vermeulen, S. H., Geurts-Moespot, A. J., Klaver, S. M., Kroot, J. J., van Tienoven, D., et al. (2011). Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 117, e218–e225.
- Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., & Recalcati, S. (2014). Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics* 6, 1336–1345.

- Ganz, T. (2005). Hepcidin—a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18, 171–182.
- Ganz, T. (2013). Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93, 1721–1741.
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1434–1443.
- Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A. S., & Enns, C. A. (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 9, 217–227.
- Ge, X. H., Wang, Q., Qian, Z. M., Zhu, L., Du, F., Yung, W. H., et al. (2009). The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J Nutr Biochem* 20, 860–865.
- Gebauer, M., & Skerra, A. (2012). Anticlinic small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol* 503, 157–188.
- Gerjevic, L. N., Liu, N., Lu, S., & Harrison-Findik, D. D. (2012). Alcohol activates TGF- β but inhibits BMP receptor-mediated Smad signaling and Smad4 binding to hepcidin promoter in the liver. *Int J Hepatol* 2012, 459278.
- Gkoutas, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 1820, 188–202.
- Gong, Q., Yin, H., Fang, M., Xiang, Y., Yuan, C. L., Zheng, G. Y., et al. (2008). Heme oxygenase-1 upregulation significantly inhibits TNF- α and Hmgb1 releasing and attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol* 8, 792–798.
- Goudeau, J. J., Clermont, G., Guillery, O., Lemaire-Ewing, S., Musat, A., Vernet, M., et al. (2007). In high-risk patients, combination of antiinflammatory procedures during cardiopulmonary bypass can reduce incidences of inflammation and oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol* 49, 39–45.
- Graham, M. J., Crooke, S. T., Monteith, D. K., Cooper, S. R., Lemonidis, K. M., Stecker, K. K., et al. (1998). In vivo distribution and metabolism of a phosphorothioate oligonucleotide within rat liver after intravenous administration. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 447–458.
- Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., & Rochette, L. (2014). Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* 58, 1721–1738.
- Ha, C. E., Ha, J. S., Theriault, A. G., & Bhagavan, N. V. (2009). Effects of statins on the secretion of human serum albumin in cultured HepG2 cells. *J Biomed Sci* 16, 32.
- Haase-Fielitz, A., Plass, M., Kuppe, H., Hietzer, R., Ostland, V., Westphal, S., et al. (2013). Low preoperative hepcidin concentration as a risk factor for mortality after cardiac surgery: a pilot study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 145, 1380–1386.
- Harrison-Findik, D. D. (2009). Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol* 15, 1186–1193.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., & Andrews, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285–297.
- Ho, J., Lucy, M., Krokkin, O., Hayglass, K., Pascoe, E., Darroch, G., et al. (2009). Mass spectrometry-based proteomic analysis of urine in acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a nested case-control study. *Am J Kidney Dis* 53, 584–595.
- Hong, C. C., & Yu, P. B. (2009). Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 409–418.
- Huang, M. L., Austin, C. J., Sari, M. A., Rahmanto, Y. S., Ponka, P., Vyorol, D., et al. (2013). Hepcidin bound to α 2-macroglobulin reduces ferroportin-1 expression and enhances its activity at reducing serum iron levels. *J Biol Chem* 288, 25450–25465.
- Huang, Y. H., Yang, Y. L., Tiao, M. M., Kuo, H. C., Huang, L. T., & Chuang, J. H. (2012). Hepcidin protects against lipopolysaccharide-induced liver injury in a mouse model of obstructive jaundice. *Peptides* 35, 212–217.
- Ikeeda, Y., Tajima, S., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., Tomita, S., et al. (2012). Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes. *PLoS One* 7, e40465.
- Isoda, M., Hanawa, H., Watanabe, R., Yoshida, T., Toba, K., Yoshida, K., et al. (2010). Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem* 21, 749–756.
- Kansagara, D., Dyer, E., Englander, H., Fu, R., Freeman, M., & Kagen, D. (2013). Treatment of anemia in patients with heart disease: a systematic review. *Ann Intern Med* 159, 746–757.
- Kasvosve, I. (2013). Effect of ferroportin polymorphism on iron homeostasis and infection. *Clin Chim Acta* 416, 20–25.
- Klopfleisch, R., & Olias, P. (2012). The pathology of comparative animal models of human haemochromatosis. *J Comp Pathol* 147, 460–478.
- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A., & Furste, J. P. (1996). Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol* 14, 1112–1115.
- Kollura, G. K., Shen, X., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35, 5–20.
- Kom, G. D., Schwedhelm, E., Nielsen, P., & Boger, R. H. (2006). Increased urinary excretion of 8-iso-prostaglandin F $_{2\alpha}$ in patients with HFE-related hemochromatosis: a case-control study. *Free Radic Biol Med* 40, 1194–1200.
- Koskenkorva-Frank, T. S., Weiss, G., Koppenol, W. H., & Burckhardt, S. (2013). The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 65, 1174–1194.
- Krause, A., Neitz, S., Magert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., et al. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480, 147–150.
- Kulaksiz, H., Theilig, F., Bachmann, S., Gehrke, S. G., Rost, D., Janetzko, A., et al. (2005). The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 184, 361–370.
- Laarakkers, C. M., Wiegierinck, E. T., Klaver, S., Kolodziejczyk, M., Gille, H., Hohlbaum, A. M., et al. (2013). Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: detection and characterization of a novel hepcidin isoform. *PLoS One* 8, e75518.
- Lapenna, D., Pierdomenico, S. D., Ciofani, G., Uchino, S., Neri, M., Giamberardino, M. A., et al. (2007). Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 42, 492–498.
- Lawen, A., & Lane, D. J. (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid Redox Signal* 18, 2473–2507.
- Layoun, A., & Santos, M. M. (2012). Bacterial cell wall constituents induce hepcidin expression in macrophages through MyD88 signaling. *Inflammation* 35, 1500–1506.
- Lecour, S., Chevet, D., Maupoil, V., Moisan, M., Bernard, C., Zahnd, J. P., et al. (2002). Intrarenal detection of nitric oxide using electron spin resonance spectroscopy in hypertensive lipopolysaccharide-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 40, 9–17.
- Lee, P. (2009). Role of matriptase-2 (TMPRSS6) in iron metabolism. *Acta Haematol* 122, 87–96.
- Li, X., Li, H., Lu, N., Feng, Y., Huang, Y., & Gao, Z. (2012). Iron increases liver injury through oxidative/nitrosative stress in diabetic rats: involvement of nitrotyrosination of glucokinase. *Biochimie* 94, 2620–2627.
- Lian, J., Xu, L., Huang, Y., Le, Y., Jiang, D., Yang, X., et al. (2013). Meta-analyses of HFE variants in coronary heart disease. *Gene* 527, 167–173.
- Luciani, N., Brasse-Lagnel, C., Poli, M., Anty, R., Lesueur, C., Cormont, M., et al. (2011). Hemojuvelin: a new link between obesity and iron homeostasis. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1545–1551.
- Ma, Y., Zhou, T., Kong, X., & Hider, R. C. (2012). Chelating agents for the treatment of systemic iron overload. *Curr Med Chem* 19, 2816–2827.
- MacKenzie, E. L., Iwasaki, K., & Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10, 997–1030.
- Martinez-Ruiz, A., Ternel-Osorio, P. L., Sanchez-Mas, J., Perez-Fornieles, J., Vilchez, J. A., Martinez-Hernandez, P., et al. (2012). Soluble TNF α receptor type I and hepcidin as determinants of development of anemia in the long-term follow-up of heart failure patients. *Clin Biochem* 45, 1455–1458.
- Meli, R., Mattace-Raso, G., Itrace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., et al. (2013). High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PLoS One* 8, e66570.
- Merle, U., Fein, E., Gehrke, S. G., Stremmel, W., & Kulaksiz, H. (2007). The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 148, 2663–2668.
- Millonig, G., Ganzleben, L., Peccerella, T., Casanovas, G., Brodzia-Jarosz, L., Breitkopf-Heinlein, K., et al. (2012). Sustained submicromolar H2O2 levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Biol Chem* 287, 37472–37482.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147, 35–51.
- Moyer, T. P., Highsmith, W. E., Smyrk, T. C., & Gross, J. B., Jr. (2011). Hereditary hemochromatosis: laboratory evaluation. *Clin Chim Acta* 412, 1485–1492.
- Munoz, M., Garcia-Erce, J. A., & Remacha, A. F. (2011). Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol* 64, 287–296.
- Munoz-Bravo, C., Gutierrez-Bedmar, M., Gomez-Aracena, J., Garcia-Rodriguez, A., & Navajas, J. F. (2013). Iron: protector or risk factor for cardiovascular disease? Still controversial. *Nutrients* 5, 2384–2404.
- Murphy, C. J., & Oudit, G. Y. (2010). Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Card Fail* 16, 888–900.
- Nagaraju, G. P., Zafar, S. F., & El-Rayes, B. F. (2013). Pleiotropic effects of genistein in metabolic, inflammatory, and malignant diseases. *Nutr Rev* 71, 562–572.
- Nairz, M., Schleicher, U., Schroll, A., Sonnweber, T., Theurl, I., Ludwigczek, S., et al. (2013). Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in Salmonella infection. *J Exp Med* 210, 855–873.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., et al. (2004a). IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113, 1271–1276.
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., et al. (2004b). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090–2093.
- Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., & Ganz, T. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101, 2461–2463.
- Neufeld, E. J., Galanello, R., Viprakasit, V., Aydinok, Y., Piga, A., Harmatz, P., et al. (2012). A phase 2 study of the safety, tolerability, and pharmacodynamics of FBS0701, a novel oral iron chelator, in transfusional iron overload. *Blood* 119, 3263–3268.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., & Petersen, N. O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16, 291–299.
- Oliveira, S. J., de Sousa, M., & Pinto, J. P. (2011). ER stress and iron homeostasis: a new frontier for the UPR. *Biochem Res Int* 2011, 896474.
- Palaneeswari, M. S., Ganesh, M., Karthikeyan, T., Devi, A. J., & Mythili, S. V. (2013). Hepcidin—minireview. *J Clin Diagn Res* 7, 1767–1771.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., & Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276, 7806–7810.
- Paya, D., Maupoil, V., Schott, C., Rochette, L., & Stoclet, J. C. (1995). Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats. *Cardiovasc Res* 30, 952–959.
- Peters, H. P., Laarakkers, C. M., Swinkels, D. W., & Wetzels, J. F. (2010). Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 25, 848–853.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroy, P., Turlin, B., Brissot, P., et al. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276, 7811–7819.

- Pinto, J. P., Ribeiro, S., Pontes, H., Thowfequ, S., Tosh, D., Carvalho, F., et al. (2008). Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP α . *Blood* 111, 5727–5733.
- Piperno, A., Galimberti, S., Mariani, R., Pelucchi, S., Ravasi, G., Lombardi, C., et al. (2011). Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood* 117, 2953–2959.
- Polli, M., Asperti, M., Naggi, A., Campostrini, N., Girelli, D., Corbella, M., et al. (2014). Glycol-split nonanticoagulant heparins are inhibitors of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 123, 1564–1573.
- Polli, M., Girelli, D., Campostrini, N., Maccarinelli, F., Finazzi, D., Lusciati, S., et al. (2011). Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 117, 997–1004.
- Polin, V., Coriat, R., Perkins, G., Dhooge, M., Abitbol, V., Leblanc, S., et al. (2013). Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis* 45, 803–809.
- Preza, G. C., Ruchala, P., Pinon, R., Ramos, E., Qiao, B., Peralta, M. A., et al. (2011). Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest* 121, 4880–4888.
- Prowle, J. R., Ostland, V., Calzavacca, P., Licari, E., Ligabo, E. V., Echeverri, J. E., et al. (2012). Greater increase in urinary hepcidin predicts protection from acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Nephrol Dial Transplant* 27, 595–602.
- Qian, Z. M., Chang, Y. Z., Leung, G., Du, J. R., Zhu, L., Wang, Q., et al. (2007). Expression of ferroportin1, hephaestin and ceruloplasmin in rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1772, 527–532.
- Querbes, W., Bogorad, R. L., Moslehi, J., Wong, J., Chan, A. Y., Bulgakova, E., et al. (2012). Treatment of erythropoietin deficiency in mice with systemically administered siRNA. *Blood* 120, 1916–1922.
- Rajsheker, S., Manka, D., Blomkalns, A. L., Chatterjee, T. K., Stoll, L. L., & Weintraub, N. L. (2010). Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr Opin Pharmacol* 10, 191–196.
- Ramm, G. A., & Ruddell, R. G. (2010). Iron homeostasis, hepatocellular injury, and fibrogenesis in hemochromatosis: the role of inflammation in a noninflammatory liver disease. *Semin Liver Dis* 30, 271–287.
- Ramos, E., Ruchala, P., Goodnough, J. B., Kautz, L., Preza, G. C., Nemeth, E., et al. (2012). Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood* 120, 3829–3836.
- Rehman, A. A., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2013). α -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol* 128, 1665–1675.
- Riganti, C., Campia, I., Kopecka, J., Gazzano, E., Doublier, S., Aldieri, E., et al. (2011). Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. *Curr Med Chem* 18, 872–885.
- Rochette, L., Cottin, Y., Zeller, M., & Vergely, C. (2013). Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol Ther* 137, 133–152.
- Rochette, L., Tatou, E., Maupoil, V., Zeller, M., Cottin, Y., Jazayeri, S., et al. (2011). Atrial and vascular oxidative stress in patients with heart failure. *Cell Physiol Biochem* 27, 497–502.
- Saeed, O., Otsuka, F., Polavarapu, R., Karmali, V., Weiss, D., Davis, T., et al. (2012). Pharmacological suppression of hepcidin increases macrophage cholesterol efflux and reduces foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 299–307.
- Sasu, B. J., Cooke, K. S., Arvedson, T. L., Plewa, C., Ellison, A. R., Sheng, J., et al. (2010). Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 115, 3616–3624.
- Schmidt, P. J., Toudjarska, I., Sendamarai, A. K., Racie, T., Milstein, S., Bettencourt, B. R., et al. (2013). An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe(–/–) mice and ameliorates anemia and iron overload in murine beta-thalassemia intermedia. *Blood* 121, 1200–1208.
- Schroeder, S. E., Reddy, M. B., & Schalinske, K. L. (2007). Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. *J Nutr* 137, 2686–2690.
- Schubert, T. E., Bosserhoff, A. K., Peyssonau, C., Echtenacher, B., Knutson, M., Hofstadter, F., et al. (2012). Hypoferrremia during the early inflammatory response is dependent on tumour necrosis factor activity in a murine model of protracted peritonitis. *Mol Med Rep* 6, 838–842.
- Schwarz, P., Kubler, J. A., Strnad, P., Muller, K., Barth, T. F., Gerloff, A., et al. (2012). Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 61, 193–201.
- Schwoebel, F., van Eijk, L. T., Zboralski, D., Sell, S., Buchner, K., Maasch, C., et al. (2013). The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. *Blood* 121, 2311–2315.
- Shin, D. Y., Chung, J., Joe, Y., Pae, H. O., Chang, K. C., Cho, G. J., et al. (2012). Pretreatment with CO-releasing molecules suppresses hepcidin expression during inflammation and endoplasmic reticulum stress through inhibition of the STAT3 and CREBH pathways. *Blood* 119, 2523–2532.
- Sicard, P., Acar, N., Gregoire, S., Lauzier, B., Bron, A. M., Creuzot-Garcher, C., et al. (2007). Influence of rosuvastatin on the NAD(P)H oxidase activity in the retina and electroretinographic response of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 151, 979–986.
- Sicard, P., Delemasure, S., Korandji, C., Grand, A. S. L., Lauzier, B., Guillard, J. C., et al. (2008). Anti-hypertensive effects of Rosuvastatin are associated with decreased inflammation and oxidative stress markers in hypertensive rats. *Free Radic Res* 42, 226–236.
- Silvestri, L., Pagani, A., & Camaschella, C. (2008). Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111, 924–931.
- Sow, F. B., Nandakumar, S., Velu, V., Kellar, K. L., Schlesinger, L. S., Amara, R. R., et al. (2011). Mycobacterium tuberculosis components stimulate production of the antimicrobial peptide hepcidin. *Tuberculosis (Edinb)* 91, 314–321.
- Straub, A. C., Lohman, A. W., Billaud, M., Johnstone, S. R., Dwyer, S. T., Lee, M. Y., et al. (2012). Endothelial cell expression of haemoglobin α regulates nitric oxide signalling. *Nature* 491, 473–477.
- Strnad, P., Schwarz, P., Rasenack, M. C., Kucukoglu, O., Habib, R. I., Heuberger, D., et al. (2011). Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. *PLoS One* 6, e16454.
- Sullivan, J. L. (2007). Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1014–1020.
- Sun, C. C., Vaja, V., Chen, S., Theurl, I., Stepanek, A., Brown, D. E., et al. (2013). A hepcidin lowering agent mobilizes iron for incorporation into red blood cells in an adenine-induced kidney disease model of anemia in rats. *Nephrol Dial Transplant* 28, 1733–1743.
- Tanno, T., Bhanu, N. V., Oneal, P. A., Goh, S. H., Staker, P., Lee, Y. T., et al. (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 13, 1096–1101.
- Tanno, T., Noel, P., & Miller, J. L. (2010). Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol* 17, 184–190.
- Tanno, T., Porayette, P., Sripichai, O., Noh, S. J., Byrnes, C., Bhupatiraju, A., et al. (2009). Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114, 181–186.
- Theurl, I., Schroll, A., Sonnweber, T., Nairz, M., Theurl, M., Willenbacher, W., et al. (2011). Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood* 118, 4977–4984.
- Theurl, I., Theurl, M., Seifert, M., Mair, S., Nairz, M., Rumpold, H., et al. (2008). Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* 111, 2392–2399.
- Trout, J. S., Butterfield, A. M., & Konrad, R. J. (2013). Hepcidin-25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates. *J Clin Lab Anal* 27, 504–510.
- Tsuji, Y. (2005). JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogene* 24, 7567–7578.
- Tuomainen, T. P., Punnonen, K., Nyyssonen, K., & Salonen, J. T. (1998). Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* 97, 1461–1466.
- van Rhee, F., Fayad, L., Voorhees, P., Furman, R., Lonial, S., Borghaei, H., et al. (2010). Siluximab, a novel anti-interleukin-6 monoclonal antibody, for Castleman's disease. *J Clin Oncol* 28, 3701–3708.
- Vecchi, C., Montosi, G., Zhang, K., Lamberti, I., Duncan, S. A., Kaufman, R. J., et al. (2009). ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 325, 877–880.
- Verga Falzacappa, M. V., & Muckenthaler, M. U. (2005). Hepcidin: iron-hormone and antimicrobial peptide. *Gene* 364, 37–44.
- Vujic, M. (2014). Molecular basis of HFE-hemochromatosis. *Front Pharmacol* 5, 42.
- Vuppalaanchi, R., Trout, J. S., Konrad, R. J., Ghabril, M., Saxena, R., Bell, L. N., et al. (2014). Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obesity (Silver Spring)* 22, 836–841.
- Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B., et al. (2014). Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother* 41, 213–221.
- Wang, H., Dong, J., Zuo, L., Liu, J., Zhu, W., Li, Y., et al. (2014). Anti-mouse CD52 monoclonal antibody ameliorates iron-deficient anaemia in IL-10 knockout mice. *Br J Nutr* 111, 987–995.
- Ward, D. G., Roberts, K., Brookes, M. J., Joy, H., Martin, A., Ismail, T., et al. (2008). Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 14, 1339–1345.
- Wood, M. J., Gadd, V. L., Powell, L. W., Ramm, G. A., & Clouston, A. D. (2014). Ductular reaction in hereditary hemochromatosis: the link between hepatocyte senescence and fibrosis progression. *Hepatology* 59, 848–857.
- Yin, S., Wang, Z., & Bernstein, E. R. (2013). Formaldehyde and methanol formation from reaction of carbon monoxide and hydrogen on neutral Fe₂S₂ clusters in the gas phase. *Phys Chem Chem Phys* 15, 4699–4706.
- Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., et al. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 4, 33–41.
- Yuan, X. M., & Li, W. (2003). The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* 35, 578–591.
- Zhang, L., Lu, D., Zhang, W., Quan, X., Dong, W., & Xu, Y. (2012). Cardioprotection by Hcp1 in cTnT(R141W) transgenic mice. *Transgenic Res* 21, 867–878.
- Zhen, A. W., Nguyen, N. H., Gibert, Y., Motola, S., Buckett, P., Wessling-Resnick, M., et al. (2013). The small molecule, genistein, increases hepcidin expression in human hepatocytes. *Hepatology* 58, 1315–1325.

Matériel et Méthodes

I. Population étudiée

Notre étude a été réalisée en utilisant une population recensée au sein de l'observatoire des Infarctus de Côte d'Or (RICO) dont les modalités de fonctionnement ont été précédemment publiées [239]. Cet observatoire collecte de manière prospective depuis le 1er janvier 2001 l'ensemble des données des patients hospitalisés à la suite d'un infarctus du myocarde et admis aux soins intensifs cardiologiques de 6 centres, privés et publics, du département de la Côte d'Or, couvrant un bassin de population de l'ordre de 500 000 habitants (Centres Hospitaliers de Châtillon-Sur-Seine, Beaune, Semur-en-Auxois, Montbard, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon et Clinique de Fontaine-lès-Dijon).

Les données des patients ont été recueillies sur chaque site hospitalier par un coordonnateur d'étude à l'aide d'un formulaire standardisé, puis centralisées sur une base sécurisée permettant l'extraction de données au format Excel. En outre, les listes de sortie des patients de chaque centre sont revues de façon systématique afin d'identifier les cas éligibles, avec l'utilisation de la Classification internationale des maladies (CIM-9) et les codes correspondants dans la CIM-10. Notre étude était en accord avec les termes de la déclaration d'Helsinki et a été approuvée par le comité d'éthique du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon. Le consentement éclairé de chaque patient était recueilli avant son inclusion dans l'étude.

Tous les patients sont âgés de plus de 18 ans et ont été admis pour un IDM de moins de 24 heures après l'apparition des premiers symptômes.

Les patients présentant une insuffisance rénale aigüe ou chronique ont été exclus, afin d'écartier un rôle confondant de l'anémie et de l'insuffisance rénale dans l'évaluation des paramètres du fer chez ces patients.

L'IDM a été défini par une cinétique d'élévation de la troponine I associée à des symptômes d'ischémie et /ou des signes électriques sur l'électrocardiogramme 12 dérivations, comme défini par le joint Committee of the European Society of Cardiology, American College of Cardiology, American Heart Association and World Heart Federation [240]. Un IDM avec sus-décalage du segment ST (STEMI) a été défini comme un sus-décalage persistant ≥ 1 mm du segment ST sur au moins 2 dérivations contiguës ou un bloc de branche gauche sur l'ECG.

L'étude qui concerne ce travail de thèse a inclus 166 patients inclus entre le 4 mai 2012 et le 23 janvier 2014. Parmi ces 166 patients, 111 ont dû être exclus car il n'y avait pas eu de tube prélevé et/ou centrifugé pour être stocké à -80 °C dans la sérothèque afin de réaliser le dosage de l'hepcidine. Sur les 55 patients restants, 13 ont été exclus car un ou plusieurs

marqueurs biologiques « traditionnels » du bilan martial n'avaient pas été réalisés et 8 ont été exclus en raison de prélèvements hémolysés. Au final, 34 patients ont bénéficié d'un dosage d'hepcidine et de myonectine/CTRP 15 et 3 ont été exclus en raison de facteurs confondants pour l'interprétation de ces nouveaux biomarqueurs : un choc septique initial, une maladie rénale terminale et un syndrome coronaire aigu de type 2 (décompensation cardiaque sur rétrécissement aortique serré). Ces données sont représentées sur la figure 12.

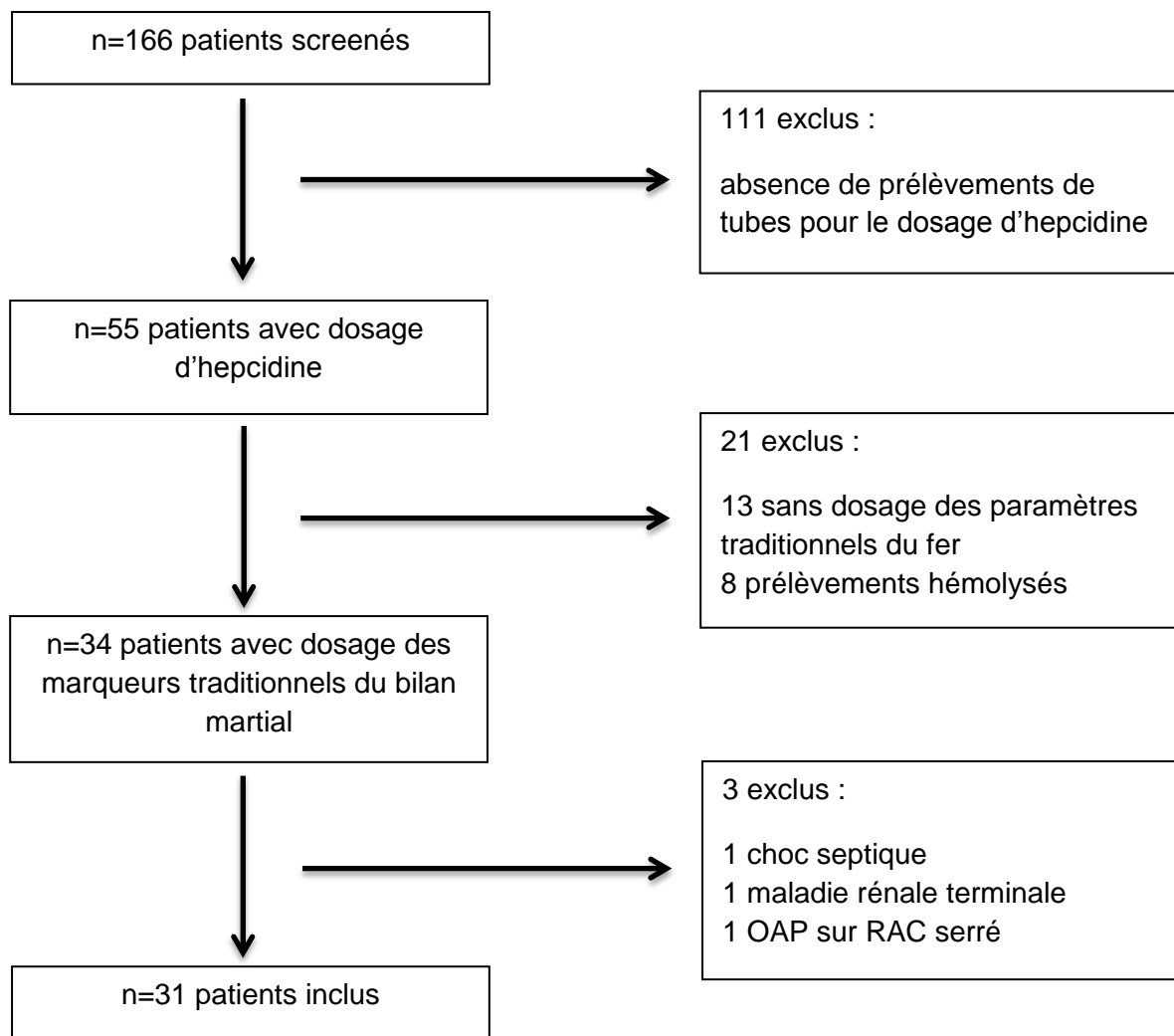


Figure 12 : Diagramme représentant les critères d'exclusion des patients.

1. Recueil de données démographiques et cliniques

Pour chaque patient issu de l'observatoire RICO, les données démographiques (âge, sexe), les facteurs de risque cardiovasculaire (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie, index de masse corporelle (IMC) [poids (kg)/taille (m²)] et statut tabagique), les paramètres hémodynamiques (fréquence cardiaque (FC), pressions artérielles systolique (PAS) et diastolique (PAD)), les antécédents d'IDM et les traitements chroniques avant l'IDM ont été recueillis. Etaient également collectés le délai entre l'apparition des symptômes et l'hospitalisation en unité de soins intensifs cardiologique (USIC), les caractéristiques cliniques de l'IDM ainsi que le niveau d'insuffisance cardiaque (classe Killip) à l'admission et au cours du séjour hospitalier.

Une échocardiographie Doppler trans-thoracique était réalisée en USIC au jour 2 ± 1 après l'admission du patient, par un investigateur local, suivant la méthode de Simpson. La fraction d'éjection ventriculaire gauche a alors été mesurée par la méthode de sommation des disques en Simpson biplan, utilisant les coupes apicales 2 et 4 cavités et reposant sur la mesure des volumes du ventricule gauche : volume télédiastolique (VTD) et télésystolique (VTS) par la sommation de disques successifs de l'apex jusqu'à la base du cœur. La FEVG est déterminée par le rapport : $(VTD - VTS) / VTD$.

Le score de risque GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events), score validé regroupant les huit items suivants : l'âge, la fréquence cardiaque, la pression artérielle systolique (PAS), la classe Killip, la survenue d'un arrêt cardiaque, le sous-décalage du segment ST sur l'ECG, le taux de créatinine sérique et des biomarqueurs de nécrose myocardique, a été calculé pour chaque patient (www.outcomes-org/grace/acs_risk.cfm) [241]. Il a été déterminé à l'admission hospitalière des patients et a été utilisé afin d'apprécier le risque de mortalité dans notre population.

2. Recueil de données biologiques

Des échantillons de sang veineux sont prélevés à l'admission du patient pour les analyses biologiques effectuées au sein du Laboratoire de Biochimie du CHU de Dijon.

Les concentrations plasmatiques en protéine C-réactive (CRP), troponine Ic, le bilan lipidique avec le cholestérol total (CT), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) et les triglycérides (TG) ont été mesurés par immuno-néphélométrie laser sur Dimension analyzer (Dade Behring, Newark, NE). La concentration plasmatique en low density cholesterol (LDL-C) a été calculée en utilisant la formule de Friedewald [242]. Le dosage du taux plasmatique

de NT-proBNP (N-terminal pro B-type natriuretic peptide) a été réalisé par une technique « sandwich » d'immuno-marquage en ELISA avec un automate Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Basel, Suisse). L'hémoglobine glyquée (HbA1c) a été mesurée par chromatographie liquide haute performance sur résine échangeuse d'ions (Biorad, Laboratories, Richmond, CA, USA). Les cinétiques des concentrations plasmatiques de troponine Ic et de CPK (créatine phosphokinase) ont été étudiées par prélèvements sanguins toutes les 8 heures durant le premier jour d'hospitalisation puis toutes les 24 heures (Dimension Vista Intelligent Lab System, Siemens). Le dosage de l'hémoglobine glyquée et du bilan lipidique ont été réalisés à jeun le lendemain de l'admission. La glycémie, évaluée par une méthode enzymatique basée sur la glucose oxydase, et la créatininémie ont été toutes deux mesurées sur Vitros 950 analyzer (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, USA). La clairance de la créatinine, exprimée en mL/min, qui est indice de filtration glomérulaire, a été calculée selon la formule de Cockcroft :

$$\text{Clairance de la créatinine} = k \times P \times (140 - \text{âge}/\text{créatinine})$$

Avec k : constante = 1,23 chez l'homme et 1,04 chez la femme

P : poids en kg

Age : en années

Créatinine : en μM

En addition des prélèvements nécessaires à la détermination de ces variables biologiques, des prélèvements sur tube Vacutainer SST II Advance (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ont été réalisés pour le dosage de la L-arginine et de ses dérivés méthylés, de l'hepcidine et de la myonectine. Pour l'obtention d'échantillons sériques servant au dosage de ces biomarqueurs, le prélèvement de sang veineux est centrifugé à 1200 x g à 4°C pendant 10 min, le sérum est conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

Les méthodes de dosage de la L-arginine, des dérivés méthylés, des marqueurs biologiques « traditionnels » du bilan martial ainsi que de l'hepcidine et de la myonectine sont détaillées ci-après.

II. Méthodes de dosage

1. Méthode de dosage des diméthyl-arginines

La chromatographie liquide haute performance (CLHP), qui peut être couplée à la fluorescence ou à la spectroscopie de masse, permet le dosage simultané de la L-arginine et ses dérivés méthylés sur un même échantillon.

1.1 Méthode de CLHP couplée à une détection fluorimétrique

Nous utilisons dans notre Laboratoire la méthode de CLHP, couplée à une détection fluorimétrique, propre au dosage de la L-arginine et de ses dérivés méthylés, qui a été développée en phase inverse et en mode gradient suite à l'adaptation des travaux d'Ivanova *et coll.* [243]. La CLHP en phase inverse se nomme ainsi car elle met en jeu une phase stationnaire, apolaire et hydrophobe composée de grains de silice greffée et une phase dite « normale », composée de grains de silice pure, polaire et hydrophile. Le mode gradient correspond à une variation de la phase mobile au cours de l'acquisition. Une première phase mobile (A) est nécessaire pour l'élution des composés d'intérêt. Puis, une seconde phase mobile (B), composée d'eau/acétonitrile (50/50, v/v), permet d'éluer rapidement les composés sortant après le dernier pic d'intérêt (SDMA) mais aussi d'éviter que certains composés ne soient retenus et relargués par la colonne lors de l'acquisition suivante. Après un retour à 100% de phase A, quelques minutes de stabilisation sont nécessaires avant l'acquisition suivante. En effet, au cours de la mise au point, il a été mis en évidence que l'injection d'un même échantillon répétée 10 fois donne lieu à la saturation de pics et à des modifications considérables de la ligne de base, liées à ce phénomène de relargage.

La L-arginine, l'ADMA et la SDMA sont des composés qui ne fluorescent pas naturellement. Une réaction dite de « dérivation » avec de l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) est ainsi nécessaire afin de les détecter (longueurs d'ondes d'excitation 340 nm et d'émission 455 nm). L'OPA doit être activée par un nucléophile, contenant un groupement thiol (SH). Dans le cadre de notre méthode, l'acide 3-mercaptopropionique a été utilisé. Le système OPA/R'SH ne réagit qu'en présence d'amines primaires (H₂N-R) pour donner un composé isoindole fluorescent [244]. Ainsi, les acides aminés sont à même de réagir avec le système OPA/R'SH et deviennent alors fluorescents et détectables.

Le dosage de la L-arginine et de ses dérivés méthylés a déjà fait l'objet de plusieurs publications au sein de notre Laboratoire [245–248].

1.2 Composition de la chaîne CHLP et chromatogramme d'un sérum

La chaîne CLHP est composée d'une pompe (SPECTRA SYSTEM 4000®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), d'un dégazeur, d'un injecteur automatique (Accela, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) et d'un fluorimètre hautement sensible (Finingan SURVEYOR®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) permettant des changements d'intensité au cours de l'analyse, donnant ainsi la possibilité d'acquérir des pics de

composés de concentrations différentes sur un même chromatogramme et sans risque de saturation du signal. En effet, ces changements d'intensité de fluorescence sont essentiels puisque la L-arginine présente une concentration sérique environ 100 fois supérieure à celle de l'ADMA.

La séparation des composés est réalisée à l'aide d'une colonne chromatographique en phase inverse (CHROMOLITH® RP-18E, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) optimisée par l'ajout d'une précolonne (4x4,5 μ m) (CHROMOLITH® RP-18E, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). L'analyse des chromatogrammes se fait à l'aide du logiciel ChromQuest 5.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). L'aire du pic, correspondant au composé dosé, est corrélée à celle du standard interne (L-MMA) permettant ainsi le calcul des concentrations des composés en normalisant par rapport à la solution de calibration.

Les concentrations endogènes de L-MMA sont de l'ordre de 0,1 μ M [249]. Une surcharge en L-MMA (5 μ M) dans chaque échantillon permet de niveler les différences de concentrations pouvant exister entre chaque patient. Les résultats sont exprimés en μ mol/L= μ M (Figure 13).

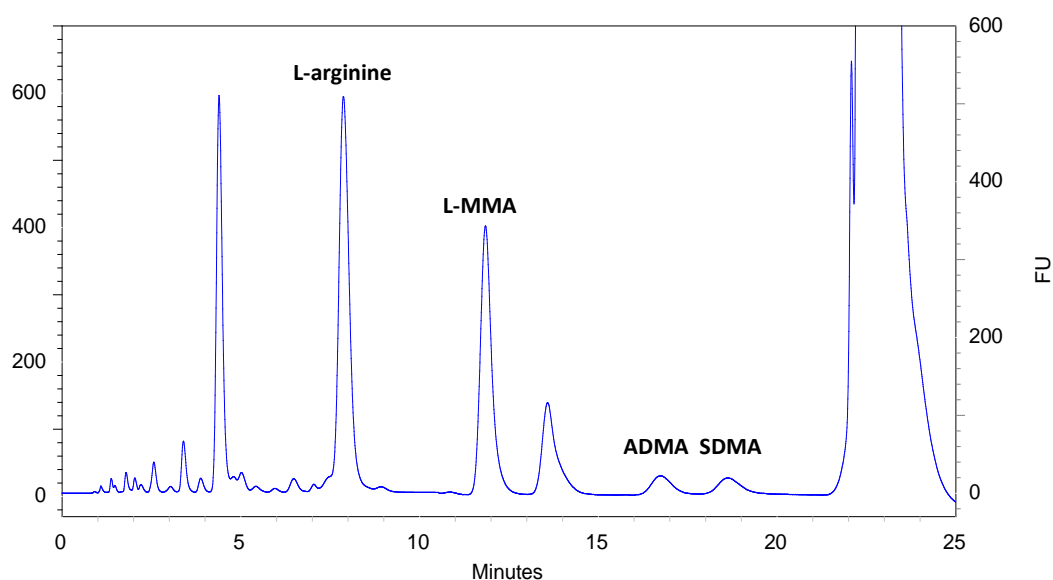


Figure 13 : Chromatogramme d'un sérum de patient issu du RICO. L-arginine (116,7 μ mol/L ; temps de rétention : 7,9 min), L-MMA (Standard interne ; 11,8 min), ADMA (0.556 μ mol/L ; 16,7 min), SDMA (0.494 μ mol/L ; 18.6 min).

1.3 Protocole de dosage

La préparation de l'échantillon consiste à additionner 0,2 mL de sérum à 0,2 mL de L-MMA (5 μ M) et 0,6 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4). Les analytes de ce mélange doivent être extraits au préalable avant d'être injectés sur la chaîne CLHP. L'extraction en phase solide se fait sur des cartouches échangeuses de cations composées de silice (Strata SCX, Phenomenex®, Torrance, CA, USA).

L'extraction comporte 4 étapes :

- Conditionnement des cartouches avec 1 mL de solution d'élution (ammoniaque concentrée/méthanol/H₂O/NaOH (1M) (50/40/10/0.5))
- Dépôt de l'échantillon
- Lavage des cartouches pour éliminer les composés inutiles avec 1 mL d'HCl (10 mM) et 1 mL de méthanol
- Elution des composés avec 1 mL de solution d'élution (ammoniaque concentrée/méthanol/H₂O/NaOH (1M) (50/40/10/0.5))

L'éluat est ensuite évaporé sous azote à 45°C et le résidu sec est reconstitué dans 100 μ L de KH₂PO₄, puis 100 μ L d'OPA est ajouté. Avant d'être injecté dans le système CLHP, il est nécessaire d'attendre 10 minutes afin que la réaction entre l'OPA et les groupements amines soit totale. Chaque échantillon est extrait et dosé en duplicate.

2. Méthode de dosage de l'HEPCIDINE

Les concentrations sériques d'hepcidine ont été dosées par technique ELISA, selon le principe de « l'EIA compétitif » à l'aide du kit EIA Heparin-25 (human) (Peninsula Laboratories, LLC, Bachem, San Carlos, United States). Le principe de l'ELISA par compétition est le suivant :

- Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps (en défaut).
- Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
- La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.

La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut. Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

Dans le kit utilisé pour le dosage de l'hepcidine, l'antisérum est capturé par des anticorps déposés dans les puits d'une microplaque (à 96 puits). Une concentration constante d'un traceur biotinylé et des concentrations variables d'un étalon ou d'un échantillon de peptide non marqué sont en compétition pour une liaison spécifique à l'antisérum. Le traceur biotinylé capturé est par la suite lié par la streptavidine conjuguée-HRP (streptavidine conjuguée à la peroxydase du raifort), qui donne un produit coloré après l'ajout d'un substrat (Figure 14).

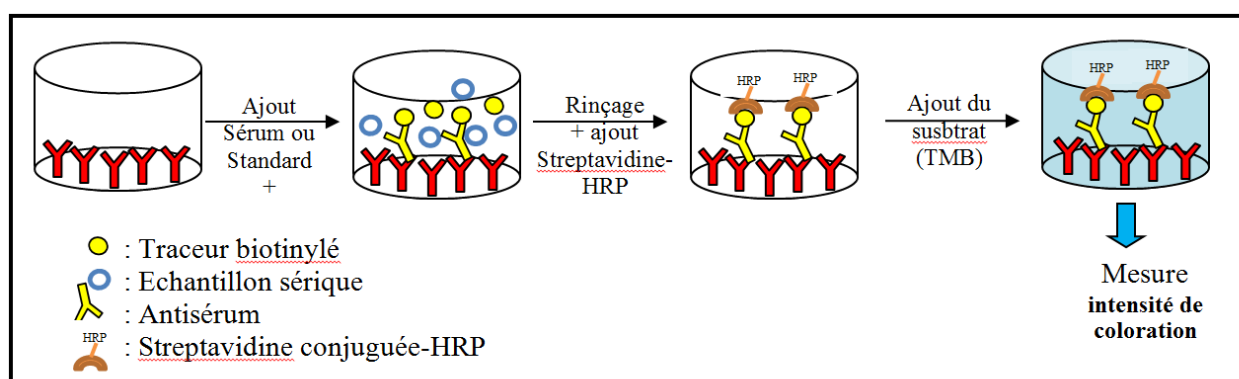


Figure 14 : Principe de l'« EIA compétitif » pour le dosage de l'hepcidine.

Ensuite, il faut mesurer l'absorbance de la plaque à 450 nm, dans les 10 minutes suivant la fin du protocole, à l'aide d'un spectrophotomètre (VICTOR ³V (Perkin Elmer)). Chaque échantillon est dosé en duplicate.

Pour calculer la concentration d'hepcidine, est réalisée la moyenne des deux mesures de densité optique de chaque échantillon à laquelle on soustrait la densité optique moyenne des Blancs. On trace ensuite la courbe de calibration DO/ concentration (en ng/mL) sur une échelle semi-log. Puis la concentration est déterminée graphiquement sur la courbe en multipliant la valeur par le facteur de dilution.

L'estimation de la concentration sérique d'hepcidine chez des volontaires sains est de 112 ng/mL chez l'homme et 65 ng/mL chez la femme [4].

Cette méthode de dosage est actuellement la plus utilisée dans les études princeps sur l'hepcidine [188].

3. Méthode de dosage de la MYONECTINE

Comme nous l'avons rappelé précédemment, l'érythroferrone, dont le rôle en tant que facteur régulateur érythroïde de l'hepcidine vient d'être découvert [5], présente une similitude de structure avec la myonectine ou CTRP15, décrite précédemment [121]. Nous avons ainsi déterminé des concentrations plasmatiques de myonectine/CTRP15 chez nos patients par technique ELISA. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit ELISA MYONECTIN/CTRP15/C1QTNF15 (HUMAN) d'Aviscera Bioscience (Aviscera Bioscience, Inc., Santa Clara, United States).

Le principe de la technique ELISA vient d'être rappelé dans le paragraphe ci-dessus expliquant les méthodes de dosage de l'hepcidine. Le principe est similaire pour la détermination des concentrations plasmatiques de myonectine, à la différence qu'il s'agit cette fois d'une technique d'ELISA en sandwich et non par compétition.

Cette technique de dosage est réalisée selon la méthode ELISA en sandwich quantitatif. La plaque est revêtue au préalable d'un anticorps spécifique pour le CTRP15 humain. L'anticorps de capture peut se lier au CTRP15 dans le standard et dans les échantillons. Après lavage de la plaque afin de retirer toutes les substances non liées, un anticorps biotinylé contre CTRP15 est ajouté dans les puits. Après un autre lavage de la plaque, est ajoutée de la Streptavidine conjuguée-HRP. Après un dernier lavage pour éliminer toute enzyme non liée, une solution de substrat (TMB) est ajoutée dans les puits. Il y a alors une réaction colorimétrique proportionnelle à la quantité de myonectine/CTRP15 dans les solutions standards ou dans les échantillons. Il faut ensuite mesurer l'absorbance de la plaque à 450 nm, dans les 15 minutes suivant la fin du protocole, à l'aide d'un spectrophotomètre (VICTOR ³V (Perkin Elmer)). Chaque échantillon est dosé en duplicate. Une courbe standard peut alors être établie grâce aux valeurs de la gamme et les valeurs de chaque échantillon peuvent être lues sur cette courbe.

Les concentrations plasmatiques de chaque patient sont exprimées en ng/mL.

4. Méthodes de dosage des paramètres « traditionnels » du fer

4.1 Fer sérique

Toutes les techniques courantes de dosage du fer sérique sont réalisées par colorimétrie. Il en existe deux sortes. La méthode manuelle consiste en une déprotéinisation en milieu acide suivie d'une centrifugation, ce qui permet d'éliminer des substances interférentes comme la bilirubine, l'hémoglobine, certains médicaments ou bien le cuivre. L'autre technique, également réalisée par colorimétrie, fait appel à un automate de mesure.

Le sang doit être prélevé sur tube sec avec éventuellement un gel séparateur. Un prélèvement hémolysé est rédhibitoire, compte tenu de la grande quantité de fer contenu dans l'hémoglobine, ce qui a été un paramètre limitant dans notre étude, puisque que les prélèvements hémolysés ont concernés 20 patients sur 149 analysables, représentant 13,5 % des patients.

Le dosage du fer sérique, ou sidérémie, est indispensable à la détermination du coefficient de saturation de la transferrine et de la capacité totale de fixation du fer.

Au CHU de Dijon, les analyses sont réalisées par technique photométrique utilisant le ferène, sur automates Dimension Vista (Siemens).

Les valeurs de référence sont les suivantes ($\mu\text{M} = 17,92 \times \text{mg/L}$) :

- Chez l'homme : 9,0 – 30,4 μM
- Chez la femme : 11,6 – 31,3 μM

4.2 Transferrine

La transferrine ou sidérophilline est une beta-globuline d'un poids moléculaire de 80 000 daltons environ. Sa synthèse est hépatique et elle transporte le fer plasmatique. Une molécule de transferrine présente deux sites de fixation et elle peut ainsi fixer 2 atomes de fer Fe^{3+} . Elle est normalement saturée au 1/3.

Les conditions de prélèvement sont les mêmes que celles du fer sérique.

Son dosage est immunochimique, par immuno-néphélémétrie ou immuno-turbidimétrie.

La méthode utilisée est celle d'immuno-néphélémétrie, sur automates Dimension Vista (Siemens).

Les valeurs de référence sont identiques chez l'homme et chez la femme : 2 - 3,6 g/L.

La quantité totale de transferrine dans l'organisme (et donc aussi la CTF) présente une corrélation inverse avec les réserves en fer. La synthèse de la transferrine augmente quand les réserves diminuent et cela se produit bien avant l'apparition d'une anémie.

Il existe ainsi des variations physiologiques et pathologiques de la transferrinémie.

Ainsi, il y a une hypertransferrinémie lors de la grossesse, surtout au dernier trimestre, de même que lors des premières années de vie. Une hypertransferrinémie peut aussi être associée à certaines pathologies comme la carence en fer, notamment lors de saignements chroniques, les troubles de l'absorption intestinale, l'hypogonadisme sévère chez l'homme par déficit en androgènes. Elle se rencontre aussi lors de la prise de certains médicaments comme lors de traitements oestrogéniques prolongés ou de diurétiques.

Une hypotransferrinémie est rencontrée dans des situations telles que les syndromes inflammatoires chroniques (infections chroniques, cancers), l'insuffisance hépato-cellulaire, la dénutrition, la carence en vitamine C, en contexte de fuites protéiques (glomérulaires, gastro-intestinales ou cutanées), de surcharge en fer, dans les hémochromatoses primitives et secondaires, dans les anémies hémolytiques chroniques comme la drépanocytose et dans les rares cas d'atransferrinémie congénitale. Elle est aussi présente lors la prise d'androgènes au long cours, d'ACTH ou de chloramphénicol.

4.3 Capacité Totale de Fixation du fer (CTF)

La CTF en fer de la transferrine, ou total iron binding capacity (TIBC) est calculée à partir du dosage de la transferrinémie par la formule :

$$CTF (\mu M) = \text{transferrine (g/L)} \times 25$$

Le coefficient 25 est obtenu à partir de la masse moléculaire de la transferrine ($2/80000 \times 106$), où le PM de la transferrine est de 80000 et 2 correspond au nombre de valences pour le fer.

Les valeurs de référence sont ainsi également identiques chez l'homme et chez la femme : 50 – 95 μM .

4.4 Coefficient de Saturation de la Transferrine ou Sidérophilline (CST)

Le CST correspond au rapport du fer plasmatique sur la CTF. Les précautions de prélèvement sont donc les mêmes que pour le dosage du fer sérique et les résultats seront également ininterprétables, faussement augmentés, s'il y a une hémolyse dans le tube.

Le CST est obtenu par la formule :

$$CST (\%) = (fer\ plasmatique\ (\mu M) \times 100) / CTF (\mu M)$$

Les valeurs de référence sont comprises entre 15 et 50 %.

Une augmentation du CST est un paramètre clé pour le diagnostic d'une surcharge en fer, en particulier pour l'hémochromatose héréditaire liée au gène HFE. Cette augmentation est également retrouvée en cas de cytolyse hépatique ou d'insuffisance hépatique sévère, dans l'exogénose chronique, des situations d'hémolyse ou de myolyse, certaines hémopathies malignes, l'insuffisance rénale terminale et la maladie de Gaucher.

A l'inverse, une diminution du CST est le témoin d'une érythropoïèse carencée en fer, soit par carence martiale vraie, soit dans un contexte de syndrome inflammatoire où le fer est séquestré dans les macrophages en raison de l'augmentation de l'hepcidine et de ce fait, non disponible pour la production érythroblastique. Le CST est également abaissé dans le syndrome métabolique, lors de la prise de contraceptifs oraux et lors du dernier trimestre de la grossesse ainsi que lors des premières années de vie.

4.5 Ferritine sérique

Le dosage de la ferritinémie est le paramètre de choix en matière d'évaluation des réserves en fer. Elle est retrouvée dans le sang en faible quantité, mais présente une bonne corrélation avec le fer stocké.

Comme nous l'avons rappelé précédemment, les 24 chaînes polypeptidiques qui constituent la ferritine peuvent être des chaînes H (acides) ou des chaînes L (basiques), selon l'origine tissulaire de la protéine. Les dosages immunochimiques, utilisant tous des anticorps anti-ferritine L, sont exacts quand, comme dans le sérum normal, les sous-unités de la ferritine sérique sont en majorité de type L. Ils le sont moins en cas de pathologies où la proportion de sous-unités H augmente. Le dosage est réalisé par immuno-enzymologie, chimiluminescence, immunonéphélométrie ou par immunoturbidimétrie. Malgré la

standardisation, des écarts sont encore observés entre les différents systèmes analytiques, c'est pourquoi il est recommandé d'utiliser la même technique pour le suivi d'un même patient.

Dans notre étude, le système utilisé est celui de l'immunodosage en chimiluminescence, sur automates Dimension Vista (Siemens).

Les valeurs usuelles de la ferritinémie sont :

- Chez l'homme : 26 – 388 µg/L
- Chez la femme : 8 – 252 µg/L

En général, une diminution de la ferritine est un signe majeur d'absence de réserve martiale et reflète une carence. Cependant, il faut se méfier d'une ferritinémie normale, qui peut s'observer dans certains cas de carence véritable associée à une cause d'hyperferritinémie, ou bien dans les rares formes de carence martiale héréditaire.

L'élévation de la ferritine sérique s'observe en cas de surcharge en fer, mais peut aussi être liée à d'autres situations pathologiques telles que le syndrome inflammatoire, les cytolyses (hémolyse, cytolysé hépatique ou musculaire, d'origine tumorale), l'exogénose chronique, l'hyperthyroïdie, le syndrome métabolique, la maladie de Gaucher ou bien les infections. Par ailleurs, la ferritinémie n'est pas toujours élevée dans l'hémochromatose ou certaines surcharges en fer, en raison de pathologies intercurrentes et interférentes ou en raison du mécanisme particulier de certaines de ces surcharges.

Résultats

ETUDE EXPERIMENTALE I

Diméthylarginines, glycémie et CRP chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde

Ce travail est inclus dans un manuscrit actuellement soumis à *Archives of Cardiovascular Diseases* :

Dimethylarginines, blood glucose, and C-reactive protein in patients with acute myocardial infarction.

Aurélié Gudjoncik, Marianne Zeller, Julie Lorin, Eve Rigal, Yves Cottin, Catherine Vergely, Luc Rochette

I. Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons rappelé dans les paragraphes d'introduction, les pathologies cardiovasculaires et certaines maladies métaboliques ont pour trait commun de leur pathogenèse une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote, $\bullet\text{NO}$. La L-arginine, via les $\bullet\text{NO}$ synthases (NOS), est le précurseur de la synthèse du $\bullet\text{NO}$. Les dérivés méthylés de la L-arginine, la diméthyl-arginine asymétrique (ADMA) et la diméthyl-arginine symétrique (SDMA) sont produits par la méthylation des protéines au niveau de leurs résidus arginine. Un taux élevé d'ADMA est associé à la dysfonction endothéliale et de nombreuses études ont montré que les maladies cardiovasculaires, dont la coronaropathie, et le diabète étaient caractérisés par des taux élevés d'ADMA. La SDMA n'a pas les mêmes fonctions biologiques que l'ADMA. La majeure partie de la SDMA est éliminée par excrétion rénale et il est maintenant bien établi que la SDMA est un marqueur de fonction rénale. Il a été démontré que chez les patients diabétiques, il existe une relation positive entre le contrôle glycémique à long terme et le taux d'ADMA, en association avec les complications micro et macrovasculaires [250]. Par ailleurs, il existe une relation négative entre le taux de SDMA et l'insulinorésistance [251]. Dans notre Laboratoire, un lien significatif entre ADMA et HDL-cholestérol a été démontré, qui serait dû à la modulation de l'activité des eNOS [244].

Plusieurs études ont montré que l'hyperglycémie est associée à des modifications des fonctions des LDLs et des HDLs ainsi qu'à l'inflammation ; cibler l'inflammation améliore ainsi la glycémie, l'insulinorésistance et le profil inflammatoire des patients à risque de développer des pathologies cardio-vasculaires et métaboliques.

Chez les sujets atteints de cardiopathie ischémique et en particulier lors de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (IDM), il n'existe que peu d'informations sur les relations entre le métabolisme des dérivés méthylés, la biodisponibilité du \bullet NO, la glycémie et les marqueurs d'inflammation. Nous nous sommes ainsi proposés d'étudier les relations susceptibles d'exister entre les taux circulants des dérivés de la L-arginine, ADMA et SDMA, la glycémie et un marqueur traditionnel de l'inflammation, la CRP, chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde.

II. Méthodes

Dans ce travail, 31 patients admis pour un IDM dont les premiers symptômes étaient inférieurs à 12 heures ont été inclus entre le 4 mai 2012 et le 23 janvier 2014. Les patients présentant des co-morbidités telles qu'un sepsis intercurrent ou une maladie rénale chronique ont été exclus de l'étude. Notre étude est conforme à la déclaration d'Helsinki et a été approuvée par le comité d'éthique du CHU de Dijon. De plus, un consentement éclairé a été signé par tous les patients.

Pour chaque patient, issu de l'observatoire RICO, des données démographiques, les facteurs de risque cardiovasculaire, les paramètres hémodynamiques, les antécédents d'IDM, les traitements chroniques avant l'IDM ont été recueillis en sus du délai entre l'apparition des symptômes, ainsi que les paramètres pendant l'hospitalisation en USIC avec les caractéristiques cliniques de l'IDM et la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG), mesurée en échocardiographie en Simpson biplan.

Dès l'admission des patients, des prélèvements de sang veineux sont effectués pour les différentes analyses biologiques effectuées au plateau technique de biologie du CHU de Dijon ainsi que pour la détermination des taux sériques de L-arginine et ses dérivés méthylés. Le dosage de ces derniers s'effectue par chromatographie en phase liquide à haute performance selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes de ce manuscrit.

Concernant l'analyse statistique, les données continues sont présentées sous la forme de moyenne \pm erreur standard. Un test de Kolmogorov-Smirnov a été réalisé pour tester la normalité de la distribution de la population.

Les données dichotomiques, présentées sous forme de pourcentage, ont été comparées par le test du Chi square ou de Fisher. De plus, pour tester les associations entre les concentrations des diméthyl-arginines, L-arginine et les variables biologiques, un test de Spearman a été appliqué.

Une analyse de type régression linéaire multiple descendante a été réalisée en utilisant le taux de SDMA comme variable dépendante. Les variables indépendantes intégrées au modèle représentent l'ensemble des données ayant une relation statistiquement significative ($p < 0,05$) avec la variable dépendante en analyse univariée (comprenant l'hypertension artérielle, l'antécédent de coronaropathie, l'âge, la clairance de la créatinine et la glycémie d'admission).

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS software package version 12.0.1 (SPSS Inc, USA).

III. Résultats obtenus

La moyenne d'âge des patients est de 65 ans, la plupart sont des hommes (61%), hypertendus (58%), dont un tiers sont fumeurs ou avec un antécédent de coronaropathie. La proportion de sujets diabétiques est de 23 %, dont 16 % reçoivent un traitement par insuline au long cours et 19 % des anti-diabétiques oraux.

Les taux circulants d'ADMA et de L-arginine étaient dans l'ensemble similaires quelque soit la présence ou non des facteurs de risque cardiovasculaire ou le traitement chronique, en dehors d'une corrélation positive entre le taux circulant d'ADMA et la glycémie ($r = 0,37$).

Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre la SDMA et l'ADMA ($r = 0,53$), l'âge ($r = 0,43$), le Nt-proBNP ($r = 0,39$), et encore plus forte avec la glycémie ($r = 0,57$). Cependant, la SDMA n'est pas corrélée avec le contrôle glycémique chronique, c'est-à-dire avec l'HbA1c ($p = 0,616$). La SDMA est corrélée négativement à la clairance de la créatinine ($r = -0,77$) et son taux augmente de plus de 50 % dans l'insuffisance rénale chronique (clairance de la créatinine < 60 ml/min) ($0,77(0,58-1,12)$ vs. $0,50(0,43-0,65)$ $\mu\text{mol/L}$, $p = 0,006$). A la phase aiguë de l'IDM, le taux de SDMA est plus élevé, de façon significative, chez les patients hypertendus, aux antécédents de coronaropathie, sous statines au long cours et cette tendance est retrouvée chez les patients diabétiques ($p = 0,191$). De plus, il

existe une tendance à une élévation du taux de SDMA en lien avec une altération de la FEVG ($r = -0,25$) et les patients avec FEVG abaissée en-dessous de 40 % montrent une tendance à avoir des taux de SDMA plus élevés, mais cette relation n'est pas significative ($0,86 \pm 0,24$ vs. $0,66 \pm 0,37$ $\mu\text{mol/L}$, $p=0,236$).

En analyse de type régression linéaire multiple, la glycémie d'admission est un prédicteur du taux de SDMA ($\beta = 0,373$, $p = 0,025$), au-delà des marqueurs traditionnels des diméthylarginines tels que l'insuffisance rénale.

Notre étude montre ainsi que chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde, les valeurs de SDMA, et dans une moindre mesure celles de l'ADMA, sont associées à la glycémie d'admission et pourraient donc exercer des actions biologiques indépendantes de la fonction rénale.

Dimethylarginines, blood glucose, and C-reactive protein in patients with acute myocardial infarction

Diméthylarginines, glycémie et CRP chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde

Aurélié Gudjoncik ^{ab}, Marianne Zeller ^a, Julie Lorin ^a, Eve Rigal ^a, Yves Cottin ^{ab}, Catherine Vergely ^a, Luc Rochette ^a

^a Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche 866, Faculté des Sciences de Santé, Université de Bourgogne, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France

^b Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire Bocage, Dijon, France

Short title: Dimethylarginines in acute MI

Titre court : Diméthylarginines au cours d'un IDM

Keywords: ADMA, SDMA, glucose, acute myocardial infarction

Mots-clés : ADMA, SDMA, glycémie, phase aiguë infarctus du myocarde

Abbreviations: ACE inhibitor: angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin II receptor blocker; ADMA: asymmetric dimethylarginine; BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; CK: creatine kinase; CRP: C-reactive protein; DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; EC: endothelial cell; HbA1c: glycated hemoglobin; HDL-C: high-density lipoprotein-cholesterol; HPLC: high-performance liquid chromatography; ICU: intensive care unit; LDL-C: low-density lipoprotein-cholesterol; LVEF: left ventricular ejection fraction; NO: nitric oxide; NOS: NO synthase; SBP: systolic blood pressure; SDMA: symmetric dimethylarginine; STEMI: ST segment elevation myocardial infarction; VKA: vitamin K antagonist.

Summary

Background

Asymmetric dimethylarginine (ADMA), and its symmetrical stereoisomer (SDMA)- as methylated products of L-arginine, decrease nitric oxide (NO) availability. Their elevated levels in diabetes increase the risk of acute myocardial infarction (MI), through endothelial dysfunction.

Aims

We investigated the relationship between circulating levels of ADMA, SDMA and functional relevant parameters in patients with acute MI.

Methods

Prospective study from 31 MI patients hospitalized <12 hours after symptom onset. Blood samples were taken on admission and serum levels of ADMA, SDMA and L-arginine were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results

Mean age was 65y, most were male, hypertensive, 1/3rd were current smokers, or had a history of CAD and 23% were diabetic. ADMA and L-arginine values were similar whatever the risk factor, except for ADMA that was positively correlated with blood glucose ($r = 0.37$) and CRP ($r = 0.58$). In contrast, SDMA was correlated with age ($r = 0.43$), and admission glucose ($r = 0.57$). SDMA was elevated in hypertension, prior CAD, statin therapy and showed a trend toward an increase in diabetic patients ($p = 0.191$). Moreover, there was a trend toward an elevation of SDMA with decreased LVEF ($r = -0.25$). In multivariate linear regression analysis, blood glucose was an estimate of SDMA ($\beta = 0.373$, $p=0.025$), beyond traditional markers of dimethylarginines including kidney failure.

Conclusion

Our study showed that in patients with acute MI, SDMA, and only weakly ADMA, are associated with admission blood glucose, beyond traditional dimethylarginine determinants and may therefore have biological activity beyond renal function.

Résumé

Contexte

La diméthylarginine asymétrique (ADMA), et son stéréoisomère symétrique (SDMA), produits méthylés formés à partir de la L-arginine, entraînent une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO). Chez les diabétiques, leurs taux élevés augmentent le risque de survenue d'infarctus du myocarde (IM), par dysfonctions endothéliales.

Objectif

Nous nous sommes proposés d'étudier la relation entre les taux circulants d'ADMA et SDMA et les paramètres fonctionnels chez des patients en phase aiguë d'IM.

Méthodes

Cette étude prospective a été réalisée sur 31 patients hospitalisés dans un délai de 12 heures suivant le début des symptômes. Des prélèvements sanguins sont réalisés lors de l'admission et les taux plasmatiques d'ADMA, SDMA et de L-arginine sont évalués par chromatographie en phase liquide à haute performance.

Résultats

La moyenne d'âge est de 65 ans, essentiellement des hommes, hypertendus, 1/3 étant fumeurs, avec un passé de coronarien et 23% étaient diabétiques. Les taux plasmatiques d'ADMA et de L-arginine sont similaires quels que soient les facteurs de risque ; exceptés pour les taux d'ADMA qui sont positivement corrélés à la glycémie ($r = 0.37$) et à la CRP ($r = 0.58$). En revanche, les teneurs en SDMA sont corrélées à l'âge ($r = 0.43$), et à la glycémie à l'admission ($r = 0.57$).

Les teneurs en SDMA sont élevées chez l'hypertendu, chez le coronarien, lors des traitements par statines et tendent à être augmentées chez les patients diabétiques ($p = 0.191$).

Par ailleurs, il apparaît une tendance à l'élévation de SDMA lors d'une altération de la fonction systolique ventriculaire gauche ($r = -0.25$). En analyse de régression linéaire multiple, le niveau de glucose plasmatique est un prédicteur de SDMA ($\beta = 0.373$, $p=0.025$), au-delà des marqueurs traditionnels des diméthylarginines comme l'insuffisance rénale.

Conclusions

Notre étude montre que chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde, le SDMA, et dans une moindre mesure l'ADMA, sont associés à la glycémie d'admission et pourraient donc exercer des actions biologiques indépendantes de la fonction rénale.

Introduction

L-Arginine (L-Arg) is the precursor for the synthesis of nitric oxide (NO), a key signaling molecule via NO synthase (NOS). Reduced NO bioavailability may play an essential role in cardiovascular pathologies and metabolic diseases. L-Arg deficiency syndromes in humans involve endothelial inflammation and immune dysfunctions [1]. The synthesis of NO is selectively inhibited by guanidino-substituted analogs of L-Arg or methylarginines such as asymmetric dimethylarginine (ADMA), which results from protein degradation in cells. Many disease states, including cardiovascular diseases and diabetes, are associated with increased plasma levels of ADMA. Methylated arginines: ADMA and symmetric (SDMA) dimethyl-L-arginine are produced by the methylation of protein arginine residues, in the reaction catalyzed by arginine methyltransferases (PRMT). Most ADMA, but not SDMA, is degraded to citrulline and dimethylamine by dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) which is widely distributed throughout the organs and tissues, particularly in the liver and kidney. DDAH presents two isoforms: I and II; this way regulates ADMA levels and hence NO synthesis [2].

Unlike ADMA, which is a primary factor in the control of NOS activity, SDMA has insignificant inhibitory effects on the enzyme but might inhibit NO-production through competition to arginine for transportation into the cell. SDMA is highly related to renal function [3], as urinary excretion is considered as the main route for elimination of SDMA, although it has been demonstrated in humans that the liver contributes in the elimination of SDMA [4].

Moreover, several lines of evidence have demonstrated that elevated ADMA levels are associated with endothelial cell (EC) dysfunction in healthy subjects and in patients with metabolic disease [5]. A positive relationship between long-term glycaemic control and plasma ADMA levels has been reported in patients with diabetes mellitus (DM), associated with micro- and macrovascular complications [6]. Moreover, a negative relationship has been reported

between SDMA and insulin resistance [7]. SDMA, which is not a competitive inhibitor of NO synthase, failed to show any independent relationship with LDL-cholesterol. The significant link between ADMA and HDL-C level may be due to the modulation of eNOS activity [8]. Several studies reported that hyperglycemia induces modifications in HDLs, and LDLs functions, and is associated with inflammation and demonstrated that targeting inflammation improves glycemia, insulin resistance, and inflammatory profiles in patients at risk for development of cardiovascular and metabolic pathologies. It is well known that the intact endothelium may actively contribute to atherosclerotic disease initiation and/or progression. The underlying mechanisms leading to dysfunctional EC are not clear. Moreover, EC are heterogeneous in their response to physiopathological stimuli [9].

In patients with coronary artery disease (CAD), including acute myocardial infarction (MI), there is little information on the relationship between L-Arg metabolism, NO bioavailability, glycemia and inflammation. Therefore, we aimed to examine the relation between plasma dimethylarginines, blood glucose, and a traditional marker of inflammation such as C-reactive protein (CRP) levels in patients hospitalized for acute MI.

Methods

Patients

The participants were recruited from the Observatoire des Infarctus de Côte d'Or (RICO) survey, a French regional survey of acute MI. Details on the survey have already been published [10]. In the present study, patients admitted to an intensive care unit between 4th May 2012 and 23rd January 2014 for acute MI within 12 h after symptom onset were included. MI was defined by an increase in serum troponin Ic [$>$ upper limit of the hospital normal (ULN) range] associated with symptoms of ischemia and/or typical ECG signs [11]. ST-segment elevation MI (STEMI) was defined as chest pain lasting for ≥ 20 min with typical ECG changes including ≥ 1 mV ST segment elevation in two or more limb leads or ≥ 2 mV in two or more contiguous precordial leads. We collected data on patients' age, sex, cardiovascular risk factors (history of hypertension or treated hypertension, known history of diabetes, treated hypercholesterolaemia, body mass index (kg/m^2), current smoking (within three months)) and chronic treatments. Hemodynamic parameters on admission (heart rate, systolic and diastolic blood pressures), and Killip class > 1 were also gathered. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was measured by echocardiography 2 ± 1 day after admission using the Simpson method.

Blood samples for the assessment of biomarkers levels were collected on admission in EDTA containing tubes and stored at -80°C until analysis.

The study was approved by the Consultative Committee of Protection of Persons in Biomedical Research of Burgundy and conducted in accordance with Declaration of Helsinki. All subjects gave their written consent to participate in the study.

Biological Data

Blood samples were drawn on admission (Median time from symptom onset to blood sampling: 16 (8-30) hours). C-reactive protein (CRP), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglyceride (TG) concentrations were measured on a Dimension analyzer (Dade Behring, Newark, NE). The level of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula [12]. Plasma glucose concentrations (enzymatic method (glucose oxidase)) and creatinine levels were measured on a Vitros 950 analyzer (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY) and creatinine clearance was calculated with the Cockcroft formula. Glycated hemoglobin A1c (HbA1c) was measured with ion exchange HPLC (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Dimethylarginines and L-arginine Analysis

Samples were allowed to clot at room temperature for 30 minutes and centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes at 4°C. The serum was kept frozen at -80°C until analysis. L-arginine, ADMA, and SDMA, were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) [13]. Before the analysis, serum was added with N-monomethyl L-arginine (NMMA) as the internal standard and phosphate-buffered saline (PBS). This mixture was extracted on solid-phase extraction (SPE) cartridges (Phenomenex Strata X-C, Torrance, CA, USA). The cartridges were first conditioned with elution buffer (10/0.5/40/50; NH₃ concentrated/1 M NaOH/bidistilled water/CH₃OH; v/v/v/v) followed by bidistilled water before being loaded with the diluted sample. The SPE cartridge was consecutively washed with HCl (100 mmol/L) and methanol (1:1; v:v). ADMA and SDMA were eluted with elution buffer. All conditioning, washing and elution steps were achieved by vacuum suction. The eluate was dried under nitrogen, derivatized with ortho-phthaldialdehyde (OPA) reagent (1:1; v:v) and injected into the HPLC system, with a fluorescent detector Finingan Surveyor (Thermo Fisher (lexc: 340 nm, lem: 455

nm) and ChromolithH RP-18E column (10064.6 mm) including a guard cartridge (1064.6 mm) supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Chromatographic separation, at room temperature, was performed isocratically at 100% mobile phase A, with 25 mmol/L phosphate buffer (pH 6.8) containing 6.5% CH₃CN, at a flow rate of 1.1 mL/min. After SDMA elution, mobile phase was switched to 100% mobile phase B, with ultrapure water: CH₃CN (50:50, v:v), and the flow rate was increased to 3.0 mL/min to elute strongly retained compounds. Assays were performed in duplicate. The detection limits were 0.05 and 1.19 mmol/L and interday variabilities were 5.7 and 4.6% for ADMA and L-arginine, respectively [14].

Statistical Analysis

Dichotomous variables are expressed as n (%) and continuous variables as mean \pm SD or median (interquartile range). A Kolmogorov-Smirnov test was performed to assess the normality of continuous variables. Mann-Whitney test or Student's t test was used to compare continuous data, and the Chi 2 test or Fisher's test was used for dichotomous data. The threshold for significance was set at 5%. For continuous variables, Pearson or Spearman rank correlation analyses were performed, as appropriate. Multiple linear regression analysis was performed with SDMA as a dependent variable. Variables entered into the models were those with a significant relationship ($p < 0.05$) with the dependent variable in univariate analysis (i.e. hypertension, family history of CAD, age, creatinine clearance, and admission blood glucose). The threshold for significance was set at 5%. SPSS version 12.0.1 (IBM Inc, USA) was used for all of the statistical tests.

Results

Mean age was 65y, most were male and hypertensive, almost 1/3rd were current smokers, or had a history of CAD (Table 1). Diabetes was diagnosed in 23%, whose 16% were under chronic insulin therapy and 19% under oral antidiabetic medications. Variations of dimethylarginines and L-arginine values according to the baseline characteristics and CV treatments are shown in Table 1. Regression analysis for dimethylarginines and biological variables are indicated in Figure 1. ADMA and L-arginine values were similar whatever the presence or not of a risk factor or treatment, except for ADMA that was positively correlated with blood glucose ($r = 0.37$) and CRP ($r = 0.58$).

In contrast, SDMA was positively correlated with ADMA ($r = 0.53$; Figure 1 A); age ($r = 0.43$, Figure 1 B), Nt-proBNP ($r = 0.39$), and even more strongly with glucose ($r = 0.57$; Figure 1 D). However, SDMA was not related to chronic glucose control (i.e. HbA1c) ($p = 0.616$). SDMA was negatively correlated with creatinine clearance ($r = -0.77$) and was $> 50\%$ increased with kidney failure (i.e. creatinine clearance < 60 ml/min) ($0.77(0.58-1.12)$ vs. $0.50(0.43-0.65)$ $\mu\text{mol/L}$, $p=0.006$). SDMA was significantly elevated in hypertension, prior CAD, and chronic statin therapy and showed a trend toward an increase in diabetic patients ($p = 0.191$). Moreover, there was a trend toward an elevation of SDMA with decreasing LVEF ($r = -0.25$; Figure 1E) and patients with severe LVEF alteration ($<40\%$) showed a trend toward higher SDMA values, but this relation was not significant (0.86 ± 0.24 vs. 0.66 ± 0.37 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.236$). In multivariate linear regression analysis, blood glucose level on admission was an estimate of SDMA level ($\beta = 0.373$, $p = 0.025$), beyond traditional marker of the dimethylarginine including kidney failure ($\beta = 0.475$, $p = 0.017$) and hypertension ($\beta = 0.379$, $p = 0.019$).

Discussion

The role of ADMA as an endogenous competitive inhibitor of eNOS is now well established, while in return SDMA is not a competitive inhibitor of eNOS. SDMA is a structural isomer of ADMA and inhibits cationic amino acid transporters which are essential for the transcellular membrane passage of L-arginine [2,15]. High plasma ADMA concentrations are associated with EC dysfunction in patients with CV risk factors or CAD, while this association is weak in healthy individuals [16]. Endothelial dysfunction is primarily characterized by impaired NO-induced vasodilation, and associated with traditional CV risk factors such as dyslipidemia, hypertension and metabolic syndrome. More precisely, in the vascular endothelium of CAD patients, high serum ADMA levels are associated with impaired vascular function reflected by increased vascular superoxide production and reduced NO bioavailability, due to accelerated eNOS uncoupling [17]. In MI patients, circulating ADMA has been independently associated with clinical outcomes probably through its deleterious impact on vascular homeostasis. In a large population we showed a strong inverse relationship between HDL and ADMA in myocardial infarction patients, suggesting a functional interaction between HDL and endothelium, beyond metabolic conditions associated with low HDL levels [8].

In our study, SDMA was positively related to ADMA but not with L-arginine. These results are in agreement with previous finding from our laboratory [18] and by an other group [19]. Elevated plasma concentrations of SDMA might also indirectly influence the activity of NOS by inhibiting the uptake of cellular L-arginine. Hence, during acute MI, the biochemical pathways that regulate the biological functions of dimethylarginines appear interdependent.

Our study, as other studies [20], showed that SDMA was negatively correlated with creatinine clearance. Circulating levels of ADMA and SDMA are positively associated with all-cause and cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. Chronic kidney diseases are associated with reduced bioavailability of NO, which is required to maintain normal vascular

and kidney function. Data from human studies have suggested that SDMA correlates well with parameters of renal function [3]. Plasma SDMA levels increase in parallel with creatinine and blood urea nitrogen after total nephrectomy [21]. Recently, the positive association between SDMA and increased risk is controversial [22] according to that elevated SDMA could therefore influence the NO-production also by inhibiting the transportation of arginine.

The main findings in this study are that ADMA was positively correlated with admission blood glucose. A variety of studies have demonstrated that elevated ADMA contributed to endothelial dysfunction, the common characteristic of diabetes [23,24]. It has been well documented that diabetes impairs endothelial cells and attenuates endothelial repair and angiogenesis, which are closely associated with the increased prevalence of cardiovascular diseases. The exact mechanisms underlying the disease are unknown; however, there is growing evidence that excess generation of reactive oxygen species (ROS), largely due to hyperglycemia, causes oxidative stress in a variety of tissues. One of the mechanisms relates to the fact that the reaction of NO with superoxide anion results in its inactivation and therefore induces a reduction in the biological availability of NO [25]. What are the mechanisms implicated in the positive correlation between ADMA and blood glucose? One of the mechanisms is the incidence of glucose on the activity of enzymes involved in ADMA metabolism. ADMA is metabolized to L-citrulline and dimethylamine by dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH). DDAH has two isoforms, DDAH1 and DDAH2. It has been reported that high glucose level decreased the activity and expression of DDAH2, one of the major isoforms of DDAH in endothelial cell, indicating that DDAH2/ADMA pathway play important role in endothelial cell senescence in diabetes [26].

Interestingly, we observed that ADMA was positively correlated with CRP in acute MI. CRP is an acute phase reactant in acute MI, and many studies have demonstrated the prognostic significance of markers of inflammation such as CRP, and oxidative stress [27]. There have

been extensive investigations about the role of CRP in CAD over the past few years and it has been reported that measurement of CRP levels might be a useful assessment in patients at intermediate risk for cardiovascular events. CRP directly inhibits NO production by EC via destabilizing eNOS. The eNOS activity and eNOS dimer/monomer ratio were significantly lower in aortic tissue homogenates from CRP-treated rats associated with significant reductions in guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 (GTPCH1) expression and tetrahydrobiopterin (BH4) levels. GTPCH 1 and BH4 are involved in endothelial nitric oxide production and, their depletion may lead to decreased availability of NO [2,28]. The positive correlation between ADMA and blood CRP; the underlying mechanisms of this correlation remain unclear. One emerging hypothesis, based on experimental findings, suggests an effect of inflammation process on enzymes activities associated with ADMA metabolism. Moreover, SDMA, which is not a competitive inhibitor of NO synthase, failed to show any relationship with CRP levels. ADMA has been implicated in inflammation response through activation of leukocyte adhesion and production of inflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF- α) in cultured endothelial cells or monocytes [29]. Accumulation of ADMA is a result of increased production and/or reduced degradation. It has been reported that mRNA and protein expression of DDAH2 not DDAH1 were markedly decreased in synoviocytes of collagen-induced arthritis rats. There is growing evidence that 1) the expression of DDAH2, the key enzyme for ADMA degradation, was markedly reduced in inflamed tissue 2) ADMA is not only a risk factor for endothelial dysfunction but also a novel proinflammatory mediator [30].

Limitations of the study

Our study is limited by its design. This work suffers from the usual limitations of observational, and therefore determines correlations rather than causal relationship. The number of patients

included was relatively small ($n = 31$). The small number of subjects also limits interpretation of correlation between functional parameters and biological values.

Funding

This work was supported by INSERM, the University Hospital of Dijon and Association de Cardiologie de Bourgogne, and by grants from the Conseil Régional de Bourgogne, Fédération Française de Cardiologie (FFC), Société Française de Cardiologie (SFC) and Agence Régionale de Santé de Bourgogne.

Acknowledgements

We wish to thank Maud Maza, Aline Chagnon and Florence Bichat for research assistance, Edith Fusier for editorial support and Philip Bastable for English assistance.

Conflict of interest: The authors have no potential conflicts of interest to disclose in connection with the submitted article.

References

- [1] Lorin J, Zeller M, Guillard J-C, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:101–16. doi:10.1002/mnfr.201300033.
- [2] Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther* 2013;140:239–57. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.07.004.
- [3] Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2006;21:2446–51. doi:10.1093/ndt/gfl292.
- [4] Siroen MPC, van der Sijp JRM, Teerlink T, van Schaik C, Nijveldt RJ, van Leeuwen PAM. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethylarginine. *Hepatol Baltim Md* 2005;41:559–65. doi:10.1002/hep.20579.
- [5] Juonala M, Viikari JSA, Alfthan G, et al. Brachial artery flow-mediated dilation and asymmetrical dimethylarginine in the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation* 2007;116:1367–73. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.690016.
- [6] Hanai K, Babazono T, Nyumura I, et al. Asymmetric dimethylarginine is closely associated with the development and progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2009;24:1884–8. doi:10.1093/ndt/gfn716.
- [7] Zsuga J, Török J, Magyar MT, et al. Dimethylarginines at the crossroad of insulin resistance and atherosclerosis. *Metabolism* 2007;56:394–9. doi:10.1016/j.metabol.2006.10.023.

- [8] Lorin J, Guillard J-C, Korandji C, et al. High levels of asymmetric dimethylarginine are strongly associated with low HDL in patients with acute myocardial infarction. *PloS One* 2013;8:e64796. doi:10.1371/journal.pone.0064796.
- [9] Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *BioMed Res Int* 2014;2014:801896. doi:10.1155/2014/801896.
- [10] Zeller M, Steg PG, Ravisy J, et al. Relation between body mass index, waist circumference, and death after acute myocardial infarction. *Circulation* 2008;118:482–90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753483.
- [11] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959–69.
- [12] Warnick GR. Laboratory measurement of lipid and lipoprotein risk factors. *Scand J Clin Lab Investig Suppl* 1990;198:9–19.
- [13] Ivanova M, Artusi C, Boffa GM, Zaninotto M, Plebani M. HPLC determination of plasma dimethylarginines: method validation and preliminary clinical application. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2010;411:1632–6. doi:10.1016/j.cca.2010.06.001.
- [14] Korandji C, Zeller M, Guillard J-C, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2007;40:66–72. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.08.004.
- [15] Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813–8. doi:10.1161/01.CIR.0000126823.07732.D5.

- [16] Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2039–44.
- [17] Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009;30:1142–50. doi:10.1093/eurheartj/ehp061.
- [18] Zeller M, Korandji C, Guillard J-C, et al. Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:954–60. doi:10.1161/ATVBAHA.108.162768.
- [19] Henrohn D, Sandqvist A, Egeröd H, et al. Changes in plasma levels of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine after a single dose of vardenafil in patients with pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* 2015. doi:10.1016/j.vph.2015.04.010.
- [20] Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4:23–8.
- [21] Carello KA, Whitesall SE, Lloyd MC, Billecke SS, Alecy LG D'. Asymmetrical dimethylarginine plasma clearance persists after acute total nephrectomy in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H209–16. doi:10.1152/ajpheart.00208.2005.
- [22] Hov GG, Aasarød KI, Sagen E, Åsberg A. Arginine, dimethylated arginine and homoarginine in relation to cardiovascular risk in patients with moderate chronic kidney disease. *Clin Biochem* 2015;48:646–51. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.03.012.
- [23] Anderssohn M, Schwedhelm E, Lüneburg N, Vasan RS, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular

- disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2010;7:105–18. doi:10.1177/1479164110366053.
- [24] Yuan Q, Hu C-P, Gong Z-C, et al. Accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes mellitus: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 and asymmetric dimethylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;458:869–76. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.050.
- [25] Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:2709–29. doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.017.
- [26] Thum T, Tsikas D, Stein S, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1693–701. doi:10.1016/j.jacc.2005.04.066.
- [27] Lorgis L, Zeller M, Dentan G, et al. The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2010;213:616–21. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.018.
- [28] Verhaar MC, Westerweel PE, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart Br Card Soc* 2004;90:494–5.
- [29] Chen M-F, Xie X-M, Yang T-L, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *J Vasc Res* 2007;44:391–402. doi:10.1159/000103284.
- [30] Chen X-M, Xia J, Zhou T, et al. Involvement of DDAH/ADMA pathway in the pathogenesis of rheumatoid arthritis in rats. *Int Immunopharmacol* 2013;16:322–31. doi:10.1016/j.intimp.2013.04.009.

Table 1: Dimethylarginines and L-arginine according to baseline characteristics.

			N(%)	ADMA, μmol/L	SDMA μmol/L	L-arginine μmol/L		
			or Mean±SD	or r	or r	or r		
				p	p		p	
All			31	0.52±0.11	0.69±0.35	93.30±44.81		
Risk factors								
Age, y			65±16	0.200	0.281	0.435	0.015	0.214
Female	yes	12(39%)	0.51±0.13	0.846	0.70±0.41	0.912	90.62±44.81	0.796
	no	19(61%)	0.52±0.10		0.68±0.33		94.99±45.96	
BMI, kg/m ²			27±5	0.071	0.706	0.003	0.989	0.193
Hypertension	yes	18(58%)	0.52±0.12		0.80±0.41		98.52±53.86	
	no	13(42%)	0.50±0.11	0.598	0.54±0.17	0.022	86.07±28.52	0.455
Diabetes	yes	7(23%)	0.53±0.16	0.651	0.84±0.48	0.191	71.72±23.31	0.151
	no	24(67%)	0.51±0.10		0.64±0.30		99.59±47.90	
Hypercholesterolemia	yes	14(45%)	0.49±0.13		0.82±0.47		96.14±62.99	
	no	17(55%)	0.53±0.09	0.344	0.58±0.17	0.092	90.96±23.01	0.774
Current smoking	yes	10(32%)	0.51±0.10	0.913	0.55±0.21	0.127	104.61±38.65	0.341
	no	21(68%)	0.52±0.12		0.76±0.39		87.9±47.39	
Family history of CAD	yes	14(45%)	0.49±0.08	0.349	0.66±0.24	0.638	84.25±23.91	0.316
	no	17(55%)	0.53±0.13		0.72±0.43		100.75±56.31	
CV history								
History of CAD	yes	10(32%)	0.53±0.14	0.631	0.95±0.50	0.036	77.03±26.86	0.167

	no	21(68%)	0.51±0.10		0.56±0.16		101.05±49.92	
Chronic Kidney Disease	yes	2(6%)	0.41±0.11	0.108	0.96±0.23	0.091	115.91±7.37	0.077
	no	29(94%)	0.52±0.11		0.67±0.36		91.74±45.94	
Admission data								
Anterior wall location	yes	10(32%)	0.49±0.11	0.463	0.66±0.21	0.767	98.77±60.6	0.647
	no	21(68%)	0.53±0.11		0.70±0.41		90.69±36.75	
STEMI	yes	12(39%)	0.49±0.11	0.321	0.54±0.17	0.029	109.42±65.79	0.203
	no	19(61%)	0.53±0.11		0.78±0.41		83.12±20.56	
HF on admission	yes	8(26%)	0.55±0.18	0.486	1.05±0.53	0.037	112.02±65.12	0.174
	no	23(74%)	0.50±0.08		0.56±0.14		86.79±34.90	
HR, b/min		79±15	-0.046	0.815	-0.139	0.480	0.001	0.996
SBP, mmHg		134±28	-0.060	0.752	-0.150	0.430	-0.158	0.406
DBP, mmHg		78±18	-0.158	0.404	-0.208	0.271	0.033	0.861
LVEF, %		50±13	0.050	0.788	-0.246	0.182	0.098	0.601
GRACE risk score		147±44	0.311	0.108	0.563	0.002	0.011	0.957
Biological data								
ADMA, µmol/L			-	-	0.535	0.002	-0.104	0.577
SDMA, µmol/L			0.535	0.002	-	-	-0.072	0.700
L-arginine, µmol/L			-0.104	0.577	-0.072	0.700	-	-
Creatinine Cl, mL/min		74±27	0.330	0.070	-0.773	<0.001	0.181	0.331
Total-cholest, mg/dL		1.87±0.41	-0.024	0.901	-0.440	0.015	0.170	0.370
LDL-cholest, mg/dL		1.18±0.41	-0.106	0.583	-0.548	0.002	0.232	0.226
HDL-cholest, mg/dL		0.43±0.12	0.039	0.840	0.148	0.435	-0.144	0.449
Triglycerides, mg/dL		1.04(0.77-1.47)	0.102	0.590	0.095	0.616	0.043	0.822
Glucose, mmol/L		7.9±3.4	0.372	0.040	0.575	0.001	-0.248	0.178

HbA1C, %		6.0(5.7-6.4)	-0.187	0.323	0.095	0.616	-0.077	0.685
CRP, mg/L		5.4(2.8-24.8)	-0.105	0.581	0.035	0.854	0.261	0.164
CRP >3	yes	18(58%)	0.52±0.13	0.391	0.73±0.44	0.260	101.63±52.62	0.197
	no	12(42%)	0.49±0.06		0.60±0.14		79.52±29.26	
NT-proBNP, pg/mL		1037(456-3062)	0.074	0.692	0.390	0.030	-0.191	0.304
Troponin Ic, µg/L		40(7-86)	-0.293	0.116	0.234	0.213	-0.038	0.840
CK, IU/L		1268±1311	-0.120	0.520	0.017	0.926	-0.091	0.625
Haemoglobin, g/dL		14.1±1.8	-0.070	0.708	-0.273	0.138	-0.336	0.064
Haematocrit, %		42±5	-0.040	0.841	-0.170	0.360	-0.347	0.056
Chronic treatments								
Diuretic	yes	9(29%)	0.52±0.16	0.795	0.96±0.53	0.063	97.41±65.79	0.750
	no	22(71%)	0.51±0.09		0.58±0.17		91.62±34.78	
ACE inhibitor	yes	6(19%)	0.57±0.16	0.222	1.07±0.55	0.090	111.44±75.58	0.277
	no	25(81%)	0.50±0.10		0.60±0.22		88.94±34.91	
Oral antidiabetics	yes	6(19%)	0.48±0.08	0.348	0.69±0.26	0.981	70.49±25.28	0.169
	no	25(81%)	0.52±0.12		0.69±0.38		98.77±47.07	
Insulin	yes	5(16%)	0.59±0.16	0.116	0.94±0.55	0.086	75.63±27.20	0.344
	no	26(84%)	0.50±0.10		0.64±0.30		96.70±47.09	
Statin	yes	9(29%)	0.50±0.16	0.731	0.98±0.51	0.046	95.74±66.44	0.850
	no	22(71%)	0.52±0.09		0.57±0.17		92.30±34.41	
Acute treatments								
Diuretic	yes	5(16%)	0.56±0.19	0.290	1.26±0.54	0.045	83.92±29.62	0.618
	no	26(84%)	0.51±0.09		0.58±0.16		95.10±47.42	
ACE inhibitor	yes	12(39%)	0.49±0.09	0.360	0.55±0.14	0.034	104.04±52.77	0.297

	no	19(61%)	0.53±0.12		0.78±0.42		86.51±38.99	
Oral antidiabetics	yes	2(6%)	0.41±0.10	0.127	0.62±0.25	0.936	84.25±37.40	0.936
	no	29(94%)	0.52±0.11		0.69±0.36		93.92±45.78	
Insulin	yes	8(26%)	0.56±0.17	0.372	0.87±0.45	0.097	76.34±25.22	0.220
	no	23(74%)	0.50±0.08		0.63±0.30		99.20±48.94	
Statin	yes	28(90%)	0.50±0.11	0.181	0.67±0.37	0.095	92.63±46.94	0.256
	no	3(10%)	0.62±0.13		0.83±0.18		99.53±17.59	

ADMA: Asymmetric dimethylarginine; CK: creatine kinase; CRP: C-reactive protein; HbA1c:

glycated hemoglobin; HDL-C: high-density lipoprotein; LDL-C: low-density lipoprotein; SDMA:

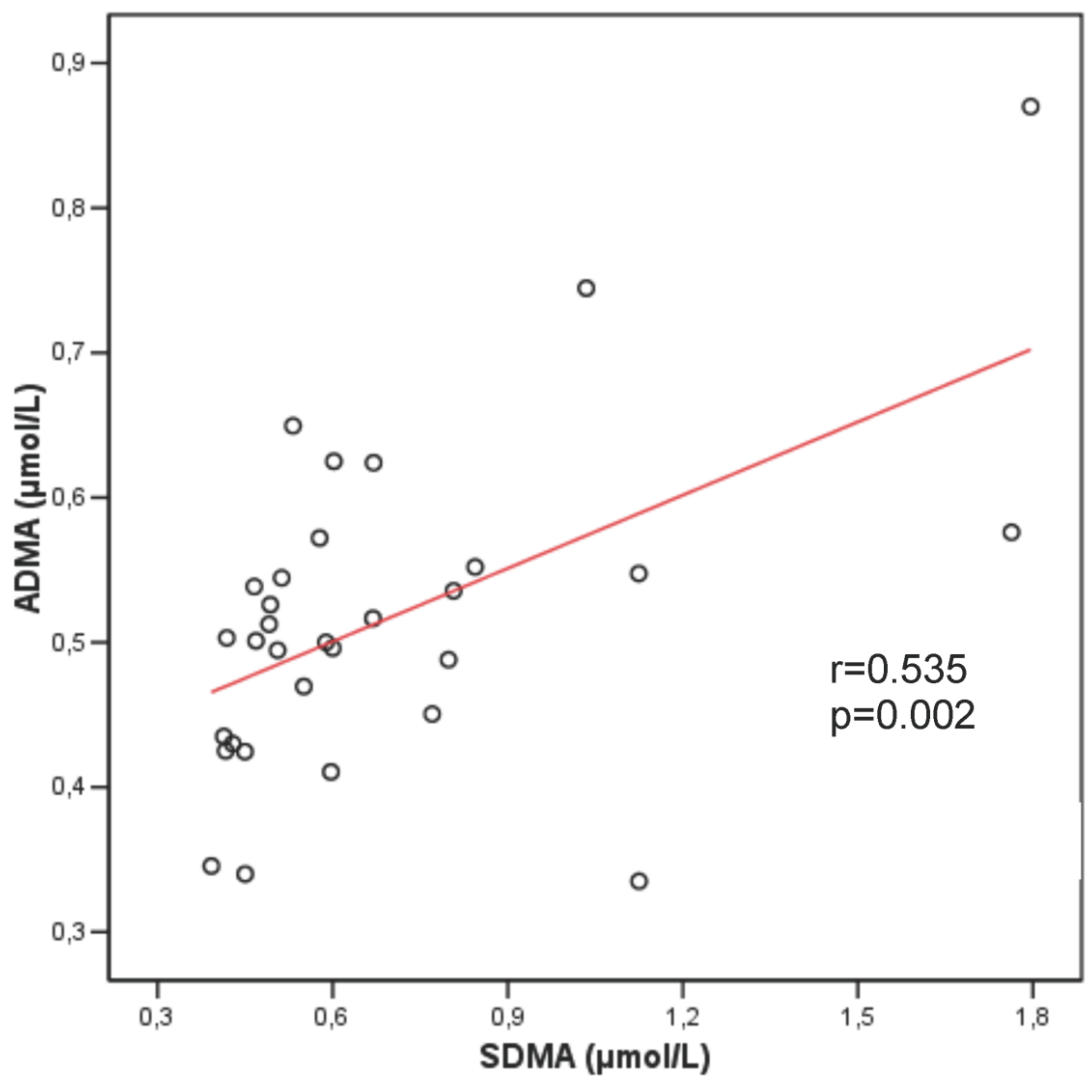
Symmetric dimethylarginine. ACE inhibitor: angiotensin converting enzyme inhibitor; CAD:

coronary artery disease; HF: heart failure; STEMI: ST segment elevation myocardial infarction;

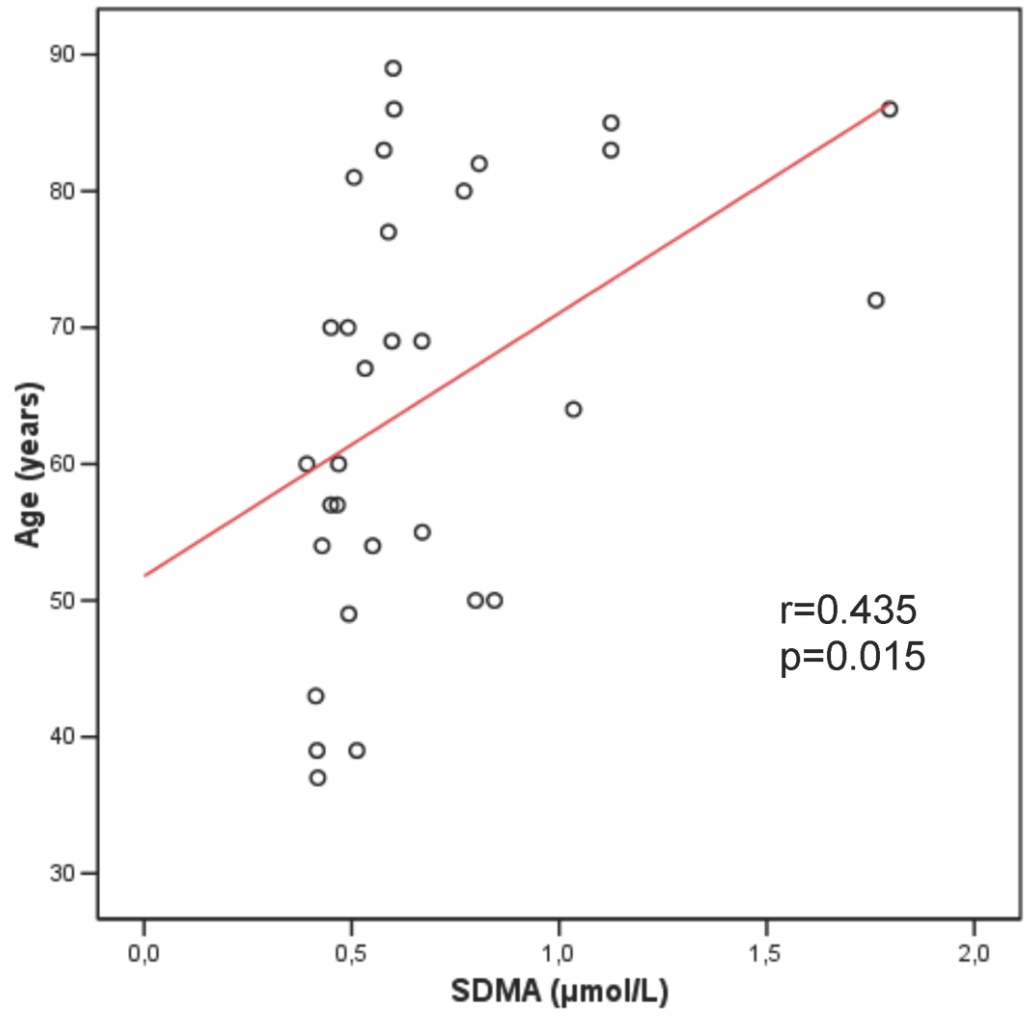
Figure 1: Regression analysis for dimethylarginines and biological variables. **A:** ADMA/SDMA;

B: Age/SDMA; **C:** glucose/ADMA; **D:** glucose/SDMA; **E:** LVEF/SDMA

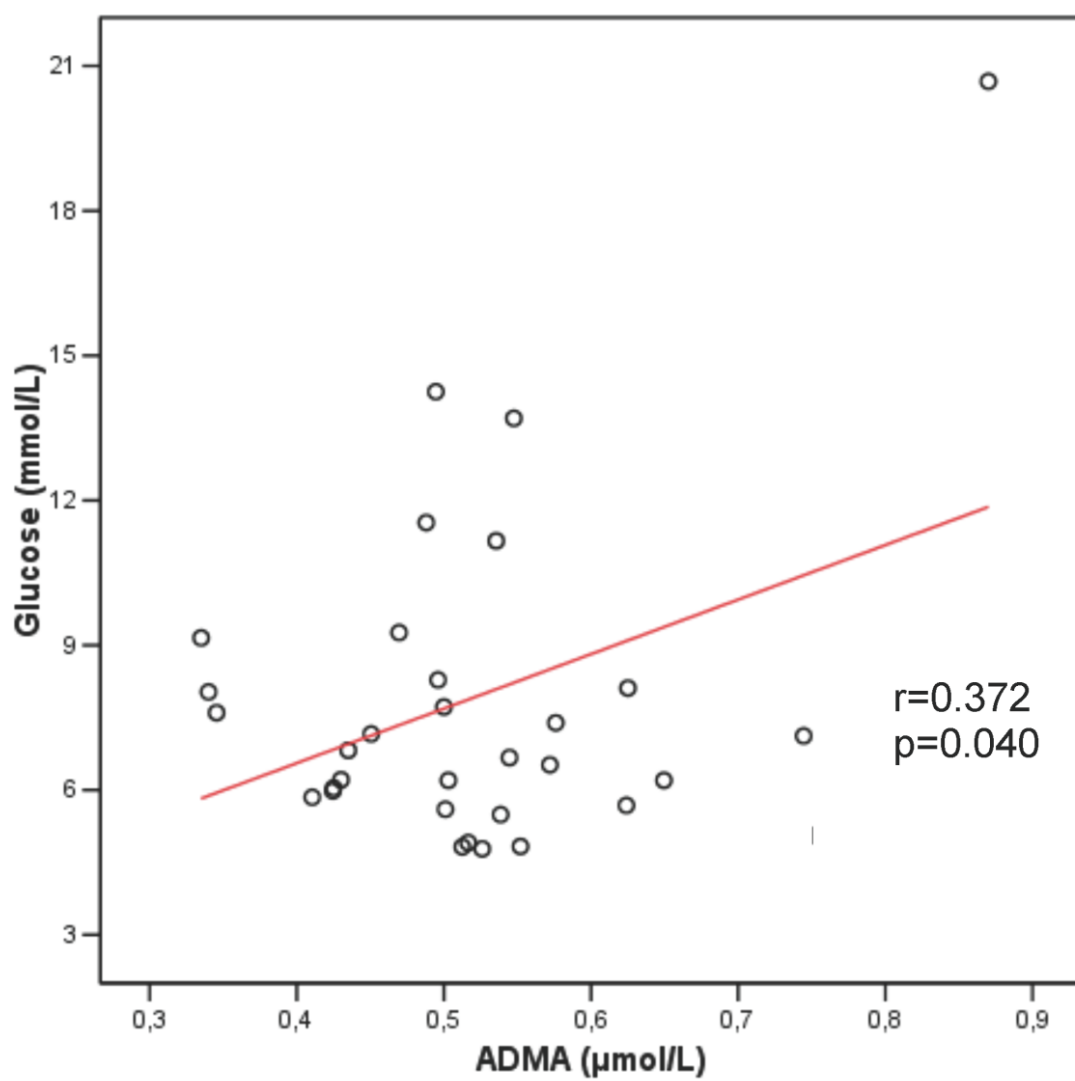
A



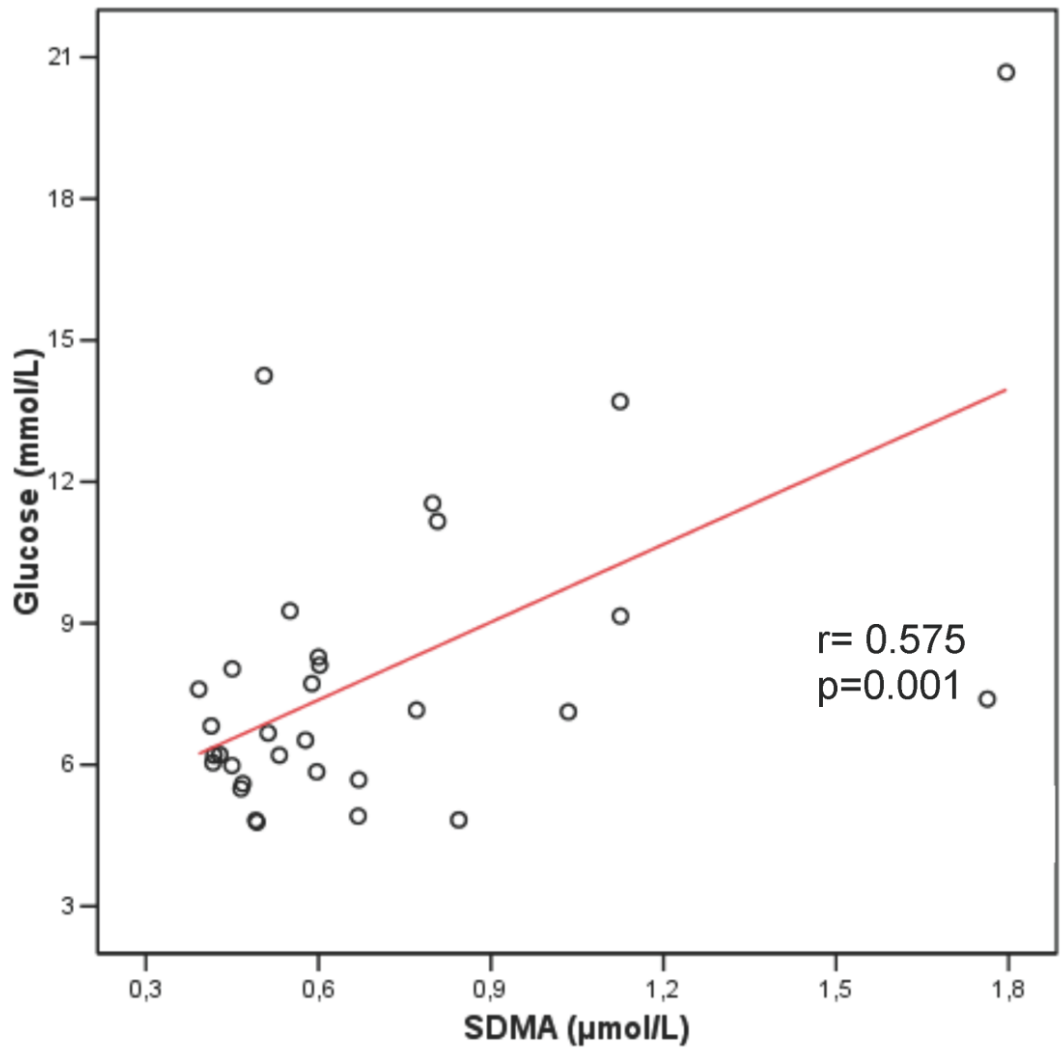
B



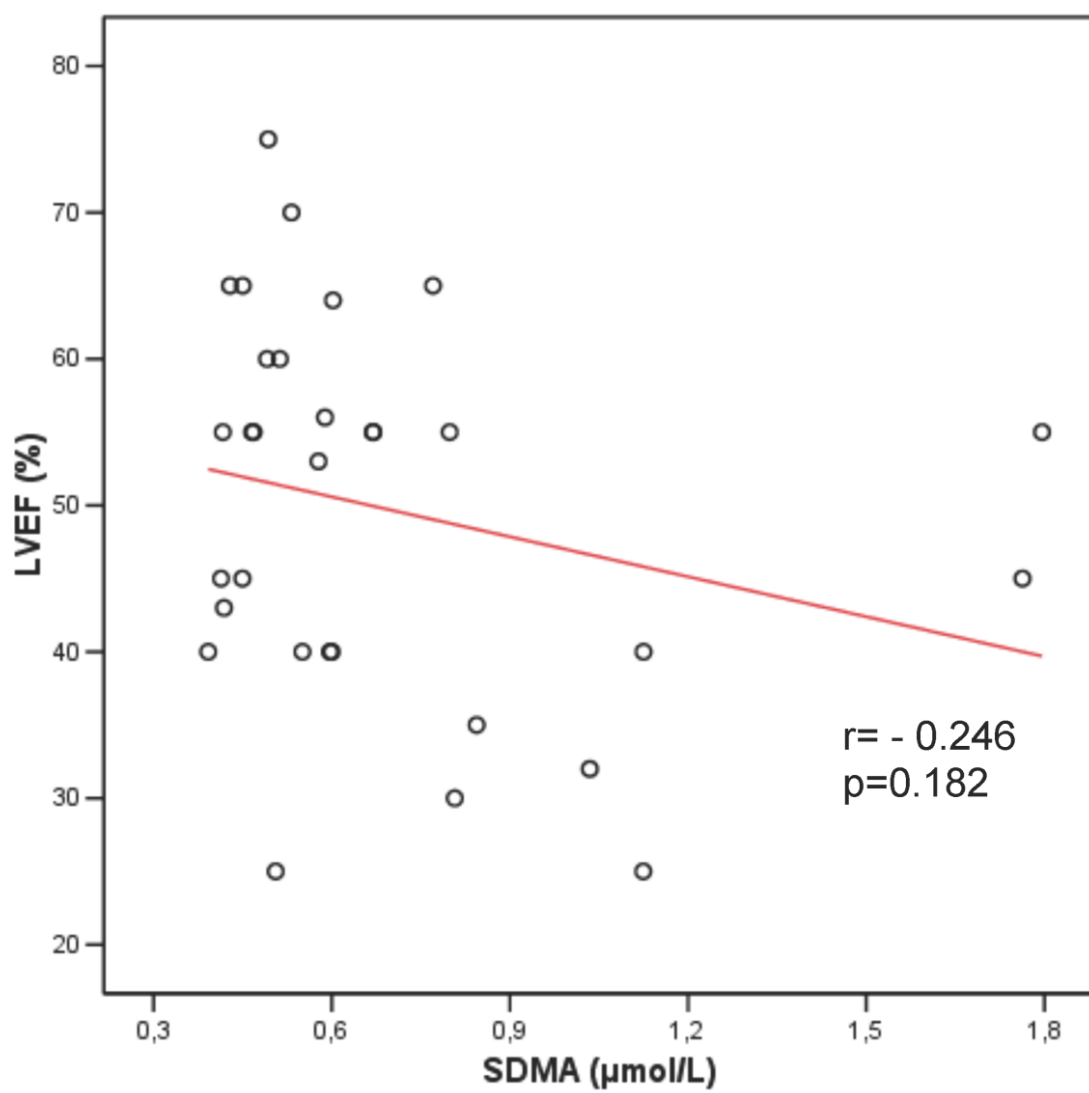
C



D



E



ETUDE EXPERIMENTALE II

Nouveaux biomarqueurs du métabolisme du fer, hepcidine et myonectine/CTRP 15, chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde

Ce travail est inclus dans un manuscrit actuellement en cours de soumission :

New biomarkers of iron status, hepcidin and myonectin/CTRP 15, in patients with acute myocardial infarction.

Aurélie Gudjoncik, Marianne Zeller, Julie Lorin, Eve Rigal, Yves Cottin, Catherine Vergely, Luc Rochette

I. Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons précisé dans les premiers paragraphes de notre manuscrit de thèse, les travaux de ces dernières années ont permis d'élucider une partie du rôle du fer, de son métabolisme et de sa régulation dans les pathologies cardiovasculaires et en particulier dans l'initiation et le développement de l'insuffisance cardiaque et de l'athérosclérose. Le fer est un métal essentiel pour la synthèse de l'hémoglobine dans les érythrocytes, les réactions d'oxydo-réduction et la prolifération cellulaire. Le maintien de concentrations stables en fer nécessite la régulation coordonnée de transport du fer dans le plasma, à partir de sources alimentaires dans le duodénum, à partir de globules rouges sénescents recyclés dans les macrophages et de stockage dans les hépatocytes. Dans ce domaine, l'hepcidine et la ferritine sont les principales protéines régulatrices. Malgré le grand nombre d'études publiées à ce jour, le rôle du fer dans les pathologies cardiovasculaires demeure encore source de débat, en raison d'une forte disparité dans les résultats. Jusqu'à présent, la relation de cause à effet et les mécanismes impliqués ne sont pas entièrement élucidés [252–256]. En effet, bien que le fer soit essentiel aux processus biologiques de par son rôle dans la respiration mitochondriale, le transport de l'oxygène ou l'activité de différentes

enzymes, il s'agit d'un élément paradoxal, car il est potentiellement dangereux. S'il est présent sous formes activées et en excès, il peut catalyser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), à l'origine de dommages cellulaires et tissulaires. Toutes ces réactions sont médiées par différentes voies de signalisation. La découverte, il y a quelques années, de l'hormone de régulation du fer, l'hepcidine, et très récemment du facteur régulateur érythroïde nommé érythroferrone (et découvert auparavant comme la myonectine / CTRP 15) ont ouvert de nouvelles voies de recherche dans ce domaine [4,5].

La mise en jeu des différents acteurs du métabolisme du fer, et récemment le rôle de l'hepcidine, ont été étudiés dans l'insuffisance cardiaque. Cependant, peu d'études ont été menées dans le cadre de la cardiopathie ischémique, notamment en phase aiguë. Nous nous sommes ainsi proposés d'étudier la relation entre les paramètres traditionnels du métabolisme du fer chez des patients admis pour un infarctus du myocarde, les indices cliniques et de nouveaux biomarqueurs impliqués dans la régulation du fer, l'hepcidine et l'érythroferrone (myonectine / CTRP 15).

II. Méthodes

Dans ce travail, 31 patients admis pour un IDM dont les premiers symptômes étaient inférieurs à 24 heures ont été inclus entre le 4 mai 2012 et le 23 janvier 2014. Les patients présentant des co-morbidités telles qu'un sepsis intercurrent ou une maladie rénale chronique ont été exclus de l'étude. Notre étude est conforme à la déclaration d'Helsinki et a été approuvée par le comité d'éthique du CHU de Dijon. De plus, un consentement éclairé a été signé par tous les patients.

Pour chaque patient, issu de l'observatoire RICO, des données démographiques, les facteurs de risque cardiovasculaire, les paramètres hémodynamiques, les antécédents d'IDM, les traitements chroniques avant l'IDM ont été recueillis, ainsi que les paramètres pendant l'hospitalisation en USIC avec les caractéristiques cliniques de l'IDM, la présence ou non d'insuffisance cardiaque à l'admission et la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG), mesurée en échocardiographie en Simpson biplan.

Dès l'admission des patients, des prélèvements de sang veineux sont effectués pour les différentes analyses biologiques effectuées au plateau technique de biologie du CHU de Dijon ainsi que pour la détermination des taux sériques d'hepcidine et de myonectine /CTRP 15. Le dosage de ces derniers s'effectue par technique ELISA selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes de ce manuscrit.

Concernant l'analyse statistique, les données continues sont présentées sous la forme de moyenne \pm erreur standard. Un test de Kolmogorov-Smirnov a été réalisé pour tester la normalité de la distribution de la population.

Les données dichotomiques, présentées sous forme de pourcentage, ont été comparées par le test du Chi square ou de Fisher. De plus, pour tester les associations entre les concentrations des différents paramètres impliqués dans le métabolisme du fer et de sa régulation et les autres variables biologiques, un test de Spearman a été appliqué quand au moins une des variables était non gaussienne ou un test de Pearson en cas de variables distribuées normalement.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS software package version 12.0.1 (SPSS Inc, USA).

III. Résultats obtenus

La moyenne d'âge des patients est de 65 ans, la plupart sont des hommes (61%), hypertendus (58%), dont un tiers sont fumeurs ou avec un antécédent de coronaropathie. Près de 40% des patients présentent un syndrome coronaire aigu de type STEMI, et $\frac{1}{4}$ souffraient d'insuffisance cardiaque. La FEVG moyenne était de 50%. La plupart avaient une CRP élevée (> 10 mg / L) et un niveau élevé de NT-proBNP (1037 pg / mL), avec une clairance de la créatinine moyenne de 74 mL / min.

A l'admission, l'hémoglobine était en moyenne à 14 g / dL, l'hématocrite était à 42% et 19% des patients souffraient d'anémie.

Nous avons retrouvé une tendance à une corrélation négative entre le taux de fer sérique et l'âge ($p = 0,057$). Le fer, la transferrine et la CTF sont diminués de façon significative chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque (IC) ($p = 0,049$, $p = 0,001$ et $p = 0,001$, respectivement). Le CST est également abaissé chez ces patients en IC, mais la différence n'est pas significative ($p = 0,110$). Il y a une corrélation négative entre la FEVG et le taux de ferritine ($p = 0,022$) et le pic de CPK totales. Cet indice de taille de l'infarctus augmente de manière significative avec le niveau de ferritine ($r = 0,535$, $p = 0,002$) ; cependant, le niveau de ferritine était similaire chez les patients avec et sans IC ($p = 0,670$). Dans cette lignée, il y a une corrélation négative entre les taux de NT-proBNP et de fer ainsi qu'entre NT-proBNP et CST ($p = 0,037$ et $p = 0,031$, respectivement). De plus, les patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont plus souvent une anémie ($p = 0,026$) et les patients

anémiques ont des taux plus élevés de CRP ($p = 0,049$). Les patients présentant une inflammation ($\text{CRP} > 10 \text{ mg / L}$), ont des taux plus faibles de CST, de CTF et de fer sérique.

Le taux médian d'hepcidine est de $91,8 \text{ ng / mL}$ ($50,1$ à $158,5 \text{ ng / mL}$). Il existe une corrélation entre l'hepcidine et l'hémoglobine ($p = 0,043$). Chez les patients présentant une inflammation ($\text{CRP} > 10 \text{ mg / L}$), il y a une tendance à l'augmentation du taux d'hepcidine ($p = 0,244$).

Le taux médian de myonectine / CTRP 15 est de $0,37 \text{ ng / mL}$, avec un large éventail de valeurs ($\text{IQR} = 0.15\text{-}4.90$, $\text{min} = 0,01$ et $\text{max} = 44,26$). Seulement chez 21 patients ont pu être déterminées les valeurs de myonectine/CTRP 15 ; les teneurs chez les autres patients étaient inférieures au seuil de détection. Il y a une tendance forte entre l'élévation des taux de myonectine et l'inflammation ($p = 0,05$). Il y a aussi une tendance vers une relation positive entre les taux de ferritine et de myonectine sériques ($p = 0,085$).

Notre étude montre ainsi que chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde, 1) les patients en insuffisance cardiaque ont un certain degré de carence martiale, avec une diminution des taux de fer et de transferrine sériques, ainsi que de la CTF, 2) que ces patients en insuffisance cardiaque ont souvent une anémie et 3) il y a une tendance à une élévation des taux d'hepcidine et de myonectine/CTRP 15 (\approx érythroferrone) chez les patients présentant une inflammation.

New biomarkers of iron status, hepcidin and myonectin/CTRP 15, in patients with acute myocardial infarction

Nouveaux biomarqueurs du métabolisme du fer, hepcidine et myonectine/CTRP 15, chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde

Aurélié Gudjoncik ^{ab}, Marianne Zeller ^a, Julie Lorin ^a, Eve Rigal ^a, Yves Cottin ^{ab}, Catherine Vergely ^a, Luc Rochette ^a

^a Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-métaboliques (LPPCM), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche 866, UFR Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France

^b Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France

Short title: New indices of iron status in acute MI

Titre court : Nouveaux biomarqueurs du métabolisme du fer en phase aiguë d'IDM

Keywords: iron, hepcidin, myonectin/CTRP 15, anemia, heart failure, acute myocardial infarction

Mots-clés : fer, hepcidine, myonectine/CTRP 15, anémie, infarctus du myocarde

Abbreviations: ACE inhibitor: angiotensin converting enzyme inhibitor; ACS: acute coronary syndrome; AMI: acute myocardial infarction; ARB: angiotensin II receptor blocker; BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; CK: creatine kinase; CKD: chronic kidney disease; CRP: C-reactive protein; CVD: cardiovascular diseases; DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; EC: endothelial cell; ECG: electrocardiogram ; ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay; ERF: erythroferrone; HbA1c: glycated hemoglobin; HDL-C: high-density lipoprotein-cholesterol; HF: heart failure; ICU: intensive care unit; ID: iron deficiency, LCMS: liquid chromatography mass spectrometry; LDL-C: low-density lipoprotein-cholesterol; LVEF: left ventricular ejection fraction; MI: myocardial infarction; PCI: percutaneous coronary intervention; SBP: systolic blood pressure; STEMI: ST segment elevation myocardial infarction; TIBC: total iron binding capacity; TSAT: transferrin saturation; VKA: vitamin K antagonist.

Summary

Background

In coronary artery diseases (CAD), iron within macrophages and foam cells predisposes to the formation of atherosclerotic plaques. Recent studies suggested that iron-regulating hormones such as hepcidin may promote plaque destabilization through prevention of iron export from the intralysosomal macrophages, thus potentially leading to acute myocardial infarction (AMI).

Aims

In patients with AMI, we investigated the relationship between novel markers of iron metabolism including hepcidin and erythroferrone (myonectin/CTRP 15) and clinical indices.

Methods

Prospective study from 31 AMI patients hospitalized <24 hours after symptom onset. Blood samples were taken on admission to determine serum levels of iron, ferritin, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation (TSAT), hepcidin and myonectin/CTRP 15.

Results

Mean age was 65y, most were male, hypertensive, 1/3rd were current smokers, had a history of CAD and 23% were diabetic. On admission, almost 40% had STEMI, and ¼ suffered from HF, with a mean LVEF at 50%. Mean haemoglobin (Hb) level was at 14 g/dL, and 19 % patients suffered from anemia. Iron, transferrin and TIBC were markedly decreased in patients with heart failure (HF) ($p=0.049$, $p=0.001$ and $p=0.001$, respectively). Moreover, patients with HF had more frequently anemia ($p=0.026$). Median hepcidin level was at 91.8 (50.1-158.5) ng/mL. There was a correlation between hepcidin and hemoglobin ($p=0.043$). Median myonectin/CTRP 15 level was at 0.37 ng/mL, with a large range of values (IQR=0.15-4.90, min= 0.01 and max= 44.26). Myonectin levels showed a trend toward an increase in patients with

inflammation ($p=0.05$). There was a trend toward a positive relation between ferritin and myonectin ($p=0.085$).

Conclusion

In AMI patients, heart failure is associated with decreased iron and transferrin blood levels and TIBC, reflecting a certain degree of iron deficiency and more frequent anemia. New biomarkers of iron regulation, hepcidin and erythroferrone (myonectin/CTRP15) showed a trend toward an increase in patients with inflammation, although there is a positive correlation between hepcidin and hemoglobin, indicating complex mechanisms.

Résumé

Contexte

Dans les coronaropathies, le fer contenu à l'intérieur des macrophages et des cellules spumeuses initie la formation de plaques d'athérosclérose. Des études récentes suggèrent que les hormones régulatrices du métabolisme du fer, telles que l'hepcidine, peuvent favoriser la déstabilisation de plaque en empêchant l'export de fer des macrophages conduisant ainsi potentiellement à un infarctus du myocarde.

Objectif

Nous nous sommes proposés d'étudier la relation entre les nouveaux biomarqueurs impliqués dans la régulation du métabolisme du fer, l'hepcidine et l'érythroferrone (myonectine/CTRP 15) et les indices cliniques chez des patients admis pour un infarctus du myocarde.

Méthodes

Cette étude prospective a été réalisée sur 31 patients hospitalisés pour un infarctus du myocarde dans un délai de 24 heures suivant le début des symptômes. Des prélèvements sanguins ont été réalisés lors de l'admission pour déterminer la capacité totale de fixation du fer (CTF), le coefficient de saturation de la transferrine (CST), ainsi que les taux plasmatiques de fer, de ferritine, d'hepcidine et de myonectine/CTRP 15.

Résultats

La moyenne d'âge est de 65 ans, essentiellement des hommes, hypertendus, 1/3 étant fumeurs, avec un passé de coronarien et 23% étaient diabétiques. A l'admission, près de 40% présentaient un STEMI, et ¼ de l'insuffisance cardiaque, avec une FEVG moyenne à 50%. En moyenne, le taux d'hémoglobine (Hb) était à 14 g/dL, et 19% des patients souffraient d'anémie. Le fer sérique, la transferrine et la CTF étaient diminués de façon importante chez les patients présentant de l'insuffisance cardiaque (HF) ($p = 0,049$, $p = 0,001$ et $p = 0,001$, respectivement). En outre, ces mêmes patients présentaient plus souvent une anémie ($p =$

0,026). Le taux d'hepcidine sérique médian était à 91,8 (50,1 à 158,5) ng/mL. Il y avait une corrélation entre l'hepcidine et l'hémoglobine ($p = 0,043$). Le taux médian de myonectine/CTRP 15 était de 0,37 ng/mL, avec un large éventail de valeurs (IQR = 0.15-4.90, min = 0,01 et max = 44,26). Les taux de myonectine avaient une tendance à l'augmentation chez les patients présentant une inflammation ($p = 0,05$). Il y avait également une tendance vers une relation positive entre la ferritine et myonectine ($p = 0,085$).

Conclusions

Notre étude montre que chez des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde, la présence d'insuffisance cardiaque à l'admission est associée à des concentrations faibles de fer sérique, de transferrine et à un CTF abaissé, reflétant un certain degré de carence en fer et d'anémie plus fréquente. Le dosage de nouveaux biomarqueurs de la régulation du métabolisme du fer, l'hepcidine et l'érythroferrone (myonectine/CTRP15), a montré une tendance à l'augmentation de ces taux sériques chez ces patients présentant une inflammation, bien qu'il y ait une corrélation positive entre l'hepcidine et l'hémoglobine, indiquant des mécanismes complexes.

Introduction

Disruptions in iron homeostasis are linked to a broad spectrum of chronic conditions including coronary artery disease (CAD), metabolic, and neurodegenerative diseases. Epidemiological studies have been a powerful tool to probe the association between iron and CAD [1,2]. Iron hypothesis has been a controversial subject for over 30 years as many studies support its role as a risk factor for CAD, while other studies found no evidence to support it. The conflicting results are accounted for by the non-homogeneity of trial design in terms of population inclusion criteria and different endpoints, non-uniform use of parameters for assessing iron role, and incomplete understanding of the mechanisms of action. Despite the large number of studies published to date, the role of iron in CAD still generates a fair amount of debate, due to a marked disparity in results. So far, the causal relation and underlying mechanisms are not fully elucidated [3–7].

Iron is an essential metal for hemoglobin synthesis in erythrocytes, oxidation-reduction reactions and cellular proliferation [8]. The maintenance of stable iron concentrations requires the coordinated regulation of iron transport into plasma from dietary sources in the duodenum, from recycled senescent red cells in macrophages and from storage in hepatocytes. The absorption of dietary iron, under heme or non-heme form, is carried out by mature villus enterocytes of the duodenum and proximal jejunum. Multiple physiological pathways are involved in regulation of iron homeostasis, including iron storage at the intracellular and extracellular level. Control of iron balance in the whole organism requires communication between sites of uptake, utilization, and storage. Key protein transporters and molecules that regulate their activities have been identified. In this field, ferritins and hepcidin are the major regulator proteins. A variety of transcription factors may be activated depending on the level of oxidative stress, leading to the expression of different genes [9].

The potentially damaging effect of iron on the heart, pancreas, liver and other organs was made evident in part through the study of hemochromatosis, a disorder in which excess iron is absorbed and deposited in tissues. The most common measurement used in the assessment of body iron has been serum ferritin. In the 1970s, serum ferritin has been shown to correlate with body iron stores and is still used clinically for this purpose [10]. However, serum ferritin can also be elevated by acute and chronic inflammation. Recent study in a large cohort of 12,033 young Korean men have shown that ferritin levels were independently associated with coronary artery calcium content, an early marker of CAD [11]. Multiple mechanisms likely underlie the association of iron with CAD. Iron within macrophages and foam cells predisposes

to the formation of atherosclerotic plaques. Hormones such as hepcidin may promote plaque destabilization by preventing iron export from the intralysosomal macrophages, ultimately leading to ischemic events. The nature of iron is dual, being of crucial importance for the human body, but also toxic as "free iron" induces oxidative stress. A plausible biological mechanism underlying this interaction may be the ability of iron to produce reactive oxygen species. Iron catalyzes the Fenton reaction which produces potent oxidants that increase the risk of atherosclerosis by promoting the peroxidation of lipids [12–14]. Local release of iron from ferritin by superoxide radical generated by ischemia/reperfusion injury to blood vessels may further exacerbate this damage.

Iron homeostasis is a finely tuned process, involving multiple interplay between intracellular, transmembrane and blood factors and whose abnormalities may lead to either iron deficiency or overload [15]. Because erythropoiesis depends on iron availability, erythroid activity and iron absorption need to be coordinated. This coordination occurs through the downregulation of hepcidin expression in hepatocytes, resulting in increased iron absorption [16]. Hepcidin was initially discovered as an antimicrobial peptide. Synthesized in the liver to regulate iron homeostasis, hepcidin suppresses iron uptake in the duodenum and blocks iron release from the macrophages by binding to ferroportin, a cellular iron exporter, thus inducing its internalization. Synthesis of hepcidin is activated by iron loading and decreased by anemia, hypoxia and erythropoiesis [6]. Hepcidin, as the major regulatory protein of iron metabolism, may play a causative role in heart failure (HF) [17,18]. The hepatic upregulation of hepcidin has been shown to be centrally involved in the pathogenesis of iron deficiency and anemia associated with chronic inflammatory diseases, including chronic kidney disease (CKD), infections, cancer and autoimmune diseases [19].

Given the central role of hepcidin in systemic iron homeostasis, putative erythroid regulators could facilitate iron delivery to the bone marrow by decreasing blood hepcidin levels. Recently was described the identification of a new erythroid regulator: erythroferrone (ERFE) essential for the early suppression of hepcidin levels after erythropoietic stimulation. Last year, erythroferrone, a 340-amino acid soluble protein, was identified as the long sought erythroid regulator of iron [20]. It is noteworthy that ERFE had earlier been described as "myonectin" or "C1q tumor necrosis factor α -related protein isoform 15" (CTRP15) [21].

The lack of a uniform and standardized means of assessing body iron status has limited the precision of epidemiological associations. Moreover, data on the role of iron in CAD, either in case of deficiency, or in case of overload, are scarce, and the plausible explanations for how

iron contributes to the pathogenesis of these chronic diseases are only beginning to be investigated. If recent studies focused on iron status in HF, to our knowledge, no data are available in AMI.

Also, in patients admitted for an AMI, we aim to: 1) investigate traditional parameters of iron status 2) assess new biomarkers implicated in the iron regulation, hepcidin and myonectin/CTRP 15 and 3) relate them with clinical indices.

Methods

Patients

The participants in this study were recruited from the Observatoire des Infarctus de Côte d'Or (RICO) survey, a French regional survey of AMI. Details on the survey have already been published [22]. In the present study, patients admitted to an intensive care unit between 4th May 2012 and 23rd January 2014 for AMI < 24 h after symptom onset were included. The diagnosis of acute MI included symptoms of ischaemia and at least one of the following: ECG changes in at least two contiguous leads consistent with AMI and serial increases in serum biochemical markers of cardiac necrosis (eg, positive troponin > upper limit of the hospital's reference range according to European Society of Cardiology and American College of Cardiology criteria [23]).

We collected data on patients' age, sex, and cardiovascular risk factors (history of hypertension or treated hypertension, known history of diabetes, treated hypercholesterolaemia, body mass index (kg/m²), current smoking (reported active smoking of cigarettes within three months before this admission)). Patients were diagnosed as having ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) when they had new or presumed new ST segment elevation greater than 1 mm in any derivation or new left bundle branch block on the index or subsequent ECG.

Hemodynamic parameters on admission (heart rate, systolic and diastolic blood pressures), and Killip class > 1 were also gathered. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was measured by echocardiography at 2 +/- 1 day after admission using the Simpson method.

All patients gave informed consent for their participation and, the ethics committee at our institution approved the protocol.

Biological Data:

Blood samples were drawn on admission (Median time from symptom onset to blood sampling: 16 (8-30) hours). C-reactive protein (CRP), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglyceride (TG) concentrations were measured on a Dimension analyzer Xpand (Dade Behring, Newark, NE). The level of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula [24]. We determined plasma NT-proBNP concentrations by electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys 2010, Roche Diagnostics). Plasma glucose concentrations (enzymatic method (glucose oxidase)) and creatinine levels were measured on a Vitros 950 analyzer (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY) and creatinine clearance was calculated with the Cockcroft formula. Glycated hemoglobin A1c (HbA1c) was measured with ion exchange HPLC (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). We assessed peak plasma troponin I_c by sampling every eight hours during the first two days after admission (Dimension Vista Intelligent Lab System, Siemens).

Serum iron, ferritin, total iron binding capacity (TIBC) and complete blood count were evaluated. Transferrin saturation (TSAT) (%) was calculated as serum iron concentration/serum TIBC concentration ×100.

Anemia was defined as hemoglobin < 12 g/dL in women and < 13 g/dL in men [25].

Blood samples for the assessment of new biomarkers levels were collected in EDTA containing tubes and stored at -80°C until analysis. Serum hepcidin-25 (ng/mL) was measured using a

commercially available enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (Peninsula Laboratories, Bachem). This ELISA method was validated with liquid chromatography mass spectrometry (LCMS), a gold standard for hepcidin assessment, confirming a strong correlation between the measurements performed using the LCMS and the Bachem assay in patients with chronic kidney disease (CKD) and healthy subjects [26].

Myonectin or C1q tumor necrosis factor α -related protein isoform 15 (CTRP 15) (ng/mL) was measured using a commercially available enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (Aviscera Bioscience) [21].

Statistical Analysis

Dichotomous variables are expressed as n (%) and continuous variables as mean \pm SD or median [Interquartile Range] [IQR], as appropriate. A Kolmogorov-Smirnov test was performed to assess the normality of continuous variables. Mann-Whitney test or Student's t test was used to compare continuous data, and Chi 2 test or Fisher's test was used for dichotomous data. Pearson (normally distributed variables) or Spearman (at least one non Gaussian variable) correlation analyses were performed. The threshold for significance was set at 5%. SPSS version 12.0.1 (IBM Inc, USA) was used for all of the statistical tests.

Results

Baseline characteristics

Relationship between patients characteristics, risk factors, clinical parameters, biological data, chronic treatments and iron parameters are shown in table 1 (n=31).

Mean age was 65y, most patients were male (61%) and hypertensive (58%). Almost 1/3 were current smokers, had a history of CAD and were under chronic treatment with diuretic or

statin. On admission, almost 40% had STEMI, and ¼ suffered from HF, with a mean LVEF at 50%. Most had elevated CRP (>10 mg/L) and a high level of Nt-proBNP (1037 pg/mL), with a mean creatinine clearance at 74 mL/min.

Iron status

Mean haemoglobin (Hb) level was at 14 g/dL, hematocrit was at 42% and 19 % patients suffered from anemia. As expected, there was a strong relation between iron and transferrin, TBIC TSAT, and between transferrin and TBIC. Also, Hb was correlated with iron, transferrin and TBIC.

Iron level showed a trend toward a negative correlation with age ($p=0.057$). Iron, transferrin and TIBC were significantly decreased in patients with HF ($p=0.049$, $p=0.001$ and $p=0.001$, respectively) (Table 1 and figure 1). TSAT was also reduced in HF, but the difference was not significant ($p=0.110$). There was a negative correlation between LVEF and ferritin levels ($p=0.022$). Interestingly, CK peak, as an index of infarct size, significantly increases with ferritin level ($r=0.535$, $p=0.002$); however, the level of ferritin was similar in patients with or without HF ($p=0.670$). Also consistent with the relation of iron parameters with HF, there was a negative correlation between Nt-proBNP and iron or TSAT levels ($p=0.037$ or $p=0.031$, respectively) (figure 2). Moreover, patients with HF had more frequently anemia ($p=0.026$) (figure 3). Anemic patients had higher CRP levels ($p=0.049$) (figure 4). In patients with inflammation (CRP>10 mg/L), there was a lower level of TSAT, TIBC, and iron (figure 5).

Median hepcidin level was at 91.8 (50.1-158.5) ng/mL. As expected given its regulation mechanism, there is a correlation between hepcidin and hemoglobin ($p = 0.043$). In patients with inflammation (CRP>10 mg/L), there was a trend toward an increase in hepcidin levels ($p=0.244$) (figure 6).

Median myonectin/CTRP 15 level was at 0.37 ng/mL, with a wide range of values (IQR=0.15-4.90, min= 0.01 and max= 44.26). Of note, only 21 patients had myonectin/CTRP 15 values available, the remaining data (n=10) were under the detection threshold. Myonectin levels showed a trend toward an increase in patients with inflammation ($p=0.05$) (figure 7). There was a trend toward a positive relation between ferritin and myonectin ($p=0.085$); however, the other iron parameters were not significantly related with the marker.

Discussion

Survival rates after AMI have significantly increased over the last decades due to improved medical treatment and reperfusion strategies. However, patients surviving MI often have a deteriorated cardiac function and are therefore at risk for the development of HF. It is now demonstrated that MI was associated with an inflammatory response that lead to left ventricular adverse remodeling. The prognosis of HF patients is poor and related to a decreased quality of life and considerable health care costs. Hence, targeting the early inflammatory response after MI provides an interesting target to attenuate left ventricular remodeling and prevent HF. Iron hypothesis has been a controversial subject for over 30 years as many studies support its role as a risk factor for cardiac dysfunction during and post-reperfusion strategies. Also, we set up our study with the main aim to investigate conventional and novel biomarkers implicated in the iron regulation in patients with an AMI.

In our study, we have shown that in the setting of AMI, 1) patients presenting with HF had a certain degree of iron deficiency, with decreased iron and transferrin blood levels and TIBC, 2) patients with HF had more frequently anemia, and 3) hepcidin and myonectin/CTRP15 showed a trend toward an increase in patients with inflammation.

In AMI, anemia is associated with long-term mortality [27,28]. Our results on the correlation between iron parameters, such as iron, TIBC and transferrin, and HF are consistent with such studies. Indeed, 19% of our patients suffered from anemia and we found a positive correlation between this hematological parameter and HF, a functional parameter. In patients with chronic HF, anemia is a frequent comorbidity. In a meta-analysis, the prevalence of anemia in patients with HF was found as high as 37.2 % [29]. Anemia's pathogenetic mechanisms have not been clearly demonstrated; however, in chronic HF, complex interactions between neurohormonal and inflammatory response activation, impaired heart and kidney function, and bone marrow response and activation are believed to lead to anemia. In our study, anemia is associated with an increased inflammation markers. Characteristics of inflammation-related anemia include reduced serum iron and transferrin concentrations, reduced transferrin saturation, increased concentrations of ferritin, normal concentrations of soluble transferrin receptor. In our study, we observe a correlation between hemoglobin and some of these parameters, such as iron ($p=0.016$), transferrin ($p=0.004$), TIBC ($p=0.004$) and hepcidin ($p=0.043$) but the correlation wasn't significant with TSAT and ferritin, maybe because of the small number of patients. In AMI patients, it has been reported a significant decrease in hemoglobin concentration with a parallel increase in the inflammatory proteins [30]. In anemic AMI patients, it was observed a pattern suggestive of inflammation-related anemia including higher ferritin, lower transferrin, lower TSAT and lower serum iron concentrations. The authors conclude that in patients with AMI, anemia at presentation to the catheterization laboratory is associated to both the elapsed time from symptom onset and to the intensity of the inflammatory response [30]. In our study, blood sample were taken before angiography, so as to exclude the effect of blood loss induced by the procedure. The most important regulators of iron absorption and utilization are currently known as hepcidin and erythroferrone (ERFE). We have explored these two hormones: new indices of

iron metabolism and regulation, in order to study their variation in the setting of AMI and their relation with other traditional parameters of iron status.

The central role of hepcidin in iron metabolism has been supported by dysregulation of hepcidin expression in humans and mice that results in iron overload or iron deficiency. Inflammation caused by infection, autoimmune disease, or cancers stimulates the synthesis of proinflammatory cytokines, such as interferon- gamma, interleukin-1, and interleukin-6 (IL-6), leading to a stimulation of hepcidin expression by the liver as well as white blood cells [31,32]. Histological analysis have shown that hepcidin was also found in the myocardium [33].

As hepcidin is commonly and predominantly acknowledged as the key regulator of iron metabolism [34], an analysis of the pattern of its changes may help to understand the underlying mechanisms leading to iron deficiency characterizing HF. Hepcidin, upon binding to the only known cellular iron export protein, ferroportin, results in a ferroportin degradation and blockage of cellular iron export [35,36]. Duodenal iron absorption is thus decreased and retention of iron in the reticuloendothelial system occurs, reducing both circulating iron concentrations and iron availability to target tissues. The hepatic production of hepcidin is controlled in feedback loops through three groups of molecules originating, respectively, from iron-sensing systems (increased circulating iron concentrations induce hepcidin expression and release into the circulation, whereas systemic iron deficiency causes the opposite effects), inefficient erythropoiesis (anemia and/or hypoxia can inhibit hepatic production of hepcidin), and inflammatory processes.

In our study, we reported a significant correlation between hepcidin and hemoglobin levels. Moreover, in patients with inflammation, there was a trend toward an increase in circulating hepcidin. It is important to remember that in our study, almost 40% had STEMI, and 25% suffered from HF. Changes in hepcidin levels in acute or chronic HF are controversial, probably due to the wide range of different parameters involved in its regulation. Jankowska et al.

showed that increased level of circulating hepcidin characterizes an early stage of HF, but, in their study, not accompanied by anemia or inflammation [37]. Moreover, they found that low hepcidin independently related to unfavorable outcome because the progression of HF was associated with the decline in circulating hepcidin and the development of iron deficiency. Matsumoto et al. found that anemic patients with HF had reduced serum hepcidin [6], whereas Divakaran et al. didn't show any difference in serum or urine hepcidin in HF patients, with and without anemia [5].

Due to its role in iron regulation, hepcidin has advantageous biological properties. On the one hand, the limitation of intestine iron absorption and iron sequestration decreases the labile iron pool which reduces side effects of iron excess such as generation of free radicals; on the other hand, the inhibition of innate immune response may prevent the development of inflammatory reactions. These mechanisms, oxidative stress and inflammation, are crucial in the progression of CAD. As a consequence, the upregulation of hepcidin might be considered as an adaptative response.

Last year, ERFE, a 340-amino acid soluble protein, was identified as the long sought erythroid regulator of iron [20]. ERFE had earlier been described as "myonectin" or "C1q tumor necrosis factor α -related protein isoform 15" (CTRP15) [21]. It appears to play two different regulatory roles, i.e. a myokine and an erythroid regulator of iron, which is the stronger function. The higher amounts of ERFE produced by an expanding, reactive erythropoiesis would inhibit the hepatic production of hepcidin leading to increased iron absorption and increased iron release from deposits, therefore increasing the efficiency of hemoglobin production [38].

ERFE is also likely to contribute to the pathogenesis of hereditary hemochromatosis, one of the most frequent monogenic diseases. Types I, II and III of hereditary hemochromatosis, related to mutations in genes coding for HFE, hemojuvelin, hepcidin or transferrin receptor-2, are

considered “hepcidin diseases”, in which low levels of hepcidin allow increased iron absorption.

In the present study we have shown that median myonectin level was at 0.37 ng/mL, with a wide range of values, and tended to increase in patients with inflammation ($p=0.05$).

In patients with AMI, the inflammatory response is an integral component of the reaction to tissue injury and persists for several weeks [9]. It has been shown that inflammation and acute phase response interact with the hematopoietic system at several levels resulting in reduced erythropoiesis, accelerated destruction of erythrocytes and erythropoietin resistance. Recent studies suggest that ERFE contributes to recovery from anemia of inflammation [39]. ERFE is a strong candidate for a pathological hepcidin suppressor in inherited anemias with ineffective erythropoiesis, in which hepcidin levels are inversely correlated with EPO concentrations and erythropoietic activity [40,41].

Recent works provide evidence for a role of transferrin receptor 2 in the regulation of erythropoiesis [42–44]. Indeed, Wallace et al. reported that mice lacking matriptase-2 and transferrin receptor 2 were characterized by severe anemia [45], characterized by increased ERFE expression when compared to their wild type during stress erythropoiesis. Also, transferrin receptor 2 plays a regulatory role in erythropoiesis, down-regulating ERFE and thereby erythropoiesis. It may be involved in the iron sensing that results in the regulation of red blood cell formation. The measure of this novel biomarker might be useful to better understand the pathway of iron metabolism in AMI.

Conclusion

In AMI patients, heart failure is associated with decreased iron and transferrin blood levels and TIBC, reflecting a certain degree of iron deficiency and more frequent anemia. New biomarkers

of iron regulation, hepcidin and erythroferrone (myonectin/CTRP15) showed a trend toward an increase in patients with inflammation, although there is a positive correlation between hepcidin and hemoglobin, indicating complex underlying mechanisms.

Limitations of the study

Our study is limited by its design. This work suffers from the usual limitations of observational, and therefore determines correlations rather than causal relationship. The number of patients included was relatively small ($n = 31$). The small number of subjects also limits interpretation of correlation between functional parameters and biological values.

Funding

This work was supported by INSERM, the University Hospital of Dijon and Association de Cardiologie de Bourgogne, and by grants from the Conseil Régional de Bourgogne, Fédération Française de Cardiologie (FFC), Société Française de Cardiologie (SFC) and Agence Régionale de Santé de Bourgogne.

Acknowledgements

We wish to thank Maud Maza, Aline Chagnon and Florence Bichat for research assistance, Edith Fusier for editorial support and Philip Bastable for English assistance.

Conflict of interest: The authors have no potential conflicts of interest to disclose in connection with the submitted article.

References

- [1] Basuli D, Stevens RG, Torti FM, Torti SV. Epidemiological associations between iron and cardiovascular disease and diabetes. *Front Pharmacol* 2014;5:117. doi:10.3389/fphar.2014.00117.
- [2] Tuomainen TP, Punnonen K, Nyyssönen K, Salonen JT. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* 1998;97:1461–6.
- [3] Maeder MT, Khammy O, dos Remedios C, Kaye DM. Myocardial and systemic iron depletion in heart failure implications for anemia accompanying heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:474–80. doi:10.1016/j.jacc.2011.01.059.
- [4] van der Putten K, Jie KE, van den Broek D, Kraaijenhagen RJ, Laarakkers C, Swinkels DW, et al. Hepcidin-25 is a marker of the response rather than resistance to exogenous erythropoietin in chronic kidney disease/chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2010;12:943–50. doi:10.1093/eurjhf/hfq099.
- [5] Divakaran V, Mehta S, Yao D, Hassan S, Simpson S, Wiegerinck E, et al. Hepcidin in anemia of chronic heart failure. *Am J Hematol* 2011;86:107–9. doi:10.1002/ajh.21902.
- [6] Matsumoto M, Tsujino T, Lee-Kawabata M, Naito Y, Akahori H, Sakoda T, et al. Iron regulatory hormone hepcidin decreases in chronic heart failure patients with anemia. *Circ J Off J Jpn Circ Soc* 2010;74:301–6.
- [7] Jankowska EA, von Haehling S, Anker SD, Macdougall IC, Ponikowski P. Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* 2013;34:816–29. doi:10.1093/eurheartj/ehs224.
- [8] Buehler PW, Alayash AI. Redox biology of blood revisited: the role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1755–60. doi:10.1089/ars.2005.7.1755.
- [9] Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1721–38. doi:10.1002/mnfr.201400036.
- [10] Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:760–9. doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.011.
- [11] Sung K-C, Kang S-M, Cho E-J, Park JB, Wild SH, Byrne CD. Ferritin is independently associated with the presence of coronary artery calcium in 12,033 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2525–30. doi:10.1161/ATVBAHA.112.253088.

- [12] McCord JM. Is iron sufficiency a risk factor in ischemic heart disease? *Circulation* 1991;83:1112–4.
- [13] Salonen JT, Nyyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992;86:803–11.
- [14] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996;20:707–27.
- [15] Cucuianu A, Patiu M, Trifa AP, Tomuleasa C, Dima D. Redistribution of iron towards deposits in erythroblastopenic anemia as a consequence of decreased erythroferrone production. *Med Hypotheses* 2014;83:530–2. doi:10.1016/j.mehy.2014.09.008.
- [16] Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730–5. doi:10.1182/blood-2006-06-028787.
- [17] Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:682–93. doi:10.1016/j.bbagen.2008.08.006.
- [18] Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2010;55:726–41. doi:10.1053/j.ajkd.2009.12.030.
- [19] Rumjon A, Sarafidis P, Brincat S, Musto R, Malyszko J, Bansal SS, et al. Serum hemojuvelin and hepcidin levels in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2012;35:295–304. doi:10.1159/000336528.
- [20] Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46:678–84. doi:10.1038/ng.2996.
- [21] Seldin MM, Peterson JM, Byerly MS, Wei Z, Wong GW. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem* 2012;287:11968–80. doi:10.1074/jbc.M111.336834.
- [22] Zeller M, Steg PG, Ravisy J, Lorgis L, Laurent Y, Sicard P, et al. Relation between body mass index, waist circumference, and death after acute myocardial infarction. *Circulation* 2008;118:482–90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753483.
- [23] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1581–98. doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001.

- [24] Warnick GR. Laboratory measurement of lipid and lipoprotein risk factors. *Scand J Clin Lab Investig Suppl* 1990;198:9–19.
- [25] Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1968;405:5–37.
- [26] Peters HPE, Rumjon A, Bansal SS, Laarakkers CMM, van den Brand JAIG, Sarafidis P, et al. Intra-individual variability of serum hepcidin-25 in haemodialysis patients using mass spectrometry and ELISA. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2012;27:3923–9. doi:10.1093/ndt/gfs164.
- [27] Ducrocq G, Puymirat E, Steg PG, Henry P, Martelet M, Karam C, et al. Blood transfusion, bleeding, anemia, and survival in patients with acute myocardial infarction: FAST-MI registry. *Am Heart J* 2015;170:726–34.e2. doi:10.1016/j.ahj.2015.07.004.
- [28] Salisbury AC, Alexander KP, Reid KJ, Masoudi FA, Rathore SS, Wang TY, et al. Incidence, correlates, and outcomes of acute, hospital-acquired anemia in patients with acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2010;3:337–46. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.110.957050.
- [29] Groenveld HF, Januzzi JL, Damman K, van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ, et al. Anemia and mortality in heart failure patients a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:818–27. doi:10.1016/j.jacc.2008.04.061.
- [30] Steinvil A, Banai S, Leshem-Rubinow E, Rogowski D, Halkin A, Keren G, et al. The development of anemia of inflammation during acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2012;156:160–4. doi:10.1016/j.ijcard.2010.10.031.
- [31] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271–6. doi:10.1172/JCI20945.
- [32] Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037–44. doi:10.1172/JCI15686.
- [33] Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? *Pharmacol Ther* 2015;146:35–52. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.004.
- [34] Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434–43. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.014.

- [35] Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24–38. doi:10.1016/j.cell.2010.06.028.
- [36] Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009;122:78–86. doi:10.1159/000243791.
- [37] Jankowska EA, Malyszko J, Ardehali H, Koc-Zorawska E, Banasiak W, von Haehling S, et al. Iron status in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2013;34:827–34. doi:10.1093/eurheartj/ehs377.
- [38] Jung G, Nemeth E, Ganz T. The Erythroid Factor Erythroferrone and Its Role In Iron Homeostasis. *Blood* 2013;122:4–4.
- [39] Kautz L, Jung G, Nemeth E, Ganz T. Erythroferrone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood* 2014;124:2569–74. doi:10.1182/blood-2014-06-584607.
- [40] Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, et al. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica* 2006;91:809–12.
- [41] Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica* 2007;92:583–8.
- [42] Lawen A. Is erythroferrone finally the long sought-after systemic erythroid regulator of iron? *World J Biol Chem* 2015;6:78–82. doi:10.4331/wjbc.v6.i3.78.
- [43] Nai A, Pellegrino RM, Rausa M, Pagani A, Boero M, Silvestri L, et al. The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice. *Haematologica* 2014;99:1016–21. doi:10.3324/haematol.2013.103143.
- [44] Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, Mandelli G, Pagani A, Silvestri L, et al. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood* 2015;125:1170–9. doi:10.1182/blood-2014-08-596254.
- [45] Wallace DF, Secondes ES, Rishi G, Ostini L, McDonald CJ, Lane SW, et al. A critical role for murine transferrin receptor 2 in erythropoiesis during iron restriction. *Br J Haematol* 2015;168:891–901. doi:10.1111/bjh.13225.

Table 1: Iron parameters according to baseline characteristics

		N(%) or Mean±SD or Median(IQR)	Iron, μM or r	p	Ferritin, μg/L or r	p	Transferrin, g/L or r	p	Total iron binding capacity (TIBC), μM or r	p	Transferrin Saturation (TSAT), units or r	p
All		31	9.91±5.77		269.45±247.29		2.22±0.41		55.4±10.1		0.18±0.09	
Risk factors												
Age, y		65±16	-0.345	0.057	-0.070	0.710	0.283	0.123	-0.283	0.123	-0.290	0.113
Female	yes	12(39%)	8.38±4.91	0.247	247.50±330.07	0.701	2.22±0.45	0.982	55.4±11.2	0.984	0.15±0.07	0.205
	no	19(61%)	10.87±6.18		283.32±186.59		2.22±0.39		55.4±9.7		0.19±0.09	
BMI, kg/m²		27±5	-0.209	0.260	0.232	0.210	-0.049	0.793	-0.050	0.791	-0.209	0.260
Hypertension	yes	18(58%)	9.58±5.79	0.716	249.11±213.68	0.598	2.25±0.38	0.660	56.1±9.5	0.662	0.17±0.09	0.547
	no	13(42%)	10.36±5.94		297.62±294.47		2.18±0.45		54.5±11.3		0.19±0.09	
Diabetes	yes	7(23%)	9.1±4.62	0.681	263.29±285.51	0.942	2.27±0.43	0.702	56.7±10.6	0.702	0.16±0.07	0.540
	no	24(67%)	10.14±6.13		271.25±241.83		2.20±0.41		55.0±10.2		0.18±0.09	
Hypercholesterolemia	yes	14(45%)	8.76±5.51	0.322	352.43±314.99	0.117	2.19±0.36	0.775	54.8±9.0	0.774	0.16±0.08	0.246
	no	17(55%)	10.85±9.97		201.12±151.84		2.24±0.45		55.9±11.3		0.19±0.09	
Current smoking	yes	10(32%)	12.14±7.46	0.139	222.40±154.91	0.474	2.28±0.40	0.580	56.9±10.0	0.578	0.21±0.12	0.228
	no	21(68%)	8.84±4.60		291.86±281.59		2.19±0.42		54.7±10.4		0.16±0.07	
CV history												
History of CAD	yes	10(32%)	9.08±6.32	0.591	316.90±283.45	0.470	2.17±0.40	0.684	54.3±10.0	0.685	0.16±0.09	0.565
	no	21(68%)	10.30±5.60		246.86±232.18		2.24±0.42		55.9±10.4		0.18±0.09	
Chronic kidney disease	yes	2(6%)	6.70±5.94	0.421	269.50±142.13	0.520	2.36±1.06	1	59.0±26.5	1	0.10±0.06	0.125
	no	29(94%)	10.13±5.80		269.45±254.55		2.21±0.37		55.2±9.2		0.18±0.09	
Admission data												
Anterior wall location	yes	10(32%)	11.16±7.35	0.413	275.20±293.64	0.931	2.45±0.45	0.023	61.3±11.2	0.023	0.18±0.12	0.749
	no	21(68%)	9.31±4.94		266.71±230.00		2.10±0.34		52.6±8.5		0.17±0.07	
STEMI	yes	12(39%)	10.26±4.98	0.792	351.50±303.09	0.192	2.12±0.36	0.289	52.9±8.9	0.290	0.19±0.08	0.449

HF on admission	no	19(61%)	9.68±6.34		217.63±196.11		2.28±0.43		57.0±10.8		0.17±0.10
	yes	8(26%)	6.48±3.72	0.049	302.38±254.31	0.670	1.93±0.16	0.001	48.2±4.0	0.001	0.13±0.07
	no	23(74%)	11.10±5.93		258.00±249.56		2.32±0.42		57.9±10.5		0.19±0.09
HR, b/min		79±15	0.059	0.766	0.067	0.736	-0.035	0.859	-0.035	0.861	0.047
		134±28	0.088	0.645	0.009	0.964	-0.044	0.819	-0.044	0.818	0.076
		78±18	0.342	0.065	0.027	0.884	0.024	0.901	0.024	0.900	0.341
		50±13	0.079	0.671	-0.410	0.022	0.181	0.329	0.181	0.330	0.047
Biological data											
Myonelectin, ng/mL		0.37(0.15-4.90)	0.214	0.249	0.314	0.085	0.217	0.242	0.217	0.242	0.152
	yes	9(30%)	4.5(3.6-6.7)	<0.001	226(91-602)	0.625	1.96(1.86-2.19)	0.086	49(46-55)	0.086	0.08(0.07-0.13)
	no	21(70%)	10.4(7.8-14.7)		166(97-336)		2.28(1.98-2.54)		57(49-63)		0.17(0.15-0.25)
Creatinine Cl, mL/min		74±27	0.270	0.143	0.005	0.977	0.237	0.198	0.238	0.198	0.235
		7.9±3.4	-0.274	0.136	0.091	0.628	-0.024	0.900	-0.023	0.900	-0.307
		91.8(50.1-158.47)	-0.330	0.070	0.433	0.015	-0.141	0.449	-0.141	0.449	-0.310
NT-proBNP, pg/mL		1037(456-3062)	-0.377	0.037	-0.066	0.725	-0.217	0.241	-0.217	0.241	-0.388
		40(7-86)	-0.138	0.466	0.405	0.027	-0.362	0.049	-0.362	0.049	-0.096
		1268±1311	0.021	0.911	0.535	0.002	-0.178	0.337	-0.179	0.336	0.063
Haemoglobin, g/dL		14.1±1.8	0.428	0.016	0.214	0.247	0.508	0.004	0.508	0.004	0.296
		42±5	0.357	0.049	0.247	0.181	0.456	0.010	0.456	0.010	0.222
		269±247	-0.049	0.793	-	-	-	-	-	-	-
Transferrin, g/L		2.22±0.41	0.503	0.004	-0.167	0.368	-	-	-	-	-
		55±10	0.504	0.004	-0.168	0.366	1.000	<0.001	-	-	-
		0.18±0.09	0.949	<0.001	-0.039	0.835	0.237	0.199	0.238	0.197	-
Chronic treatments											
Diuretic	yes	9(29%)	6.92±2.79	0.064	295.0±229.44	0.720	2.08±0.32	0.251	52.1±8.0	0.249	0.13±0.04
	no	22(71%)	11.13±6.26		259.0±258.67		2.27±0.43		56.8±10.8		0.20±0.10

ACE inhibitor	yes	6(19%)	7.45±2.09	0.055	133.67±72.99	0.010	2.37±0.48	0.307	59.3±12.0	0.307	0.13±0.03	0.013
	no	25(81%)	10.50±6.23		302.04±263.84		2.18±0.39		54.5±9.7		0.19±0.09	
Oral antidiabetics	yes	6(19%)	9.75±4.69	0.943	293.83±399.97	0.793	2.32±0.45	0.506	57.9±11.1	0.506	0.17±0.07	0.751
	no	25(81%)	9.94±6.08		263.60±239.81		2.19±0.40		54.8±10.0		0.18±0.09	
Insulin	yes	5(16%)	7.18±3.00	0.255	278.40±318.71	0.931	2.24±0.52	0.912	55.9±12.9	0.912	0.13±0.03	0.174
	no	26(84%)	10.43±6.06		267.73±238.98		2.21±0.39		55.3±9.8		0.19±0.09	
Statin	yes	9(29%)	7.63±4.38	0.164	279.44±243.52	0.888	2.05±0.26	0.146	51.2±6.5	0.145	0.14±0.07	0.198
	no	22(71%)	10.84±6.09		265.36±254.37		2.29±0.44		57.1±11.0		0.19±0.09	
Acute treatments												
Diuretic	yes	5(16%)	5.06±1.90	0.038	351.20±288.34	0.429	1.91±0.20	0.060	47.6±5.0	0.060	0.10±0.03	0.045
	no	26(84%)	10.84±5.81		253.73±241.84		2.28±0.41		56.9±10.2		0.19±0.09	
ACE inhibitor	yes	12(39%)	11.94±6.48	0.120	213.75±133.34	0.255	2.39±0.44	0.062	59.7±10.9	0.062	0.20±0.10	0.240
	no	19(61%)	8.62±5.03		304.63±296.10		2.11±0.36		52.7±8.9		0.16±0.08	
Oral antidiabetics	yes	2(6%)	10.56±0.50	0.520	296.50±180.31	0.469	2.73±0.54	0.108	68.2±13.4	0.108	0.16±0.02	0.872
	no	29(94%)	9.86±5.97		267.59±253.58		2.18±0.38		54.5±9.6		0.18±0.09	
Insulin	yes	8(26%)	9.79±4.70	0.947	287.50±273.06	0.815	2.24±0.40	0.849	56.0±10.1	0.848	0.17±0.08	0.950
	no	23(74%)	9.95±6.19		263.17±243.93		2.21±0.42		55.2±10.4		0.18±0.09	
Statin	yes	28(90%)	9.79±5.99	0.504	255.89±250.81	0.124	2.20±0.39	0.738	55.0±9.7	0.738	0.17±0.09	0.763
	no	3(10%)	11.03±3.50		396.00±203.48		2.37±0.64		59.3±16.0		0.19±0.08	

ACE inhibitor: angiotensin converting enzyme inhibitor; BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; CK: creatine kinase; CRP: C-reactive protein; DBP: diastolic blood pressure; HF: heart failure; HR: heart rate; LVEF: left ventricular ejection fraction; SBP: systolic blood pressure; STEMI: ST segment elevation myocardial infarction; TIBC: total iron binding capacity; TSAT: transferrin saturation.

Table 2: New biomarkers of iron regulation, hepcidin and myonectin/CTRP15 according to baseline characteristics

		N(%) or Mean±SD or Median(IQR)	Hepcidin, ng/mL or r	Myonectin, ng/mL or r	p
All		31	91.8 (50.1-158.5)	0.37 (0.15-4.90)	
Risk factors					
Age, y		65±16	-0.153	-0.187	0.418
Female	yes	12(39%)	56.3 (47.5-142.1)	0.32 (0.06-6.97)	0.569
	no	19(61%)	99.8 (73.6-217.9)	0.37 (0.15-4.30)	
BMI, kg/m ²		27±5	0.116	-0.197	0.393
Hypertension	yes	18(58%)	93.4 (50.9-173.3)	0.33 (0.12-6.31)	0.645
	no	13(42%)	89.7 (45.6-168.5)	0.48 (0.16-4.35)	
Diabetes	yes	7(23%)	73.6 (51.1-158.5)	0.26 (0.07-6.07)	0.622
	no	24(67%)	92.4 (48.9-200.7)	0.41 (0.15-5.50)	
Hypercholesterolemia	yes	14(45%)	90.8 (50.4-173.3)	0.61 (0.14-6.91)	0.602
	no	17(55%)	93 (48.6-177.8)	0.35 (0.15-0.80)	
Current smoking	yes	10(32%)	93.8 (46.4-241.6)	0.41 (0.15-0.61)	0.971
	no	21(68%)	91.8 (50.6-145.2)	0.29 (0.08-8.46)	
CV history					
History of CAD	yes	10(32%)	88.8 (40.5-136.4)	0.21 (0.08-8.31)	0.856
	no	21(68%)	94.9 (49.3-220.8)	0.39 (0.15-4.60)	
Chronic kidney disease	yes	2(6%)	272.9 (73.6-x)	0.37 (0.37-x)	1
	no	29(94%)	91.8 (49.3-145.2)	0.37 (0.15-5.20)	
Admission data					
Anterior wall location	yes	10(32%)	93.4 (63.9-241.6)	0.35 (0.19-1.79)	0.970
	no	21(68%)	89.7 (49.3-145.2)	0.41 (0.08-8.31)	
STEMI	yes	12(39%)	92.3 (51.1-190.1)	0.40 (0.15-4.60)	0.910
	no	19(61%)	91.8 (50.1-158.5)	0.37 (0.08-8.30)	

HF on admission	yes	8(26%)	97.3(51.7-151.1)	0.718	0.41(0.12-9.84)	0.719
	no	23(74%)	89.7(48.5-217.9)		0.35(0.15-3.45)	
HR, b/min		79±15	0.175	0.372	-0.515	0.024
SBP, mmHg		134±28	0.173	0.361	-0.235	0.319
DBP, mmHg		78±18	0.036	0.851	-0.412	0.071
LVEF, %		50±13	-0.257	0.162	0.035	0.881
Biological data						
Myonectin, ng/mL		0.37(0.15-4.90)	0.195	0.293	-	-
CRP >10	yes	9(30%)	129.10(46.98-428.24)	0.244	6.91(1.69-10.6)	0.050
	no	21(70%)	87.82(49.28-122.70)		0.27(0.10-0.80)	
Creatinine Cl, mL/min		74±27	0.047	0.801	0.057	0.806
Glucose, mmol/L		7.9±3.4	-0.160	0.390	-0.136	0.557
Hepcidine		91.8(50.1-158.47)	-	-	0.195	0.293
NT-proBNP, pg/mL		1037(456-3062)	0.097	0.605	0.051	0.825
Troponin Ic, µg/L		40(7-86)	0.249	0.185	0.059	0.799
CK, IU/L		1268±1311	0.069	0.714	-0.037	0.873
Haemoglobin, g/dL		14.1±1.8	0.367	0.043	-0.167	0.469
Haematocrit, %		42±5	0.371	0.040	-0.127	0.582
Ferritin, µg/L		269±247	-	-	-	-
Transferrin, g/L		2.22±0.41	-	-	-	-
TBIC, µM		55±10	-	-	-	-
TSAT, units		0.18±0.09	-	-	-	-
Chronic treatments						
Diuretic	yes	9(29%)	94.90(52.35-188.20)	0.433	2.26(0.08-9.07)	0.850
	no	22(71%)	88.78(46.37-154.90)		0.37(0.15-0.88)	
ACE inhibitor	yes	6(19%)	82.70(38.65-103.45)	0.395	0.37(0.21-x)	0.669
	no	25(81%)	93.00(49.28-220.77)		0.37(0.13-4.60)	
Oral antidiabetics	yes	6(19%)	90.03(42.40-173.34)	0.920	0.26(0.07-6.07)	0.622
	no	25(81%)	91.8(49.28-177.80)		0.41(0.15-5.50)	
Insulin	yes	5(16%)	73.60(52.35-132.45)	0.830	0.26(0.10-8.61)	0.897

Statin	no	26(84%)	92.40 (48.12-219.35)		0.41 (0.15-4.90)	
	yes	9(29%)	94.90 (52.35-186.20)	0.602	2.26 (0.07-9.07)	0.910
	no	22(71%)	88.78 (48.12-154.90)		0.37 (0.15-0.88)	
Acute treatments						
Diuretic	yes	5(16%)	129.10(52.35-315.33)	0.420	8.31 (0.08-x)	0.412
	no	26(84%)	90.77 (48.12-153.48)		0.35 (0.15-1.74)	
ACE inhibitor	yes	12(39%)	91.36 (54.93-196.45)	0.903	0.58 (0.36-5.45)	0.114
	no	19(61%)	91.80 (48.45-158.47)		0.15 (0.08-5.50)	
Oral antidiabetics	yes	2(6%)	149.76 (73.60-x)	0.629	0.33(0.15-5.50)	0.610
	no	29(94%)	91.80 (49.28-145.24)		2.34(0.37-x)	
Insulin	yes	8(26%)	86.69 (51.73-145.47)	0.786	0.15 (0.08-4.30)	0.360
	no	23(74%)	91.80 (48.45-223.60)		0.48 (0.18-6.20)	
Statin	yes	28(90%)	90.77 (48.86-151.85)	0.462	0.48 (0.13-6.20)	0.307
	no	3(10%)	99.77 (73.60-x)		0.15 (0.15-x)	

ACE inhibitor: angiotensin converting enzyme inhibitor; BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; CK: creatine kinase; CRP: C-reactive protein; DBP: diastolic blood pressure; HF: heart failure; HR: heart rate; LVEF: left ventricular ejection fraction; SBP: systolic blood pressure; STEMI: ST segment elevation myocardial infarction; TIBC: total iron binding capacity; TSAT: transferrin saturation.

Figure 1: Iron parameters according to heart failure

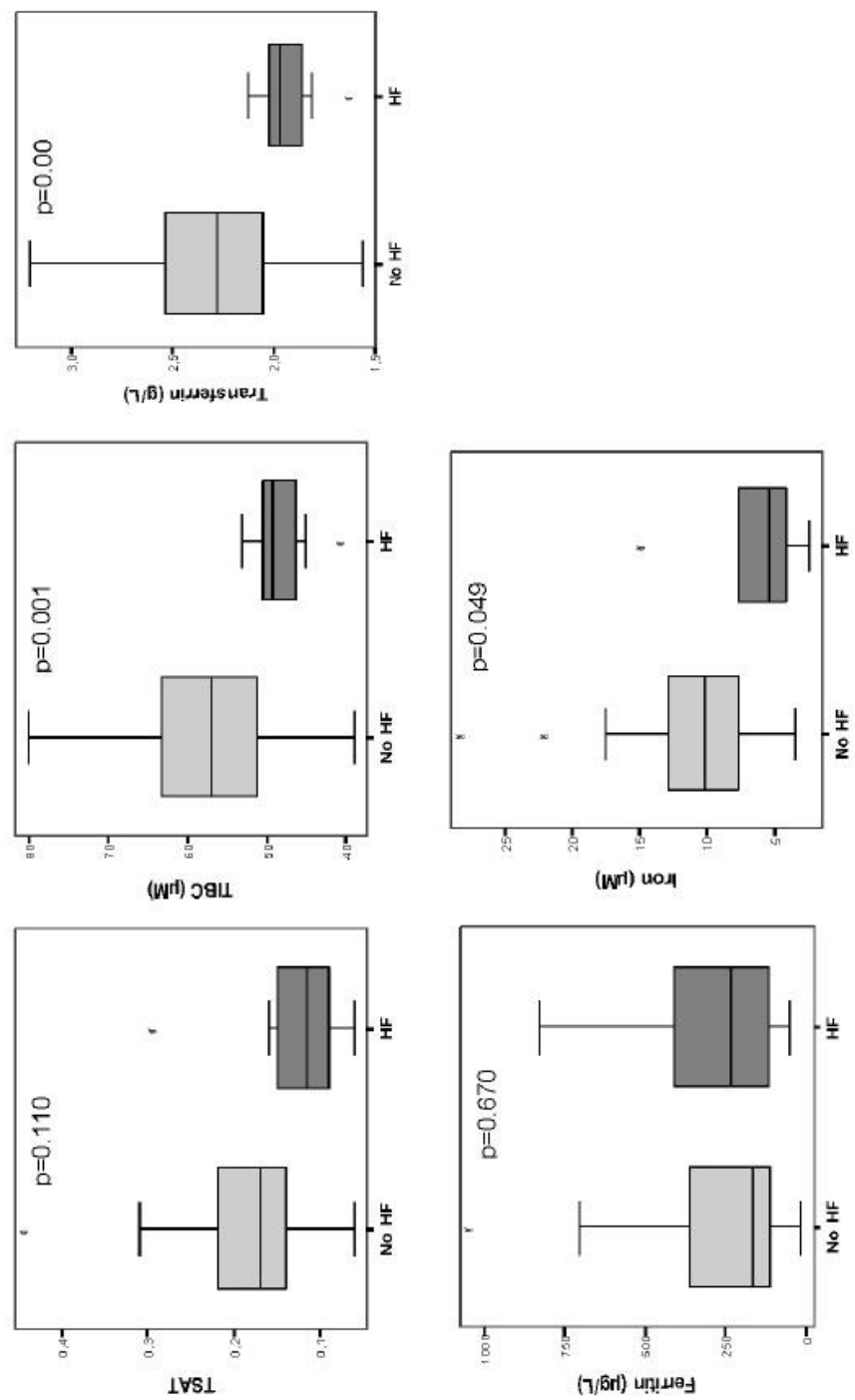


Figure 2: Regression analysis for log NTproBNP and iron parameters

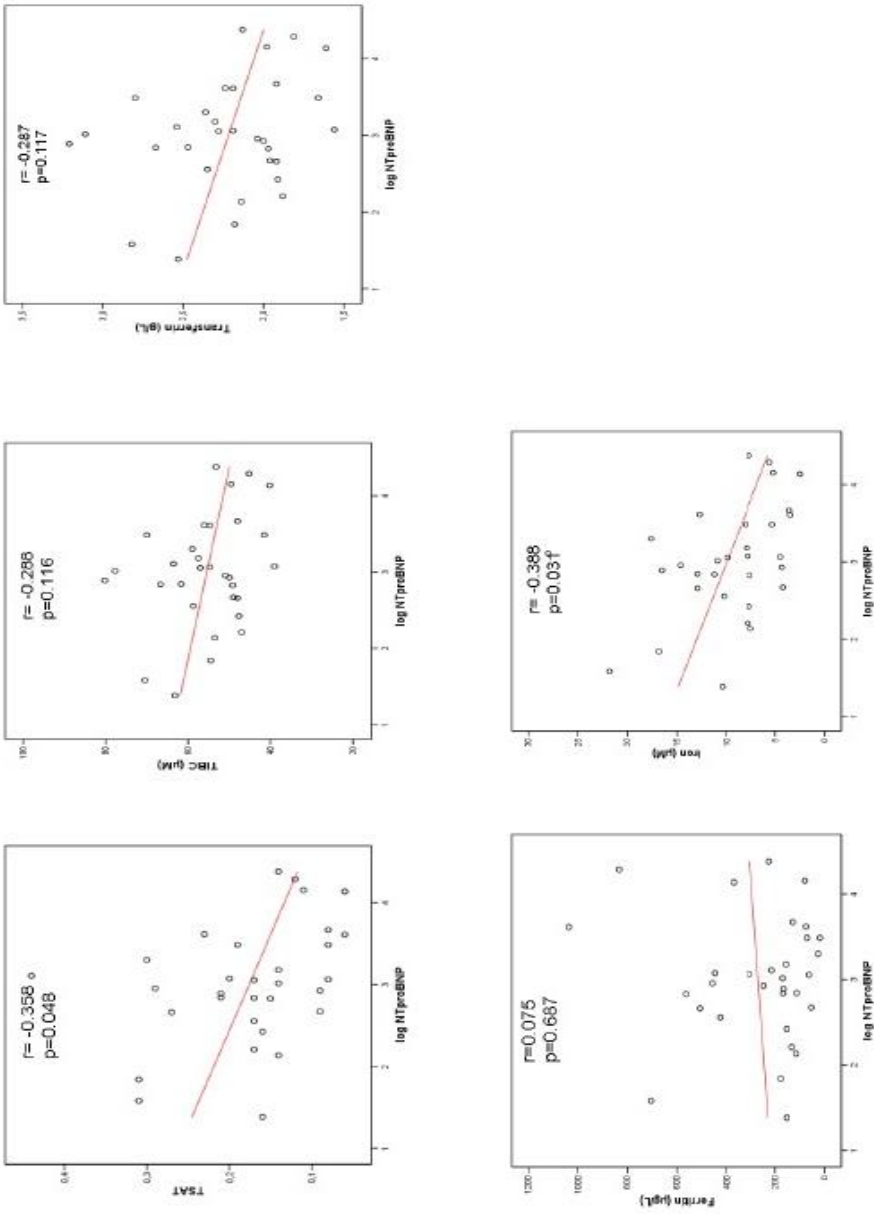


Figure 3: Percent of anemia (defined as hemoglobin <13g/dL for men and <12g/dL for women) in function of heart failure

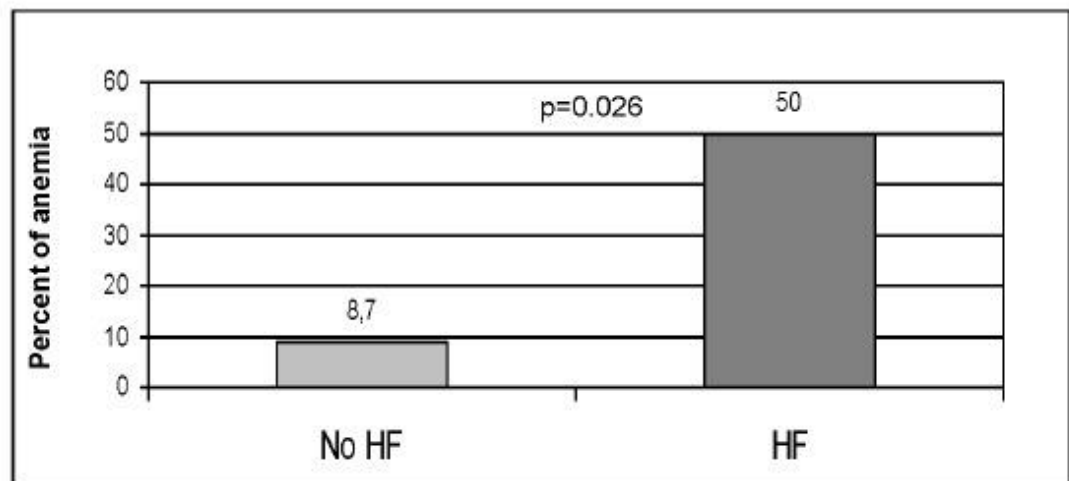


Figure 4: inflammation markers in anemic patients (defined as hemoglobin <13g/dL for men and <12g/dL for women)

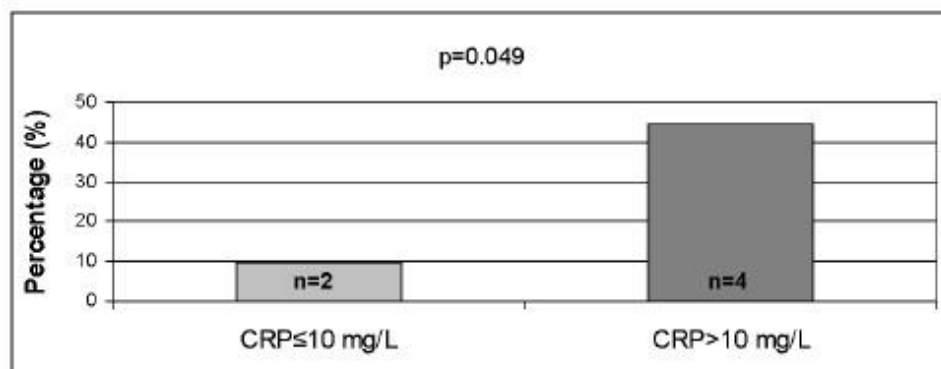


Figure 5: Iron parameters according to CRP

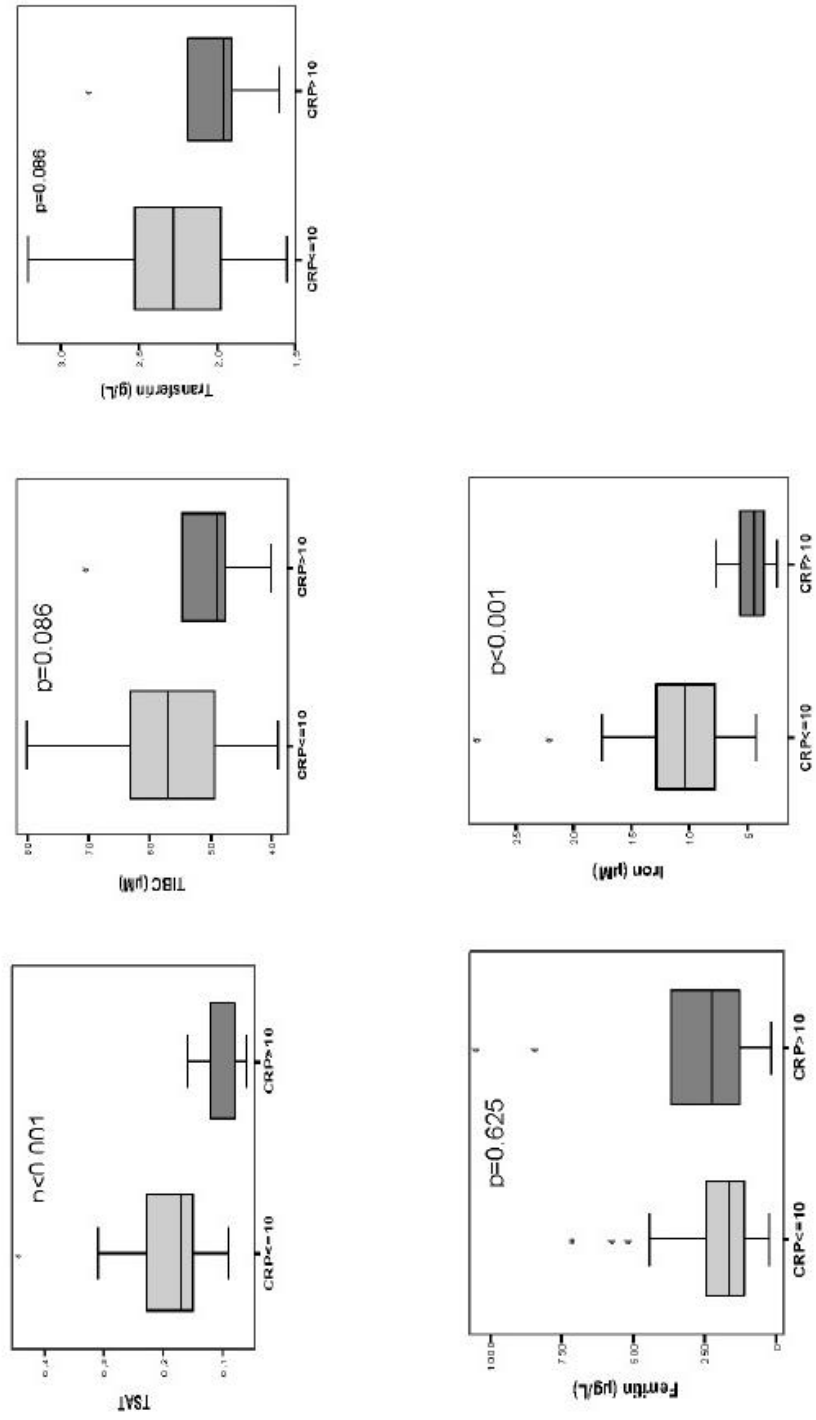


Figure 6: Hepcidin according to inflammation

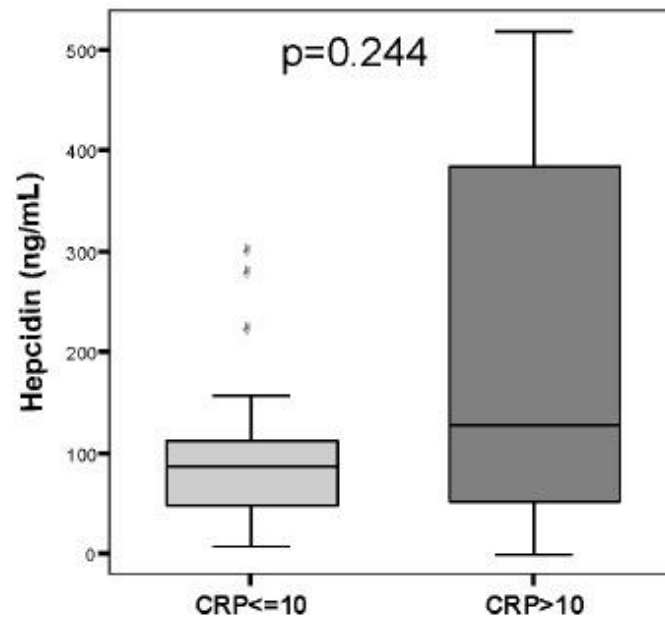
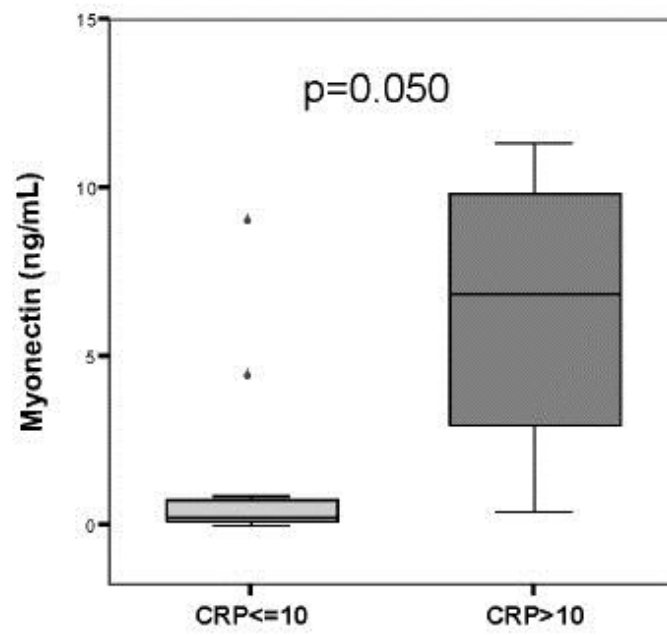


Figure 7: Myonectin according to inflammation



Discussion générale

Le rôle de l'ADMA en tant qu'inhibiteur compétitif endogène des eNOS est maintenant bien établi, alors qu'à l'inverse, la SDMA n'est pas un inhibiteur compétitif des eNOS [155,257]. L'élévation des concentrations plasmatiques d'ADMA est associée à la dysfonction endothéliale chez les patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaire ou une coronaropathie, alors que cette association est faible chez les sujets sains [258]. La dysfonction endothéliale est principalement caractérisée par une altération de la vasodilatation induite par le \bullet NO et est associée aux facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels tels que la dyslipidémie, l'hypertension et le syndrome métabolique. Plus particulièrement, au niveau de l'endothélium des patients coronariens, l'élévation du taux sérique d'ADMA est associée à des troubles de la fonction vasculaire, comme en témoignent l'augmentation de la production vasculaire d'anion superoxyde et la réduction de la biodisponibilité du \bullet NO, liée certainement au découplage accéléré des eNOS [170]. Chez les patients présentant un IDM, le taux d'ADMA circulante est associé de façon indépendante à la survenue d'évènements cliniques, probablement du fait de son impact néfaste sur l'homéostasie vasculaire. Précédemment, il avait été démontré dans notre Laboratoire, dans une large étude, qu'il existait une forte relation inverse entre HDL-c et ADMA chez des patients présentant un IDM, suggérant une interaction fonctionnelle entre HDL-c et endothélium, au-delà des conditions métaboliques associées à de faibles taux de HDL-c [247].

Nos travaux précisent qu'il existe une relation positive entre la SDMA et l'ADMA, mais pas avec la L-arginine. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de précédentes études réalisées au sein de notre Laboratoire [169] et par un autre groupe [259]. Des concentrations élevées de SDMA plasmatiques peuvent également influencer indirectement l'activité de NOS en inhibant le transport membranaire de la L-arginine. Ainsi, au cours de l'IDM, les voies biochimiques qui régulent les fonctions biologiques des diméthylarginines peuvent apparaître interdépendantes.

Notre étude, comme d'autres [260], a montré que les valeurs de SDMA sont corrélées de façon négative à la clairance de la créatinine. Il existe une association positive entre les taux circulants d'ADMA et de SDMA et la mortalité, aussi bien cardiovasculaire que toutes causes confondues, chez les patients atteints d'insuffisance rénale au stade terminal. Il semble admis que les pathologies rénales chroniques sont associées à une diminution de la biodisponibilité du \bullet NO, « médiateur » indispensable au maintien de fonctions vasculaires et rénales normales. Plusieurs études chez l'homme ont suggéré que la SDMA était bien corrélée avec les paramètres de la fonction rénale [172]. Récemment, l'association positive entre SDMA et augmentation du risque est controversée [261] en raison du fait qu'un taux élevé d'ADMA pourrait influencer la production de \bullet NO en inhibant le transport de l'arginine.

Une des principales conclusions de notre étude est la corrélation positive de l'ADMA avec la glycémie à l'admission. Plusieurs études ont démontré qu'un taux élevé d'ADMA contribuait à la dysfonction endothéliale, une des caractéristiques du diabète [262,263]. Le diabète affecte les cellules endothéliales et atténue la réparation endothéliale ainsi que l'angiogenèse, qui sont étroitement associées à l'augmentation de la prévalence des pathologies cardiovasculaires. Les mécanismes exacts qui sous-tendent ces maladies restent en partie inconnus ; cependant, il existe de plus en plus d'arguments pour étayer le fait que l'excès de production d'ERO, en grande partie due à l'hyperglycémie, majore le niveau du stress oxydant au sein de nombreux tissus [264]. L'un des mécanismes impliqués dans la corrélation positive entre ADMA et glycémie est l'incidence du niveau de la glycémie sur l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADMA, telle que la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH). La voie DDAH2/ADMA apparaît jouer un rôle important dans la sénescence des cellules endothéliales au cours du diabète [265].

Nous avons également observé au cours de nos travaux une corrélation positive entre ADMA et CRP à la phase aiguë de l'IDM. Plusieurs études ont montré la valeur pronostique de marqueurs de l'inflammation dans l'IDM, tels que la CRP et les indices circulants du stress oxydant [143]. Il a été rapporté que la mesure du taux de CRP pourrait permettre de mieux caractériser les patients à risque intermédiaire d'événements cardiovasculaires. La CRP inhibe directement la production de NO par les cellules endothéliales en déstabilisant les eNOS [144,266]. Les mécanismes sous-tendant la corrélation positive entre ADMA et CRP demeurent incomplètement élucidés. Une hypothèse émergente, basée sur les résultats expérimentaux, suggère un effet du processus de l'inflammation sur les activités des enzymes associées au métabolisme de l'ADMA. En outre, la SDMA, qui n'est pas un inhibiteur compétitif des NO synthases, ne semble pas être associée aux niveaux de CRP. L'ADMA est impliquée dans la réponse inflammatoire à travers l'activation de l'adhésion leucocytaire et la production de la cytokine inflammatoire $\text{TNF-}\alpha$, comme cela a été montré dans des cultures de cellules endothéliales ou de monocytes [267]. L'accumulation d'ADMA est le résultat de l'augmentation de sa production et/ou d'une diminution de sa dégradation. Il y a de plus en plus de preuves indiquant que 1) l'expression de DDAH2, l'enzyme clé de la dégradation de l'ADMA, est réduite de façon marquée dans les tissus inflammatoires 2) l'ADMA est non seulement un facteur de risque de la dysfonction endothéliale, mais aussi un nouveau médiateur pro-inflammatoire [268].

Concernant l'étude des paramètres du fer en phase aiguë d'infarctus du myocarde, nous montrons une élévation du taux d'hépcidine sérique en phase aiguë d'IDM.

Ces résultats sont en accord avec ceux de précédentes études [216,232]. Ce taux élevé d'hepcidine sérique peut avoir plusieurs origines ; d'une part, il peut être dû à une upregulation avec augmentation de son expression par le processus inflammatoire lié à l'IDM ; d'autre part, il y aurait, selon un concept tout récent, une augmentation de l'expression extra-hépatique d'hepcidine, qui serait exprimée par les cellules myocardiques hypoxiques [77,216,269]. Nous avons également précédemment montré, sur coupes immunocolorées, l'expression d'hepcidine au niveau du myocarde [37]. Merle *et coll.* ont montré une augmentation de l'expression de l'hepcidine dans les cœurs de rats exposés à des situations d'hypoxie [232]. Simonis *et al* ont montré une upregulation de l'hepcidine dans le myocarde ischémique de rats avec une augmentation de l'expression d'hepcidine par le myocarde infarcté et aussi une élévation du taux sérique d'hepcidine chez ces rats. Les auteurs suggèrent que cette upregulation de l'hepcidine, lors d'une ischémie myocardique, permettrait de réduire la toxicité tissulaire du fer et ainsi la zone de myocarde infarcté [216].

L'hepcidine, en plus de son rôle de chef d'orchestre-régulateur du métabolisme systémique du fer (blocage de la sortie cellulaire du fer par sa liaison à la ferroportine, diminution de l'absorption duodénale du fer et rétention dans le réticulum endothélial, diminuant le fer circulant et la biodisponibilité du fer pour les tissus cibles ; tout ceci diminue les effets défavorables de l'excès de fer comprenant notamment la production des ERO) [270–272], a un rôle physiologique plus large, comprenant le contrôle efficace de l'érythropoïèse et la réponse immune innée antimicrobienne [184,273]. La production hépatique d'hepcidine est rétrocontrôlée par 3 groupes de molécules intervenant dans 1) les systèmes de détection du fer ou *iron sensing systems* (l'augmentation de la concentration de fer circulant entraîne l'expression d'hepcidine relarguée dans la circulation), 2) l'érythropoïèse inefficace (l'anémie et/ou l'hypoxie inhibent la production hépatique d'hepcidine) et 3) les processus inflammatoires. Les stimuli inflammatoires tels que l'IL-6 ou les LPS augmentent l'expression hépatique d'hepcidine et c'est ce mécanisme qui semble être responsable du développement de la carence martiale et de l'anémie dans les maladies inflammatoires chroniques [270,271,274,275].

En conclusion, l'hepcidine apparaît comme un régulateur clé du métabolisme du fer et l'étude de ses variations et régulations aiderait à mieux comprendre les mécanismes à l'origine des désordres ferriques dans différentes cardiopathies, qu'il s'agisse de formes chroniques ou aiguës, avec dans chaque cas, des régulations et voies de signalisation différentes, rendant les analyses et interprétations complexes.

Dans son étude sur une population de patients atteints d'insuffisance cardiaque, non anémiés initialement, Jankowska *et coll.* conclut, suite à un suivi allant jusqu'à 3 ans pour

certain patients, que d'une part, des taux élevés d'hépcidine sérique sont corrélés à un stade précoce d'insuffisance cardiaque, d'autre part, que la progression de l'insuffisance cardiaque systolique est associée à une diminution du taux d'hépcidine sérique et au développement d'une carence martiale avec érythropoïèse inefficace réduite en fer et enfin, qu'un taux bas d'hépcidine sérique serait un puissant facteur pronostique indépendant de mortalité à 3 ans dans l'insuffisance cardiaque [188]. Cependant, certains résultats sont contradictoires avec ceux de la littérature et méritent d'être discutés. En effet, à la phase précoce de l'insuffisance cardiaque systolique, les taux d'hépcidine sériques sont élevés dans leur étude, en association à de faibles taux de marqueurs proinflammatoires tels que l'IL-6 ou la CRP. L'explication qui peut être envisagée est qu'à ce stade précoce, les stimuli à la fois inflammatoires et ceux associés à l'érythropoïèse inefficace sont d'une importance mineure dans la régulation de l'expression de l'hépcidine hépatique et les taux élevés d'hépcidine circulantes seraient interprétés comme une réponse à l'excès de fer, qui, en l'absence d'activation proinflammatoire, est attesté par une élévation de la ferritinémie.

Une relation inverse entre marqueurs proinflammatoires et taux d'hépcidine circulante peuvent résulter des **propriétés anti-inflammatoires de l'hépcidine**. En effet, au niveau expérimental, un prétraitement par hépcidine IV ou l'induction d'hépcidine hépatique empêche la réponse inflammatoire suite à l'exposition aux LPS [276,277]. L'inflammation et le stress oxydant sont deux mécanismes cruciaux impliqués dans la progression des atteintes cardiovasculaires et par conséquent, leur prévention due à l'upregulation de l'hépcidine peut être considérée comme une réponse adaptative. A plus long terme cependant, l'upregulation de l'hépcidine bloque l'absorption et la libération de fer, entraînant le développement d'une carence martiale, qui à son tour, provoque des dommages au niveau du myocarde, des muscles périphériques et du système hématopoïétique, participant à la progression de la maladie.

Comme la régulation de l'expression extra-hépatique de l'hépcidine est très complexe et non entièrement élucidée, d'autres facteurs pourraient intervenir dans ces voies. C'est le cas par exemple du facteur régulateur érythroïde érythroferrone qui vient d'être découvert il y a quelques mois et que nous avons étudié dans nos travaux.

Devant la complexité de l'intégration et de la compréhension des différents acteurs et voies de signalisation intervenant dans la régulation du métabolisme du fer, aussi bien systémique que tissulaires et aussi bien dans le cadre de pathologies cardiovasculaires aiguës, telles que l'IDM, ou chroniques, telles que l'insuffisance cardiaque, avec des mécanismes interférant, des travaux complémentaires expérimentaux et cliniques

apparaissent nécessaires. L'objectif est alors de pouvoir proposer des algorithmes décisionnels guidant des approches thérapeutiques spécifiques dans chaque situation, selon les caractéristiques cliniques et les comorbidités des patients. Un traitement émergent dans ce contexte est celui de la supplémentation en fer IV, avec des bénéfices maintenant bien démontrés dans l'insuffisance cardiaque [187] et qui restent à démontrer dans l'infarctus du myocarde [278].

Limites et perspectives

Une des premières limites de nos travaux de Thèse est subordonnée au nombre de patients relativement faible qui ont pu être inclus au final (n=31). Il ne s'agit que d'études observationnelles, nous ne pouvons que constater des corrélations plutôt que des relations causales concernant les altérations métaboliques observées. Le faible effectif final, qui ne correspond qu'à 19 % des patients inclus au départ, limite également l'interprétation de la corrélation entre les paramètres fonctionnels et les valeurs biologiques. Des études complémentaires sont en effet nécessaires pour étayer certaines hypothèses.

Une seconde limite, en lien avec la première, est celle de n'avoir réalisé qu'un seul prélèvement sanguin, lors de l'admission des patients, pour déterminer les concentrations sériques de tous les acteurs du métabolisme du fer et des diméthylarginines. D'une part, nous nous sommes heurtés aux conditions d'urgence et d'hémolyse de plusieurs tubes rendant ininterprétables des données telles que le fer sérique et ainsi le CST. D'autre part, l'analyse des paramètres du métabolisme du fer a donc été réalisée en phase aiguë d'IDM, quelle que soit l'heure de la journée ou de la nuit, car nous voulions interpréter les valeurs de chaque paramètre au plus près du phénomène ischémique, mais il existe une fluctuation de la sidérémie au cours du nyctémère, maximale à midi et minimale à minuit. Il a aussi été décrit des fluctuations chez un même individu, même prélevé à heures fixes. Il aurait ainsi été intéressant de pouvoir disposer d'autres prélèvements, comme le lendemain matin de l'épisode pour tous les patients, ainsi que de réaliser une analyse ultérieure, à 30 jours par exemple, pour juger de la cinétique de ces paramètres. De la même manière, concernant l'étude des diméthylarginines, une cinétique d'évolution en post-infarctus au cours de l'hospitalisation du patient pourrait être envisagée. Cela permettrait la définition de valeurs seuils utilisables dès la prise en charge d'un patient en phase aiguë d'IDM. L'évolution des taux de diméthylarginines (ADMA et SDMA) a été évaluée avant, immédiatement après et 24h après une procédure d'angioplastie chez des patients présentant un angor stable, un IDM avec ou sans décalage du segment ST (NSTEMI et STEMI respectivement). Les taux d'ADMA sont significativement plus élevés après angioplastie, aussi bien dans les STEMI que les NSTEMI alors que les taux de SDMA ne sont significativement plus élevés que dans les NSTEMI [279]. Une autre étude a montré, qu'après angioplastie avec implantation de stent dans le cadre des STEMI, les concentrations d'ADMA et de SDMA augmentent modérément et ce, jusqu'à 30 jours après l'intervention [280].

Comme nous l'avons vu précédemment, les interactions des différents acteurs impliquées dans le métabolisme du fer sont extrêmement complexes, agissant à différents niveaux et étant soumis à des mécanismes de régulation parfois inverses lorsqu'un statut

inflammatoire entre en ligne de compte. C'est par exemple le cas pour l'insuffisance cardiaque, où, les taux sériques d'hepcidine et de ferritine diminuent proportionnellement à la gravité de l'insuffisance cardiaque représentée par la classe NYHA. Mais parallèlement, la sécrétion d'hepcidine, de même que la ferritinémie, augmentent lors de phénomènes inflammatoires, comme lors de l'IDM, rendant très complexe l'interprétation des mécanismes de régulation et des voies de signalisation du métabolisme du fer. Ceci est particulièrement apparent en phase aiguë d'infarctus du myocarde, chez des patients présentant de façon concomitante une insuffisance cardiaque. Ces dysfonctions peuvent être accompagnées, de surcroît, d'une carence martiale associée ou non à une anémie...

Ces constatations augurent les perspectives de nos travaux actuels/futurs où nous souhaiterions étudier, de façon prospective, les différents paramètres de régulation du métabolisme du fer et des diméthylarginines, chez des patients en phase aiguë d'IDM, présentant une FEVG altérée ou une symptomatologie d'insuffisance cardiaque lors de la phase hospitalière. Ces patients seraient ensuite suivis en programme de réadaptation cardiovasculaire avec mesure de ces biomarqueurs en début et fin de programme, en comparaison avec un groupe témoin composé de patients qui « refusent » la réadaptation. Au-delà de cette étude interventionnelle, est également envisagé, en parallèle, chez les patients présentant une carence martiale avérée, un suivi de ces paramètres associés à la supplémentation en fer actuellement recommandée dans l'insuffisance cardiaque [187].

Références bibliographiques

- [1] Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2011;120:357–75. doi:10.1042/CS20100476.
- [2] Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2011;32:2999–3054. doi:10.1093/eurheartj/ehr236.
- [3] Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation* 2007;115:e356–75. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.182882.
- [4] Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008;112:4292–7. doi:10.1182/blood-2008-02-139915.
- [5] Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46:678–84. doi:10.1038/ng.2996.
- [6] Cavalca V, Veglia F, Squellerio I, De Metrio M, Rubino M, Porro B, et al. Circulating levels of dimethylarginines, chronic kidney disease and long-term clinical outcome in non-ST-elevation myocardial infarction. *PloS One* 2012;7:e48499. doi:10.1371/journal.pone.0048499.
- [7] Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1721–38. doi:10.1002/mnfr.201400036.
- [8] Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:1011–23. doi:10.1056/NEJMr041809.
- [9] Qunibi WY. The efficacy and safety of current intravenous iron preparations for the management of iron-deficiency anaemia: a review. *Arzneimittelforschung* 2010;60:399–412. doi:10.1055/s-0031-1296304.
- [10] Heath A-LM, Fairweather-Tait SJ. Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:225–41.
- [11] Lim HH, Yang SJ, Kim Y, Lee M, Lim Y. Combined treatment of mulberry leaf and fruit extract ameliorates obesity-related inflammation and oxidative stress in high fat diet-induced obese mice. *J Med Food* 2013;16:673–80. doi:10.1089/jmf.2012.2582.
- [12] Sharp PA. Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Für Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr* 2010;80:231–42. doi:10.1024/0300-9831/a000029.

- [13] Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT. Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem Sci* 2006;31:182–8. doi:10.1016/j.tibs.2006.01.005.
- [14] Ishizuka M, Abe F, Sano Y, Takahashi K, Inoue K, Nakajima M, et al. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol* 2011;11:358–65. doi:10.1016/j.intimp.2010.11.029.
- [15] Byrne SL, Krishnamurthy D, Wessling-Resnick M. Pharmacology of iron transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013;53:17–36. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134648.
- [16] Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:783–92. doi:10.1016/j.bbagen.2010.02.005.
- [17] Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J* 1972;4:206–8.
- [18] Knutson MD. Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu Rev Nutr* 2010;30:149–71. doi:10.1146/annurev.nutr.012809.104801.
- [19] McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001;291:1755–9. doi:10.1126/science.1057206.
- [20] Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G631–5. doi:10.1152/ajpgi.00220.2005.
- [21] Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood* 2006;108:1388–94. doi:10.1182/blood-2006-02-003681.
- [22] Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969;244:6388–94.
- [23] Rochette L, Cottin Y, Zeller M, Vergely C. Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol Ther* 2013;137:133–52. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.09.007.
- [24] West AR, Oates PS. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:150–8. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05047.x.
- [25] Varfaj F, Lampe JN, Ortiz de Montellano PR. Role of cysteine residues in heme binding to human heme oxygenase-2 elucidated by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 2012;287:35181–91. doi:10.1074/jbc.M112.378042.
- [26] Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes

- p>derived from heme oxygenase-2 gene.
- Gene*
- 2004;336:241–50. doi:10.1016/j.gene.2004.04.002.
- [27] Breuer W, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:350–4. doi:10.1016/j.biocel.2007.03.010.
 - [28] MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:997–1030. doi:10.1089/ars.2007.1893.
 - [29] Tsuji Y. JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogene* 2005;24:7567–78. doi:10.1038/sj.onc.1208901.
 - [30] Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004;117:285–97.
 - [31] Nairz M, Schleicher U, Schroll A, Sonnweber T, Theurl I, Ludwiczek S, et al. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *J Exp Med* 2013;210:855–73. doi:10.1084/jem.20121946.
 - [32] Straub AC, Lohman AW, Billaud M, Johnstone SR, Dwyer ST, Lee MY, et al. Endothelial cell expression of haemoglobin α regulates nitric oxide signalling. *Nature* 2012;491:473–7. doi:10.1038/nature11626.
 - [33] Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:188–202. doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.013.
 - [34] Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, et al. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:291–317. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.016.
 - [35] Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooze M, Abitbol V, Leblanc S, et al. Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* 2013;45:803–9. doi:10.1016/j.dld.2013.02.019.
 - [36] Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez M-J, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 2012;15:918–24. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.018.
 - [37] Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? *Pharmacol Ther* 2015;146:35–52. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.004.
 - [38] Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147–50.

- [39] Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806–10. doi:10.1074/jbc.M008922200.
- [40] Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811–9. doi:10.1074/jbc.M008923200.
- [41] Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: detection and characterization of a novel hepcidin isoform. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24124495> (accessed August 15, 2015).
- [42] Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011;117:e218–25. doi:10.1182/blood-2011-02-337907.
- [43] Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 2009;75:976–81. doi:10.1038/ki.2009.21.
- [44] Galesloot TE, Holewijn S, Kiemeny LALM, de Graaf J, Vermeulen SH, Swinkels DW. Serum hepcidin is associated with presence of plaque in postmenopausal women of a general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:446–56. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302381.
- [45] Ganz T. Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:171–82. doi:10.1016/j.beha.2004.08.020.
- [46] Peters HPE, Laarakkers CMM, Swinkels DW, Wetzels JFM. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2010;25:848–53. doi:10.1093/ndt/gfp546.
- [47] Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. α -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol* 2013;228:1665–75. doi:10.1002/jcp.24266.
- [48] Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 2005;184:361–70. doi:10.1677/joe.1.05729.
- [49] Troutt JS, Butterfield AM, Konrad RJ. Hepcidin-25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates. *J Clin Lab Anal* 2013;27:504–10. doi:10.1002/jcla.21634.

- [50] Layoun A, Santos MM. Bacterial cell wall constituents induce hepcidin expression in macrophages through MyD88 signaling. *Inflammation* 2012;35:1500–6. doi:10.1007/s10753-012-9463-4.
- [51] Constante M, Jiang W, Wang D, Raymond V-A, Bilodeau M, Santos MM. Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G229–37. doi:10.1152/ajpgi.00092.2006.
- [52] Sow FB, Nandakumar S, Velu V, Kellar KL, Schlesinger LS, Amara RR, et al. Mycobacterium tuberculosis components stimulate production of the antimicrobial peptide hepcidin. *Tuberc Edinb Scotl* 2011;91:314–21. doi:10.1016/j.tube.2011.03.003.
- [53] Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* 2008;111:2392–9. doi:10.1182/blood-2007-05-090019.
- [54] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13:1050–9. doi:10.1038/nm1622.
- [55] Gong Q, Yin H, Fang M, Xiang Y, Yuan C-L, Zheng G-Y, et al. Heme oxygenase-1 upregulation significantly inhibits TNF-alpha and Hmgb1 releasing and attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol* 2008;8:792–8. doi:10.1016/j.intimp.2008.01.026.
- [56] Yuan X-M, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* 2003;35:578–91.
- [57] Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med Maywood NJ* 2007;232:1014–20. doi:10.3181/0703-MR-54.
- [58] Bories G, Colin S, Vanhoutte J, Derudas B, Copin C, Fanchon M, et al. Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages. *Circ Res* 2013;113:1196–205. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301656.
- [59] Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788–96. doi:10.1053/j.gastro.2006.07.007.
- [60] Vuppalanchi R, Troutt JS, Konrad RJ, Ghabril M, Saxena R, Bell LN, et al. Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obes Silver Spring Md* 2014;22:836–41. doi:10.1002/oby.20403.
- [61] Coimbra S, Catarino C, Santos-Silva A. The role of adipocytes in the modulation of iron metabolism in obesity. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes* 2013;14:771–9. doi:10.1111/obr.12057.

- [62] Dani C. Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes* 2005 2013;37:163–6. doi:10.1038/ijo.2012.28.
- [63] Akel S, Bertolette D, Ruscetti FW. Crosstalk between the Smad and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways is Essential for Erythroid Differentiation of Erythroleukemia Cells Induced by TGF- β , Activin, Hydroxyurea and Butyrate. *J Leuk Los Angel Calif* 2013;1. doi:10.4172/2329-6917.1000109.
- [64] Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth M-P, et al. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* 2012;120:431–9. doi:10.1182/blood-2012-02-411470.
- [65] Rajsheker S, Manka D, Blomkalns AL, Chatterjee TK, Stoll LL, Weintraub NL. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:191–6. doi:10.1016/j.coph.2009.11.005.
- [66] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271–6. doi:10.1172/JCI20945.
- [67] Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, et al. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2012;122:3529–40. doi:10.1172/JCI44421.
- [68] Chung B, Matak P, McKie AT, Sharp P. Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 human hepatoma cells. *J Nutr* 2007;137:2366–70.
- [69] Meli R, Mattace Raso G, Irace C, Simeoli R, Di Pascale A, Paciello O, et al. High Fat Diet Induces Liver Steatosis and Early Dysregulation of Iron Metabolism in Rats. *PLoS One* 2013;8:e66570. doi:10.1371/journal.pone.0066570.
- [70] Amato A, Santoro N, Calabrò P, Grandone A, Swinkels DW, Perrone L, et al. Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes* 2005 2010;34:1772–4. doi:10.1038/ijo.2010.204.
- [71] Luciani N, Brasse-Lagnel C, Poli M, Anty R, Lesueur C, Cormont M, et al. Hemojuvelin: a new link between obesity and iron homeostasis. *Obes Silver Spring Md* 2011;19:1545–51. doi:10.1038/oby.2011.12.
- [72] Rochette L, Tatou E, Maupoil V, Zeller M, Cottin Y, Jazayeri S, et al. Atrial and vascular oxidative stress in patients with heart failure. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2011;27:497–502. doi:10.1159/000329951.
- [73] Tuomainen TP, Punnonen K, Nyyssönen K, Salonen JT. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* 1998;97:1461–6.

- [74] Qian ZM, Chang YZ, Leung G, Du JR, Zhu L, Wang Q, et al. Expression of ferroportin1, hephaestin and ceruloplasmin in rat heart. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:527–32. doi:10.1016/j.bbadis.2007.02.006.
- [75] Ge XH, Wang Q, Qian ZM, Zhu L, Du F, Yung WH, et al. The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J Nutr Biochem* 2009;20:860–5. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.07.014.
- [76] Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 2007;148:2663–8. doi:10.1210/en.2006-1331.
- [77] Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, et al. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem* 2010;21:749–56. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.04.009.
- [78] Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461–3. doi:10.1182/blood-2002-10-3235.
- [79] Zhang L, Lu D, Zhang W, Quan X, Dong W, Xu Y, et al. Cardioprotection by Hpc1 in cTnT(R141W) transgenic mice. *Transgenic Res* 2012;21:867–78. doi:10.1007/s11248-011-9582-y.
- [80] Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757452> (accessed August 15, 2015).
- [81] Strnad P, Schwarz P, Rasenack MCD, Kucukoglu O, Habib RI, Heuberger D, et al. Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. *PloS One* 2011;6:e16454. doi:10.1371/journal.pone.0016454.
- [82] Schubert TEO, Bosserhoff AK, Peyssonau C, Echtenacher B, Knutson M, Hofstädter F, et al. Hypoferraemia during the early inflammatory response is dependent on tumour necrosis factor activity in a murine model of protracted peritonitis. *Mol Med Rep* 2012;6:838–42. doi:10.3892/mmr.2012.1004.
- [83] Ward DG, Roberts K, Brookes MJ, Joy H, Martin A, Ismail T, et al. Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol WJG* 2008;14:1339–45.
- [84] Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang A-S, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 2009;9:217–27. doi:10.1016/j.cmet.2009.01.010.

- [85] D tivaud L, Island M-L, Jouanolle A-M, Ropert M, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, et al. Ferroportin diseases: functional studies, a link between genetic and clinical phenotype. *Hum Mutat* 2013;34:1529–36. doi:10.1002/humu.22396.
- [86] Kasvosve I. Effect of ferroportin polymorphism on iron homeostasis and infection. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2013;416:20–5. doi:10.1016/j.cca.2012.11.013.
- [87] Clark RJ, Tan CC, Preza GC, Nemeth E, Ganz T, Craik DJ. Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem Biol* 2011;18:336–43. doi:10.1016/j.chembiol.2010.12.009.
- [88] De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007;18:2569–78. doi:10.1091/mbc.E07-01-0060.
- [89] De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3800–5. doi:10.1073/pnas.0900453106.
- [90] Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, et al. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest* 2011;121:4880–8. doi:10.1172/JCI57693.
- [91] Anderson GJ, Vulpe CD. Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2009;66:3241–61. doi:10.1007/s00018-009-0051-1.
- [92] Bayeva M, Chang H-C, Wu R, Ardehali H. When less is more: novel mechanisms of iron conservation. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2013;24:569–77. doi:10.1016/j.tem.2013.07.003.
- [93] Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1174–94. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001.
- [94] Bacchetta J, Zaritsky JJ, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Zavala K, et al. Suppression of iron-regulatory hepcidin by vitamin D. *J Am Soc Nephrol JASN* 2014;25:564–72. doi:10.1681/ASN.2013040355.
- [95] Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 2008;111:924–31. doi:10.1182/blood-2007-07-100677.
- [96] Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut* 2012;61:933–52. doi:10.1136/gut.2010.214312.

- [97] Palaneeswari M S, Ganesh M, Karthikeyan T, Devi AJM, Mythili SV. Hepcidin-minireview. J Clin Diagn Res JCDDR 2013;7:1767–71. doi:10.7860/JCDDR/2013/6420.3273.
- [98] Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C, et al. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. Blood 2011;117:2953–9. doi:10.1182/blood-2010-08-299859.
- [99] Oliveira SJ, de Sousa M, Pinto JP. ER Stress and Iron Homeostasis: A New Frontier for the UPR. Biochem Res Int 2011;2011:896474. doi:10.1155/2011/896474.
- [100] Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. Science 2009;325:877–80. doi:10.1126/science.1176639.
- [101] Shin D-Y, Chung J, Joe Y, Pae H-O, Chang KC, Cho GJ, et al. Pretreatment with CO-releasing molecules suppresses hepcidin expression during inflammation and endoplasmic reticulum stress through inhibition of the STAT3 and CREBH pathways. Blood 2012;119:2523–32. doi:10.1182/blood-2011-07-366690.
- [102] Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. Nitric Oxide Biol Chem Off J Nitric Oxide Soc 2013;35:5–20. doi:10.1016/j.niox.2013.07.002.
- [103] Yin S, Wang Z, Bernstein ER. Formaldehyde and methanol formation from reaction of carbon monoxide and hydrogen on neutral Fe₂S₂ clusters in the gas phase. Phys Chem Chem Phys PCCP 2013;15:4699–706. doi:10.1039/c3cp50183c.
- [104] Frazer DM, Inglis HR, Wilkins SJ, Millard KN, Steele TM, McLaren GD, et al. Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. Gut 2004;53:1509–15. doi:10.1136/gut.2003.037416.
- [105] Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, et al. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. J Cell Sci 2006;119:4486–98. doi:10.1242/jcs.03228.
- [106] Darshan D, Anderson GJ. Interacting signals in the control of hepcidin expression. Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med 2009;22:77–87. doi:10.1007/s10534-008-9187-y.
- [107] Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. Nat Chem Biol 2008;4:33–41. doi:10.1038/nchembio.2007.54.
- [108] Camaschella C. BMP6 orchestrates iron metabolism. Nat Genet 2009;41:386–8.

- [109]Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189278> (accessed August 15, 2015).
- [110]Anderson GJ, Darshan D. Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat Chem Biol* 2008;4:15–6. doi:10.1038/nchembio0108-15.
- [111]Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol* 2010;17:184–90. doi:10.1097/MOH.0b013e328337b52f.
- [112]Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh S-H, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13:1096–101. doi:10.1038/nm1629.
- [113]Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S-J, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 2009;114:181–6. doi:10.1182/blood-2008-12-195503.
- [114]Ikeda Y, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, et al. Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes. *PloS One* 2012;7:e40465. doi:10.1371/journal.pone.0040465.
- [115]Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519744> (accessed August 15, 2015).
- [116]Millonig G, Ganzleben I, Peccerella T, Casanovas G, Brodziak-Jarosz L, Breitkopf-Heinlein K, et al. Sustained submicromolar H₂O₂ levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Biol Chem* 2012;287:37472–82. doi:10.1074/jbc.M112.358911.
- [117]Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 1994;84:1697–702.
- [118]Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica* 2010;95:505–8. doi:10.3324/haematol.2009.013136.
- [119]Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JRR, Delga S, Mayeux P, Vaulont S, et al. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* 2012;97:827–34. doi:10.3324/haematol.2011.056119.
- [120]Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730–5. doi:10.1182/blood-2006-06-028787.
- [121]Seldin MM, Peterson JM, Byerly MS, Wei Z, Wong GW. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem* 2012;287:11968–80. doi:10.1074/jbc.M111.336834.

- [122]Seldin MM, Lei X, Tan SY, Stanson KP, Wei Z, Wong GW. Skeletal muscle-derived myonectin activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway to suppress autophagy in liver. *J Biol Chem* 2013;288:36073–82. doi:10.1074/jbc.M113.500736.
- [123]Rines AK, Ardehali H. Transition metals and mitochondrial metabolism in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2013;55:50–7. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.05.014.
- [124]Terman A, Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:888–98. doi:10.1089/ars.2012.4885.
- [125]Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* 2005;26:268–98. doi:10.1016/j.mam.2005.07.015.
- [126]Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhöfer J, Müller J, Hortmann M, Oelze M, et al. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res* 2008;80:280–9. doi:10.1093/cvr/cvn182.
- [127]Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:3289–303. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [128]Sengupta R, Holmgren A. Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:259–69. doi:10.1089/ars.2012.4716.
- [129]Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1604–16. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.04.008.
- [130]Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, et al. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1491–508. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.009.
- [131]Lill R, Dutkiewicz R, Elsässer H-P, Hausmann A, Netz DJA, Pierik AJ, et al. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:652–67. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.011.
- [132]Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 2013;82:551–75. doi:10.1146/annurev-biochem-070511-103700.
- [133]Berry EA, De Bari H, Huang L-S. Unanswered questions about the structure of cytochrome bc1 complexes. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1258–77. doi:10.1016/j.bbabbio.2013.04.006.
- [134]Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:1007–31. doi:10.1016/j.bbabbio.2007.05.008.

- [135]Michael S, Petrocine SV, Qian J, Lamarche JB, Knutson MD, Garrick MD, et al. Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum Lond Engl* 2006;5:257–67. doi:10.1080/14734220600913246.
- [136]Rochette L, Tatou E, Vergely C, Maupoil V, Bouchot O, Mossiat C, et al. Regional heterogeneity of decreased myocardial norepinephrine and increased lipid peroxidation levels in patients with end-stage failing heart secondary to dilated or ischemic cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2008;27:767–74. doi:10.1016/j.healun.2008.03.025.
- [137]Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H2181–90. doi:10.1152/ajpheart.00554.2011.
- [138]Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 2011;50:777–93. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003.
- [139]Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191–212.
- [140]Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19958214> (accessed August 15, 2015).
- [141]Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995;18:125–6.
- [142]Vergely C, Maupoil V, Clermont G, Bril A, Rochette L. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 2003;420:209–16.
- [143]Lorgis L, Zeller M, Dentan G, Sicard P, Richard C, Buffet P, et al. The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2010;213:616–21. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.018.
- [144]Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard J-C, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther* 2013;140:239–57. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.07.004.
- [145]Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651–5.
- [146]Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G, Wang BY, Ma A, Anderson B, et al. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:479–85.

- [147] Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824–33.
- [148] Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110:87–94. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x.
- [149] Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C, Demaison L, Rochette L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2214–22. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.020.
- [150] Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B, et al. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;52:278–85. doi:10.1097/FJC.0b013e3181865f28.
- [151] Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiol Bethesda Md* 2006;21:269–80. doi:10.1152/physiol.00004.2006.
- [152] Schramm A, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol* 2012;56:216–31. doi:10.1016/j.vph.2012.02.012.
- [153] Gkaliagkousi E, Ferro A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci Landmark Ed* 2011;16:1873–97.
- [154] Lorin J, Zeller M, Guillard J-C, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:101–16. doi:10.1002/mnfr.201300033.
- [155] Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard J-C, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther* 2013;140:239–57. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.07.004.
- [156] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33:829–37, 837a – 837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- [157] Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004;134:2842S – 2847S; discussion 2853S.
- [158] Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:161–7. doi:10.1016/j.coph.2013.01.006.
- [159] McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001;106:5–8.

- [160] Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;61:65–131.
- [161] Miyake M, Kakimoto Y. Synthesis and degradation of methylated proteins of mouse organs: correlation with protein synthesis and degradation. *Metabolism* 1976;25:885–96.
- [162] Baylis C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:209–20. doi:10.1038/ncpneph0143.
- [163] Davids M, van Hell AJ, Visser M, Nijveldt RJ, van Leeuwen PAM, Teerlink T. Role of the human erythrocyte in generation and storage of asymmetric dimethylarginine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H1762–70. doi:10.1152/ajpheart.01205.2011.
- [164] Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc* 2009;60:448–60. doi:10.1016/j.phrs.2009.08.002.
- [165] Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 2001;8:679–83. doi:10.1038/90387.
- [166] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet Lond Engl* 1992;339:572–5.
- [167] Antoniades C, Demosthenous M, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Vlachopoulos C, Toutouza M, et al. Role of asymmetrical dimethylarginine in inflammation-induced endothelial dysfunction in human atherosclerosis. *Hypertension* 2011;58:93–8. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168245.
- [168] Mittermayer F, Krzyzanowska K, Exner M, Mlekusch W, Amighi J, Sabeti S, et al. Asymmetric dimethylarginine predicts major adverse cardiovascular events in patients with advanced peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2536–40. doi:10.1161/01.ATV.0000242801.38419.48.
- [169] Zeller M, Korandji C, Guillard J-C, Sicard P, Vergely C, Lorgis L, et al. Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:954–60. doi:10.1161/ATVBAHA.108.162768.
- [170] Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009;30:1142–50. doi:10.1093/eurheartj/ehp061.
- [171] Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide Biol Chem Off J Nitric Oxide Soc* 1997;1:65–73. doi:10.1006/niox.1996.0106.

- [172]Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2006;21:2446–51. doi:10.1093/ndt/gfl292.
- [173]Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:275–85. doi:10.1038/nrneph.2011.31.
- [174]Lüneburg N, Lieb W, Zeller T, Chen M-H, Maas R, Carter AM, et al. Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. *Circ Cardiovasc Genet* 2014;7:864–72. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000264.
- [175]Kiechl S, Lee T, Santer P, Thompson G, Tsimikas S, Egger G, et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis* 2009;205:261–5. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.040.
- [176]Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006.
- [177]Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1991;69:1293–300.
- [178]Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;97:363–8.
- [179]Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Moreau D, Vergely C, et al. A peroxynitrite decomposition catalyst: FeTPPS confers cardioprotection during reperfusion after cardioplegic arrest in a working isolated rat heart model. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:173–80. doi:10.1111/j.1472-8206.2007.00467.x.
- [180]Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000;86:E85–90.
- [181]Buehler PW, Alayash AI. Redox biology of blood revisited: the role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1755–60. doi:10.1089/ars.2005.7.1755.
- [182]Swedberg K, Young JB, Anand IS, Cheng S, Desai AS, Diaz R, et al. Treatment of anemia with darbepoetin alfa in systolic heart failure. *N Engl J Med* 2013;368:1210–9. doi:10.1056/NEJMoa1214865.

- [183] Felker GM, Adams KF, Gattis WA, O'Connor CM. Anemia as a risk factor and therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:959–66. doi:10.1016/j.jacc.2004.05.070.
- [184] Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434–43. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.014.
- [185] McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012;33:1787–847. doi:10.1093/eurheartj/ehs104.
- [186] Santé A. La carence martiale : nouvelle cible du traitement de l'insuffisance cardiaque. *Cardiol Prat* 2015. <http://www.cardiologie-pratique.com/journal/article/0010806-la-carence-martiale-nouvelle-cible-du-traitement-de-linsuffisance-cardiaque> (accessed September 14, 2015).
- [187] Cohen-Solal A, Leclercq C, Mebazaa A, De Groote P, Damy T, Isnard R, et al. Diagnosis and treatment of iron deficiency in patients with heart failure: expert position paper from French cardiologists. *Arch Cardiovasc Dis* 2014;107:563–71. doi:10.1016/j.acvd.2014.07.049.
- [188] Jankowska EA, Malyszko J, Ardehali H, Koc-Zorawska E, Banasiak W, von Haehling S, et al. Iron status in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2013;34:827–34. doi:10.1093/eurheartj/ehs377.
- [189] Jankowska EA, Rozentryt P, Witkowska A, Nowak J, Hartmann O, Ponikowska B, et al. Iron deficiency predicts impaired exercise capacity in patients with systolic chronic heart failure. *J Card Fail* 2011;17:899–906. doi:10.1016/j.cardfail.2011.08.003.
- [190] Jankowska EA, Rozentryt P, Witkowska A, Nowak J, Hartmann O, Ponikowska B, et al. Iron deficiency: an ominous sign in patients with systolic chronic heart failure. *Eur Heart J* 2010;31:1872–80. doi:10.1093/eurheartj/ehq158.
- [191] Anker SD, Comin Colet J, Filippatos G, Willenheimer R, Dickstein K, Drexler H, et al. Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *N Engl J Med* 2009;361:2436–48. doi:10.1056/NEJMoa0908355.
- [192] Filippatos G, Farmakis D, Colet JC, Dickstein K, Lüscher TF, Willenheimer R, et al. Intravenous ferric carboxymaltose in iron-deficient chronic heart failure patients with and without anaemia: a subanalysis of the FAIR-HF trial. *Eur J Heart Fail* 2013;15:1267–76. doi:10.1093/eurjhf/hft099.

- [193]Avni T, Leibovici L, Gafter-Gvili A. Iron supplementation for the treatment of chronic heart failure and iron deficiency: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2012;14:423–9. doi:10.1093/eurjhf/hfs017.
- [194]Kapoor M, Schleinitz MD, Gemignani A, Wu W-C. Outcomes of patients with chronic heart failure and iron deficiency treated with intravenous iron: a meta-analysis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2013;13:35–44.
- [195]Ponikowski P, van Veldhuisen DJ, Comin-Colet J, Ertl G, Komajda M, Mareev V, et al. Beneficial effects of long-term intravenous iron therapy with ferric carboxymaltose in patients with symptomatic heart failure and iron deficiency†. *Eur Heart J* 2015;36:657–68. doi:10.1093/eurheartj/ehu385.
- [196]Hunnicut J, He K, Xun P. Dietary iron intake and body iron stores are associated with risk of coronary heart disease in a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Nutr* 2014;144:359–66. doi:10.3945/jn.113.185124.
- [197]Cook JD. Adaptation in iron metabolism. *Am J Clin Nutr* 1990;51:301–8.
- [198]Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Grande P, Appleyard M, Nordestgaard BG. Hereditary hemochromatosis and risk of ischemic heart disease: a prospective study and a case-control study. *Circulation* 2005;112:185–93. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.496075.
- [199]Shi Y, Zhou L, Huang LH, Lian YT, Zhang XM, Guo H, et al. Plasma ferritin levels, genetic variations in HFE gene, and coronary heart disease in Chinese: a case-control study. *Atherosclerosis* 2011;218:386–90. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.040.
- [200]Mascitelli L, Goldstein MR. Hereditary hemochromatosis, iron, hepcidin, and coronary heart disease. *Med Hypotheses* 2014;82:402–3. doi:10.1016/j.mehy.2013.12.013.
- [201]Pardo Silva MC, Njajou OT, Alizadeh BZ, Hofman A, Witteman JCM, van Duijn CM, et al. HFE gene mutations increase the risk of coronary heart disease in women. *Eur J Epidemiol* 2010;25:643–9. doi:10.1007/s10654-010-9489-6.
- [202]Demant AW, Schmiedel A, Büttner R, Lewalter T, Reichel C. Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc* 2007;96:900–3. doi:10.1007/s00392-007-0568-y.
- [203]Shizukuda Y, Tripodi DJ, Zalos G, Bolan CD, Yau Y-Y, Leitman SF, et al. Incidence of cardiac arrhythmias in asymptomatic hereditary hemochromatosis subjects with C282Y homozygosity. *Am J Cardiol* 2012;109:856–60. doi:10.1016/j.amjcard.2011.11.011.
- [204]Detterich J, Noetzli L, Dorey F, Bar-Cohen Y, Harmatz P, Coates T, et al. Electrocardiographic consequences of cardiac iron overload in thalassemia major. *Am J Hematol* 2012;87:139–44. doi:10.1002/ajh.22205.

- [205]Monte I, Capodanno D, Nicolosi E, Licciardi S, Talini E, Di Bello V. Atrial and ventricular function in thalassemic patients with supra-ventricular arrhythmias. *Heart Int* 2009;4:e3. doi:10.4081/hi.2009.e3.
- [206]Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol* 1996;95:26–36.
- [207]Fabio G, Minonzio F, Delbini P, Bianchi A, Cappellini MD. Reversal of cardiac complications by deferiprone and deferoxamine combination therapy in a patient affected by a severe type of juvenile hemochromatosis (JH). *Blood* 2007;109:362–4. doi:10.1182/blood-2006-04-016949.
- [208]Gaggin HK, Dec GW. The Role of Treatment for Anemia as a Therapeutic Target in the Management of Chronic Heart Failure: Insights After RED-HF. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2014;16:279. doi:10.1007/s11936-013-0279-9.
- [209]Ruifrok W-PT, Qian C, Silljé HHW, van Goor H, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, et al. Heart failure-associated anemia: bone marrow dysfunction and response to erythropoietin. *J Mol Med Berl Ger* 2011;89:377–87. doi:10.1007/s00109-010-0710-6.
- [210]Jackevicius CA, Fan CS, Warner A. Clinical outcomes of erythropoietin use in heart failure patients with anemia of chronic kidney disease. *J Card Fail* 2014;20:327–33. doi:10.1016/j.cardfail.2014.02.001.
- [211]Pan A, Sun Q, Bernstein AM, Schulze MB, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies. *Arch Intern Med* 2012;172:555–63. doi:10.1001/archinternmed.2011.2287.
- [212]Ascherio A, Willett WC, Rimm EB, Giovannucci EL, Stampfer MJ. Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. *Circulation* 1994;89:969–74.
- [213]Klipstein-Grobusch K, Grobbee DE, den Breeijen JH, Boeing H, Hofman A, Witteman JC. Dietary iron and risk of myocardial infarction in the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 1999;149:421–8.
- [214]Kaluza J, Larsson SC, Håkansson N, Wolk A. Heme iron intake and acute myocardial infarction: a prospective study of men. *Int J Cardiol* 2014;172:155–60. doi:10.1016/j.ijcard.2013.12.176.
- [215]Suzuki H, Toba K, Kato K, Ozawa T, Tomosugi N, Higuchi M, et al. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med* 2009;218:93–8.
- [216]Simonis G, Mueller K, Schwarz P, Wiedemann S, Adler G, Strasser RH, et al. The iron-regulatory peptide hepcidin is upregulated in the ischemic and in the remote myocardium after myocardial infarction. *Peptides* 2010;31:1786–90. doi:10.1016/j.peptides.2010.05.013.

- [217]Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95. doi:10.1056/NEJMra043430.
- [218]Collin B, Busseuil D, Zeller M, Perrin C, Barthez O, Duvillard L, et al. Increased superoxide anion production is associated with early atherosclerosis and cardiovascular dysfunctions in a rabbit model. *Mol Cell Biochem* 2007;294:225–35. doi:10.1007/s11010-006-9263-y.
- [219]Rajendran R, Minqin R, Ronald JA, Rutt BK, Halliwell B, Watt F. Does iron inhibit calcification during atherosclerosis? *Free Radic Biol Med* 2012;53:1675–9. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.014.
- [220]Minqin R, Rajendran R, Pan N, Tan BK-H, Ong W-Y, Watt F, et al. The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1206–11. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.008.
- [221]Duffy SJ, Biegelsen ES, Holbrook M, Russell JD, Gokce N, Keaney JF, et al. Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2799–804.
- [222]Minqin R, Watt F, Huat BTK, Halliwell B. Correlation of iron and zinc levels with lesion depth in newly formed atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med* 2003;34:746–52.
- [223]Dabbagh AJ, Shwaery GT, Keaney JF, Frei B. Effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2638–45.
- [224]Verga Falzacappa MV, Muckenthaler MU. Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene* 2005;364:37–44. doi:10.1016/j.gene.2005.07.020.
- [225]Lecour S, Chevet D, Maupoil V, Moisan M, Bernard C, Zahnd JP, et al. Intrarenal detection of nitric oxide using electron spin resonance spectroscopy in hypertensive lipopolysaccharide-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:9–17.
- [226]Paya D, Maupoil V, Schott C, Rochette L, Stoclet JC. Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats. *Cardiovasc Res* 1995;30:952–9.
- [227]Huang Y-H, Yang Y-L, Tiao M-M, Kuo H-C, Huang L-T, Chuang J-H. Hepcidin protects against lipopolysaccharide-induced liver injury in a mouse model of obstructive jaundice. *Peptides* 2012;35:212–7. doi:10.1016/j.peptides.2012.03.032.
- [228]Clermont G, Vergely C, Jazayeri S, Lahet J-J, Goudeau J-J, Lecour S, et al. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002;96:80–7.
- [229]Goudeau J-J, Clermont G, Guillery O, Lemaire-Ewing S, Musat A, Vernet M, et al. In high-risk patients, combination of antiinflammatory procedures during cardiopulmonary

- bypass can reduce incidences of inflammation and oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:39–45. doi:10.1097/FJC.0b013e31802c0cd0.
- [230] Dobsák P, Siegelova J, Wolf JE, Rochette L, Eicher JC, Vasku J, et al. Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegia and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol ISP* 2002;9:27.
- [231] Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des* 2006;12:2875–90.
- [232] Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 2007;148:2663–8. doi:10.1210/en.2006-1331.
- [233] Ho J, Lucy M, Krokhin O, Hayglass K, Pascoe E, Darroch G, et al. Mass spectrometry-based proteomic analysis of urine in acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a nested case-control study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2009;53:584–95. doi:10.1053/j.ajkd.2008.10.037.
- [234] Prowle JR, Ostland V, Calzavacca P, Licari E, Ligabo EV, Echeverri JE, et al. Greater increase in urinary hepcidin predicts protection from acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2012;27:595–602. doi:10.1093/ndt/gfr387.
- [235] Haase-Fielitz A, Plaß M, Kuppe H, Hetzer R, Ostland V, Westphal S, et al. Low preoperative hepcidin concentration as a risk factor for mortality after cardiac surgery: a pilot study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013;145:1380–6. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.09.003.
- [236] Anand IS. Anemia and chronic heart failure implications and treatment options. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:501–11. doi:10.1016/j.jacc.2008.04.044.
- [237] Martínez-Ruiz A, Tornel-Orsorio PL, Sánchez-Más J, Pérez-Fornieles J, Vílchez JA, Martínez-Hernández P, et al. Soluble TNF α receptor type I and hepcidin as determinants of development of anemia in the long-term follow-up of heart failure patients. *Clin Biochem* 2012;45:1455–8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.05.011.
- [238] Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, Uchino S, Neri M, Giamberardino MA, et al. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007;42:492–8. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.014.
- [239] Zeller M, Steg PG, Ravisy J, Laurent Y, Janin-Manificat L, L'Huillier I, et al. Prevalence and impact of metabolic syndrome on hospital outcomes in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2005;165:1192–8. doi:10.1001/archinte.165.10.1192.

- [240]Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1581–98. doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001.
- [241]Fox KAA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Van de Werf F, et al. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ* 2006;333:1091. doi:10.1136/bmj.38985.646481.55.
- [242]Warnick GR. Laboratory measurement of lipid and lipoprotein risk factors. *Scand J Clin Lab Investig Suppl* 1990;198:9–19.
- [243]Ivanova M, Artusi C, Boffa GM, Zaninotto M, Plebani M. HPLC determination of plasma dimethylarginines: method validation and preliminary clinical application. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2010;411:1632–6. doi:10.1016/j.cca.2010.06.001.
- [244]Molnár-Perl I. Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *J Chromatogr A* 2001;913:283–302.
- [245]Korandji C, Zeller M, Guillard J-C, Vergely C, Sicard P, Duvillard L, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2007;40:66–72. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.08.004.
- [246]Korandji C, Zeller M, Guillard JC, Collin B, Lauzier B, Sicard P, et al. Time course of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidative stress in fructose-hypertensive rats: a model related to metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2011;214:310–5. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.014.
- [247]Lorin J, Guillard J-C, Korandji C, Touzery C, Bichat F, Chagnon A, et al. High levels of asymmetric dimethylarginine are strongly associated with low HDL in patients with acute myocardial infarction. *PloS One* 2013;8:e64796. doi:10.1371/journal.pone.0064796.
- [248]Stamboul K, Lorin J, Lorgis L, Guenancia C, Beer J-C, Touzery C, et al. Atrial Fibrillation Is Associated with a Marker of Endothelial Function and Oxidative Stress in Patients with Acute Myocardial Infarction. *PloS One* 2015;10:e0131439. doi:10.1371/journal.pone.0131439.
- [249]Servillo L, Giovane A, D'Onofrio N, Casale R, Cautela D, Castaldo D, et al. Determination of homoarginine, arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in biological samples by HPLC-ESI-mass spectrometry. *Int J Mol Sci* 2013;14:20131–8. doi:10.3390/ijms141020131.
- [250]Hanai K, Babazono T, Nyumura I, Toya K, Tanaka N, Tanaka M, et al. Asymmetric dimethylarginine is closely associated with the development and progression of

- nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2009;24:1884–8. doi:10.1093/ndt/gfn716.
- [251] Zsuga J, Török J, Magyar MT, Valikovics A, Gesztelyi R, Lenkei A, et al. Dimethylarginines at the crossroad of insulin resistance and atherosclerosis. *Metabolism* 2007;56:394–9. doi:10.1016/j.metabol.2006.10.023.
- [252] Maeder MT, Khammy O, dos Remedios C, Kaye DM. Myocardial and systemic iron depletion in heart failure implications for anemia accompanying heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:474–80. doi:10.1016/j.jacc.2011.01.059.
- [253] van der Putten K, Jie KE, van den Broek D, Kraaijenhagen RJ, Laarakkers C, Swinkels DW, et al. Hepcidin-25 is a marker of the response rather than resistance to exogenous erythropoietin in chronic kidney disease/chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2010;12:943–50. doi:10.1093/eurjhf/hfq099.
- [254] Divakaran V, Mehta S, Yao D, Hassan S, Simpson S, Wiegerinck E, et al. Hepcidin in anemia of chronic heart failure. *Am J Hematol* 2011;86:107–9. doi:10.1002/ajh.21902.
- [255] Matsumoto M, Tsujino T, Lee-Kawabata M, Naito Y, Akahori H, Sakoda T, et al. Iron regulatory hormone hepcidin decreases in chronic heart failure patients with anemia. *Circ J Off J Jpn Circ Soc* 2010;74:301–6.
- [256] Jankowska EA, von Haehling S, Anker SD, Macdougall IC, Ponikowski P. Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* 2013;34:816–29. doi:10.1093/eurheartj/ehs224.
- [257] Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813–8. doi:10.1161/01.CIR.0000126823.07732.D5.
- [258] Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2039–44.
- [259] Henrohn D, Sandqvist A, Egeröd H, Hedeland M, Wernroth L, Bondesson U, et al. Changes in plasma levels of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine after a single dose of vardenafil in patients with pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* 2015. doi:10.1016/j.vph.2015.04.010.
- [260] Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4:23–8.
- [261] Hov GG, Aasarød KI, Sagen E, Åsberg A. Arginine, dimethylated arginine and homoarginine in relation to cardiovascular risk in patients with moderate chronic kidney disease. *Clin Biochem* 2015;48:646–51. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.03.012.
- [262] Anderssohn M, Schwedhelm E, Lüneburg N, Vasan RS, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular

- disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2010;7:105–18. doi:10.1177/1479164110366053.
- [263] Yuan Q, Hu C-P, Gong Z-C, Bai Y-P, Liu S-Y, Li Y-J, et al. Accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes mellitus: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 and asymmetric dimethylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;458:869–76. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.050.
- [264] Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:2709–29. doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.017.
- [265] Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1693–701. doi:10.1016/j.jacc.2005.04.066.
- [266] Verhaar MC, Westerweel PE, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart Br Card Soc* 2004;90:494–5.
- [267] Chen M-F, Xie X-M, Yang T-L, Wang Y-J, Zhang X-H, Luo B-L, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *J Vasc Res* 2007;44:391–402. doi:10.1159/000103284.
- [268] Chen X-M, Xia J, Zhou T, Yuan Q, Zhang W-F, Hu C-P, et al. Involvement of DDAH/ADMA pathway in the pathogenesis of rheumatoid arthritis in rats. *Int Immunopharmacol* 2013;16:322–31. doi:10.1016/j.intimp.2013.04.009.
- [269] Toblli JE, Cao G, Rivas C, Kulaksiz H. Heart and iron deficiency anaemia in rats with renal insufficiency: the role of hepcidin. *Nephrol Carlton Vic* 2008;13:636–45. doi:10.1111/j.1440-1797.2008.01019.x.
- [270] Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24–38. doi:10.1016/j.cell.2010.06.028.
- [271] Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009;122:78–86. doi:10.1159/000243791.
- [272] Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2009;113:5277–86. doi:10.1182/blood-2008-12-195651.
- [273] Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011;117:4425–33. doi:10.1182/blood-2011-01-258467.
- [274] Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:682–93. doi:10.1016/j.bbagen.2008.08.006.

- [275]Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2010;55:726–41. doi:10.1053/j.ajkd.2009.12.030.
- [276]Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, et al. Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood* 2011;118:736–46. doi:10.1182/blood-2011-02-337212.
- [277]De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest* 2010;120:2395–405. doi:10.1172/JCI42011.
- [278]Florian A, Ludwig A, Rösch S, Yildiz H, Klumpp S, Sechtem U, et al. Positive effect of intravenous iron-oxide administration on left ventricular remodelling in patients with acute ST-elevation myocardial infarction - a cardiovascular magnetic resonance (CMR) study. *Int J Cardiol* 2014;173:184–9. doi:10.1016/j.ijcard.2014.02.016.
- [279]Frøbert O, Hjortshøj SP, Simonsen U, Ravkilde J. Methylated arginines in stable and acute patients with coronary artery disease before and after percutaneous revascularization. *Int J Cardiol* 2008;129:288–91. doi:10.1016/j.ijcard.2007.04.152.
- [280]Ajtay Z, Németh A, Sulyok E, Cziráki A, Szabados S, Martens-Lobenhoffer J, et al. Effects of stent implementation on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with or without ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Int J Mol Med* 2010;25:617–24.

Annexes

I. Publications scientifiques

Soumis à *Archives of Cardiovascular Diseases*.

Aurélie Gudjoncik, Marianne Zeller, Julie Lorin, Eve Rigal, Yves Cottin, Catherine Vergely, Luc Rochette.

Dimethylarginines, blood glucose, and C-reactive protein in patients with acute myocardial infarction.

Rochette L, **Gudjoncik A**, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C.

The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target? *Pharmacol Ther.* 2015 Feb;146:35-52.

Aurélie Gudjoncik, Charles Guenancia, Marianne Zeller, Yves Cottin, Catherine Vergely, Luc Rochette.

Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Aug;58(8):1721-38.

Aurélien Vaillant, Gilles Dentan, Yves Laurent, **Aurélie Gudjoncik**, Jean-Claude Beer, Frédéric Germin, Élodie Boch, Jean-Marie Casillas, Philippe Brunel, Claude Touzery, Yves Cottin, Marianne Zeller, Gilles Morel, pour le réseau de prise en charge et de prévention des infarctus du myocarde de Côte-d'Or (RPC-PIM).

The Log book for the secondary prevention of coronary artery disease: A pilot study. *Presse Med.* 2015; 44: e301–e309.

Chagué F, Guenancia C, **Gudjoncik A**, Moreau D, Cottin Y, Zeller M.

Smokeless tobacco, sport and the heart. *Arch Cardiovasc Dis.* 2015 Jan;108(1):75-83.

Humbert O, Stamboul K, **Gudjoncik A**, Kanoun S, Richard C, Cochet A, Cottin Y.

Dual Diagnostic Role of 123I-MIBG Scintigraphy in Inverted-Takotsubo Pattern Cardiomyopathy. *Clin Nucl Med.* 2015 Oct;40(10):816-8. doi: 10.1097/RLU.0000000000000864.

Guenancia C, Stamboul K, Hachet O, Yameogo V, Garnier F, **Gudjoncik A**, Cottin Y, Lorgis L.

Clinical effectiveness of the systematic use of the GRACE scoring system (in addition to clinical assessment) for ischaemic outcomes and bleeding complications in the

management of NSTEMI compared with clinical assessment alone: a prospective study. *Heart Vessels*. 2015 Jun 6. [Epub ahead of print]

Stamboul K, Zeller M, Fauchier L, **Gudjoncik A**, Buffet P, Garnier F, Guenancia C, Lorgis L, Beer JC, Touzery C, Cottin Y.

Prognosis of silent atrial fibrillation after acute myocardial infarction at 1-year follow-up. *Heart*. 2015 Jun;101(11):864-9. doi: 10.1136/heartjnl-2014-307253. Epub 2015 Apr 22.

Rochette L, Guenancia C, **Gudjoncik A**, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. **Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms.** *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Jun;36(6):326-48. doi: 10.1016/j.tips.2015.03.005. Epub 2015 Apr 17. Review.

Hachet O, Guenancia C, Stamboul K, Daubail B, Richard C, Béjot Y, Yameogo V, **Gudjoncik A**, Cottin Y, Giroud M, Lorgis L.

Frequency and predictors of stroke after acute myocardial infarction: specific aspects of in-hospital and postdischarge events. *Stroke*. 2014 Dec;45(12):3514-20.

Stamboul K, Zeller M, Fauchier L, **Gudjoncik A**, Buffet P, Garnier F, Guenancia C, Lorgis L, Beer JC, Touzery C, Cottin Y.

Incidence and prognostic significance of silent atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014 Jul 1;174(3):611-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.158. Epub 2014 Apr 22.

Lorgis L, Cochet A, Chevallier O, Angue M, **Gudjoncik A**, Lalande A, Zeller M, Buffet P, Brunotte F, Cottin Y.

Relationship between fragmented QRS and no-reflow, infarct size, and peri-infarct zone assessed using cardiac magnetic resonance in patients with myocardial infarction. *Can J Cardiol*. 2014 Feb;30(2):204-10. doi: 10.1016/j.cjca.2013.11.026. Epub 2013 Dec 4.

Lorgis L, Jourda F, Hachet O, Zeller M, **Gudjoncik A**, Dentan G, Stamboul K, Guenancia C, Mock L, Cottin Y; RICO Survey Working Group.

Prognostic value of fragmented QRS on a 12-lead ECG in patients with acute myocardial infarction. *Heart Lung*. 2013 Sep-Oct;42(5):326-31. doi: 10.1016/j.hrtlng.2013.05.005. Epub 2013 Jul 11.

Lorgis L, Cottenet J, Molins G, Benzenine E, Zeller M, Aube H, Touzery C, Hamblin J, **Gudjoncik A**, Cottin Y, Quantin C.

Outcomes after acute myocardial infarction in HIV-infected patients: analysis of data from a French nationwide hospital medical information database. *Circulation*. 2013 Apr 30;127(17):1767-74.

Lorgis L, **Gudjoncik A**, Richard C, Mock L, Buffet P, Brunel P, Janin-Manificat L, Beer JC, Brunet D, Touzery C, Rochette L, Cottin Y, Zeller M.

Pre-infarction angina and outcomes in non-ST-segment elevation myocardial infarction: data from the RICO survey. *PLoS One*. 2012;7(12):e48513.

Bogé A, Lorgis L, Dautriche A, Bonnet M, **Gudjoncik A**, Buffet P, L'Huillier I, Zeller M, Sgro C, Cottin Y.

Severe iatrogenic admissions in a coronary care unit: a prospective study on 7244 patients. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 2013 Apr;62(2):75-81.

Lorgis L, Richard C, **Gudjoncik A**, Zeller M, Buffet P, L'Huillier I, Cottin Y.

Angiotensin converting enzyme inhibitor and calcium antagonist combination. Which place in patients with a stable coronary artery disease? *Thérapie*. 2011 Jan-Feb;66(1):17-24.

Lorgis L, Richard C, Zeller M, **Gudjoncik A**, Buffet P, L'Huillier I, Cottin Y.

Antiplatelet agents in acute coronary syndromes. Data from the main clinical trials. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 2010 Dec;59 Suppl 2:S47-55.

II. Communications orales

Aurélié Gudjoncik, Sophie Richet, A. Derrou, Joelle Hamblin, J. Ravisy, P. Buffet, L. Mock, P. Brunel, D. Brunet, Marianne Zeller, Y. Cottin.

SYNTAX score is associated with in-hospital mortality as assessed by GRACE risk score in patients with acute myocardial infarction. 24^{èmes} Journées de la Société Française de Cardiologie, Paris, janvier 2014.

Aurélié Gudjoncik, L. Lorgis, L. Mock, Carole Richard, P. Buffet, L. Janin-Manificat, J.-C. Beer, L. Rochette, Y. Cottin, Marianne Zeller.

Pre-infarction angina and cardiovascular complications in non ST segment elevation myocardial infarction: Data from the RICO survey. 20^{èmes} Journées de la Société Française de Cardiologie, Paris, janvier 2010.

III. Communications affichées

A Gudjoncik, F Chague, C Richard, F Compagnon, V Humeau, O Ganansia, Y Cottin.

Multi-stage ultra-long duration exercise ; little impact on the right ventricular contractility indexes. Paris-Echo 2015, Paris, mai 2015.

F Chague, **A Gudjoncik**, C Richard, F Compagnon, V Humeau, O Ganansia, Y Cottin.

Impact of a multi-stage ultra-long duration exercise on left ventricular contractility indexes : an echocardiographic study using multi-layer speckle-tracking imaging. Europrevent 2015, Lisbonne, mai 2015.

C. Guenancia, T. Leclercq, K. Stamboul, Carole Richard, **Aurélié Gudjoncik**, P. Buffet, Y. Cottin, L. Lorgis.

Clinical effectiveness of the systematic use of the GRACE scoring system for ischaemic outcomes and bleeding complications in the management of NSTEMI. 25^{èmes} Journées de la Société Française de Cardiologie, Paris, janvier 2015.

T. Leclercq, C. Guenancia, C. Richard, **A. Gudjoncik**, A. Cochet, L. Lorgis, F. Brunotte, Y. Cottin.

Is "Residual" SYNTAX score associated with myocardial ischemia assessed by gSPECT at 6 months after acute myocardial infarction? 25^{èmes} Journées de la Société Française de Cardiologie, Paris, janvier 2015.

Stamboul K, Fernandez V, **Gudjoncik A**, Lorgis L, Beer JC, Touzery C, Zeller M, Cottin Y.

Left atrial echographic parameters predict silent atrial fibrillation after myocardial infarction. 24^{es} Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris, Janvier 2014.

Abdelghani D, Richet S, **Gudjoncik A**, Richard C, Lorgis L, Buffet P, Maza M, Touzery C, Zeller M, Cottin Y.

SYNTAX score in diabetic patients in the acute phase of myocardial infarction. *European Society of Cardiology Congress, Barcelone, septembre 2014.*

Stamboul K., **Gudjoncik A.**, Lorgis L., Beer J.C., Touzery C., Zeller M., Cottin Y. **Association between silent atrial fibrillation and heart failure after acute myocardial infarction.** *Amsterdam, ESC Congress 2013.*

Stamboul K., **Gudjoncik A.**, Lorgis L., Beer J.C., Touzery C., Zeller M., Cottin Y. **Silent atrial fibrillation during the acute phase of myocardial infarction.** *Amsterdam, ESC Congress 2013.*

Stamboul K, **Gudjoncik A**, Lorgis L, Beer JC, Touzery C, Zeller M, Cottin Y. **Improved screening for silent AF during the acute phase of myocardial infarction.** *XXIII^{es} Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris, Janvier 2013.*

Stamboul K, **Gudjoncik A**, Lorgis L, Touzery C, Beer JC, Zeller M, Cottin Y. **Association between silent Atrial Fibrillation and heart failure after Acute Myocardial infarction.** *XXIII^{es} Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris, Janvier 2013.*

Stamboul K, **Gudjoncik A**, Lorgis L, Beer J-C, Touzery C, Zeller M, Cottin Y: **Left atrial parameters assessed by echography as predictors of silent AF episodes during the acute phase of myocardial infarction.** *G.R.R.C., Printemps de la Cardiologie. Marseille.*

Stamboul K, Fernandez V, Ez Zemmam C, **Gudjoncik A**, Lorgis L, Beer JC, Touzery C, Zeller M, Cottin Y.

Only one kind of Atrial Fibrillation during the acute phase of myocardial infarction ? *Printemps de la Cardiologie, Société Française de Cardiologie, Bordeaux, avril 2012.*

A. Gudjoncik, L. Lorgis, P. Brunel, C. Richard, I. L'Huillier, D. Brunet, P. Buffet, J. Ravisy, L. Rochette, M. Zeller, Y. Cottin.

Impact of admission hyperglycemia on one-year mortality in non-diabetic patients admitted for rescue PCI: Data from the obseRvatoire des Infarctus de Côte d'Or survey. *Congrès Francophone de Cardiologie Interventionnelle, Paris, octobre 2012.*

E. Milojevitch, L. Lorgis, N. Falvo, **A. Gudjoncik**, C. Richard, P. Buffet, L. Boidron, G. Dentan, C. Avena, J-C Beer, K. Boudenia, M. Freysz, M. Zeller, Y. Cottin.

Temporal Trends in Pre-Hospital Management of ST Elevation Myocardial Infarction from 2002 to 2010: Data from the RICO Survey. *Congrès Francophone de Cardiologie Interventionnelle, Paris, octobre 2012.*

L. Lorgis, J. Cottenet, **A. Gudjoncik**, C. Richard, E. Benzenine, H. Aube, C. Touzery, J. Hamblin, M. Zeller, C. Quantin, Y. Cottin.

Renal failure is a major non-infectious co-morbidity in HIV-infected patients presenting with ST-segment elevation myocardial infarction: Analysis from a French nationwide hospital medical information database. *Congrès Francophone de Cardiologie Interventionnelle, Paris, octobre 2012.*

Abstract

Myocardial infarction (MI) is mostly caused by complications of atherosclerosis, whose the development would be initiated by a dysfunction of the vascular endothelium, characterized by an inflammatory condition and oxidative stress.

In this pathogenesis, iron interacts at different levels and also has a major role in the development of endothelial dysfunction. Its critical role appears in oxidative stress via its redox capacity. In recent years, it appeared that hormones, hepcidin and erythroferrone (discovered earlier as the myonectin/CTRP 15) participate in a major way in regulating certain stages of iron metabolism.

Asymmetric dimethylarginine (ADMA), a marker of endothelial dysfunction is associated with most cardiovascular risk factors. Symmetrical dimethyl-arginine (SDMA), its stereoisomer, has an exclusively renal elimination and is considered as a powerful renal function marker.

We aimed to study, in patients with acute MI, the meaning of the "traditional" status iron parameters, two proteins involved in the regulation of iron, hepcidin and myonectin, as well as the two L-arginine derivatives, ADMA and SDMA.

In our first prospective study, we observe that, in patients with acute MI, the values of SDMA, and only weakly ADMA, are associated with admission blood glucose, beyond traditional dimethylarginine determinants and may therefore have biological activity beyond renal function.

Our second work suggests that patients with heart failure in the acute phase of MI present more frequently anemia and a certain degree of iron deficiency. New iron metabolism regulators biomarkers, hepcidin and myonectin showed a trend toward an increase in the serum levels in these patients characterized by an increase in CRP.

Thus, our work suggests the links between these new regulators of iron metabolism in acute MI with functional consequences of cardiovascular diseases, particularly in terms of anemia and heart failure.

Keywords: asymmetric dimethylarginine (ADMA) - symmetric dimethylarginine (SDMA) – glucose – acute myocardial infarction – iron – hepcidin – erythroferrone

Résumé

L'infarctus du myocarde (IDM) résulte des complications de l'athérosclérose, dont le développement serait initié par un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire, s'accompagnant d'un état de stress oxydant.

Le fer interagirait dans cette pathogenèse à différents niveaux et aurait également un rôle majeur dans la survenue de la dysfonction endothéliale. L'hepcidine et l'érythroferrone (découverte auparavant sous le nom de myonectine / CTRP 15), participeraient à la régulation de certaines étapes du métabolisme du fer.

La diméthyl-arginine asymétrique (ADMA), marqueur de dysfonction endothéliale, est associée à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire. Son stéréo-isomère, la diméthyl-arginine symétrique (SDMA), a une élimination exclusivement rénale et est considéré comme un puissant marqueur de fonction rénale.

Nous nous sommes proposés d'étudier, chez des patients en phase aiguë d'IDM, la signification des paramètres « traditionnels » du statut du fer, des deux protéines impliquées dans la régulation du fer, l'hepcidine et la myonectine, ainsi que des deux dérivés méthylés de la L-arginine, l'ADMA et la SDMA.

Dans notre première étude prospective, nous observons que les valeurs de SDMA, et dans une moindre mesure celles d'ADMA, sont associées à la glycémie d'admission et pourraient donc exercer des actions biologiques indépendantes de la fonction rénale.

Notre second travail suggère que les patients présentant de l'insuffisance cardiaque à la phase aiguë de l'IDM sont caractérisés par une anémie et un certain degré de carence en fer. Le dosage des nouveaux biomarqueurs de la régulation du métabolisme du fer, l'hepcidine et la myonectine a montré une tendance à l'augmentation de ces taux sériques chez ces patients en lien avec une augmentation de la CRP.

Ainsi nos travaux laissent entrevoir les liens qui uniraient, à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, ces nouveaux biomarqueurs régulateurs du métabolisme du fer aux conséquences fonctionnelles des pathologies cardiovasculaires, notamment en termes d'anémie et d'insuffisance cardiaque.

Mots clefs : diméthyl-arginine asymétrique (ADMA) - diméthyl-arginine symétrique (SDMA) - glycémie - phase aiguë infarctus du myocarde - fer - hepcidine - érythroferrone