



Mise au point d'une méthode de dosage de l'hepcidine par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse en tandem : participation à une comparaison interlaboratoire

Benoit Rucheton

► To cite this version:

Benoit Rucheton. Mise au point d'une méthode de dosage de l'hepcidine par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse en tandem : participation à une comparaison interlaboratoire. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01203763

HAL Id: dumas-01203763

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01203763>

Submitted on 23 Sep 2015

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

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

Université de Bordeaux
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 2015

Thèse n°

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE
(Décret 90-810 du 10 septembre 1990)
Tenant lieu de
Thèse pour l'obtention du DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement
Le 6 Juillet 2015 à Bordeaux
Par Monsieur Benoit RUCHETON
Né le 31 mars 1987 à Saint Michel (16)

Titre

**« Mise au point d'une méthode de dosage de l'hepcidine
par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de
masse en tandem. Participation à une comparaison inter-
laboratoire ».**

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Hubert DE VERNEUIL, PU-PH

Membres du jury

Madame le Professeur Pascale DUFOURCQ, PU
Monsieur le Professeur Victor DE LEDINGHEN, PU-PH
Madame le Docteur Cécile GED, MCU-PH
Madame le Docteur Julie BROSSAUD, Praticien attaché

Présidente

Remerciements

A ma présidente de thèse,

Madame le Professeur Pascale DUFOURCQ, Professeur universitaire à la faculté de pharmacie de Bordeaux

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect ainsi que ma reconnaissance.

Sincères remerciements.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Hubert DE VERNEUIL, Professeur universitaire à la faculté de médecine de Bordeaux, Praticien hospitalier et Chef du service de Biochimie du CHU de Bordeaux.

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse et de la juger.

Je vous remercie pour votre disponibilité, le partage de vos connaissances, vos encouragements et votre encadrement tout au long de mon internat.

Merci également pour toutes les connaissances apportées durant mon internat.

Je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Victor DE LEDINGHEN, Professeur universitaire à la faculté de médecine de Bordeaux, Praticien hospitalier et Chef du service Hépatogastro-Entérologique et Oncologique digestive du CHU de Bordeaux

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré de l'honneur que vous me faites.

Veillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Cécile GED, Maître de Conférences à la faculté de médecine de Bordeaux, Praticien hospitalier au sein du service de Biochimie du CHU de Bordeaux.

Merci pour toutes vos réponses à mes questions, vos conseils avisés et votre disponibilité.

Veillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Madame le Docteur Julie BROSSAUD, Praticien attaché au sein du service de Médecine Nucléaire –Hormonologie du CHU de Bordeaux.

Vous avez accepté, avec intérêt, de juger ce travail.

Avec toute ma gratitude.

Je remercie également,

Monsieur DUCINT Dominique, Ingénieur hospitalier au sein du Plateau technique de mesures physiques du CHU de Bordeaux.

Un grand merci pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées et du temps que vous avez consacré à m'aider et à m'encadrer lors de ce travail. Vous m'avez transmis votre intérêt pour la spectrométrie de masse et je vous en suis très reconnaissant.

Madame le docteur CASTAING Nadège,

Merci pour m'avoir aidé à l'élaboration de cette thèse, pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour tous tes conseils précieux même s'ils ne l'étaient pas selon toi.

Evelyne, Laurent et Camille,

Je tiens à vous remercier d'avoir partagé avec moi vos automates vos services et vos conseils durant ces six mois où vous avez su me remotiver lors de mes quelques découragements.

Au Laboratoire de pharmacologie de l'hôpital Pellegrin, Dr TITIER, Marine ROUSSET et tous les techniciens,

Merci de m'avoir accueilli dans vos locaux, de m'avoir permis de réaliser mes techniques et dosages , tout en m'apportant de nombreux conseils.

Aux biologistes du service de Biochimie de l'hôpital Pellegrin, Annie, Aurélie, Brigitte, Isabelle, Emmanuel, François, Jean-Marc et Samir,

Je vous adresse mes sincères remerciements pour votre soutien, vos conseils ainsi que pour toutes les connaissances que vous avez su me transmettre et que j'espère, vous me transmettez à l'avenir.

Madame le docteur ROPERT Martine et Monsieur le docteur LEFEBVRE Thibaud,

Je tiens à vous remercier pour vos réponses, votre aide pour la conception de ce travail.

Aux différents biologistes rencontrés durant mon internat, Pr MOREAU et tous les biologistes d'immunologie, Mme DURIEU, Valérie, Mr FIALON, Sylvie

Merci de m'avoir transmis rigueur et curiosité.

A tous les techniciens, et plus particulièrement Joëlle, Victoria, Angélique, Maryse, Marie-Jo, Cathy, Florian, Pascale, Marie-Claude, Béatrice, Karine, Carole, David, Charlène pour tous les bons moments passés à vos cotés que ce soit en garde ou en pause café.

Mes amis

Agnès, Stéphane, Alice, Julien, Nicolas, Pauline, Magali, Laurent, Arnaud, Sébastien

Merci de votre amitié, de votre aide et votre soutien que ce soit avant ou pendant l'internat.

Mes Co-internes,

Anne-sophie et Jessika pour tous les semestres passés en votre compagnie.

Sarah, Camille P, Pierre-Elian, Marine pour m'avoir servi de cobayes comme patients témoins.

Anne pour m'avoir aidé pour ces remerciements

Ainsi que tous ceux qui ont réussi à supporter ma présence durant leur stage ou pendant les repas à l'internat.

Mes sœurs,

Anne et Hélène, merci d'avoir toujours cru en moi. Merci de votre patience et de votre soutien.

Avec toute l'affection que je vous porte.

Mes parents et ma famille

Votre présence, votre compréhension, vos encouragements et vos sacrifices m'ont toujours permis de réaliser ce que je souhaitais. Merci de nous avoir transmis votre fibre scientifique et votre énergie.

Avec tout mon amour.

Sommaire

Listes des figures et des tableaux	10
Liste des abréviations	12
Introduction	14
Partie I : Rôle de l'hepcidine dans le métabolisme du fer	15
1-Métabolisme du fer	15
1-1-Distribution.....	15
1-2- Besoins en fer	16
1-3 - Absorption.....	16
1-4-Transport	17
1-5- Captation	18
1-6- Stockage.....	19
1-7- Utilisation du fer dans l'érythropoïèse.....	19
1-8- Recyclage du fer par les macrophages	20
1-9- Régulation	20
1-9-1 Régulation post –transcriptionnelle par le fer	20
1-9-2-Régulation transcriptionnelle de la ferroportine par l'hème	22
1-9-3-Régulation transcriptionnelle des gènes de la ferritine	22
1-9-4 Régulation par l'hepcidine et HFE	22
2- Hpcidine	23
2-1 Structure et synthèse	23
2-1-1 Structure	23
2-1-2 Synthèse	24
2-2 Métabolisme	24
2-3 Action	25
2-4 Régulation	25
2-4-1 Régulation par le fer	25
2-4-1-1 la voie hémojuvélène/BMP/SMAD	26
2-4-1-1-1 Les BMP	26
2-4-1-1-2 Hémojuvélène	26
2-4-1-1-3 Tmprss 6	27
2-4-1 -2 La voie HFE/TrF1/TrF2	28
2-4-2 Régulation par l'inflammation	28
2-4-3 Régulation par l'érythropoïèse	29
2-4-4 Régulation par l'hypoxie	30
2-5 Pathologies humaines impliquant l'hepcidine.....	30
2-5-1 Surcharges en fer	31
2-5-1-1 Surcharge primaire	31
2-5-1-1-1 Hémochromatose de type 1	32
2-5-1-1-2 Hémochromatose de type 3	33
2-5-1-1-3 Hémochromatose de type 2 : juvénile	33
2-5-1-1-3-1 Hémochromatose de type 2a	34
2-5-1-1-3-2 Hémochromatose de type 2b	34

2-5-1-1-4 Hémochromatose de type 4 et maladie de la ferroportine	35
2-5-1-1-4-1 Maladie de la ferroportine	35
2-5-1-1-4-2 Hémochromatose de type 4B	36
2-5-1-2 Surcharges secondaires.....	36
2-5-1-2-1 Maladies hépatiques chroniques	36
2-5-1-2-2 Erythropoïèse inefficace	36
2-5-1-2-2-1 Anémies sidéroblastiques	37
2-5-1-2-2-2 Thalassémies	37
2-5-1-2-3 Transfusions répétées.....	38
2-5-2 Carences en fer	38
2-5-2-1 Anémie par carence martiale	38
2-5-2-2 Anémies inflammatoires	39
2-5-2-3 Anémie de l'insuffisance rénale	40
2-5-2-4 IRIDA	40
2-6 Hepcidine : cible thérapeutique	41
2-7 Différentes méthodes pour le dosage de l'hepcidine	42
2-7-1 Tests immunologiques	42
2-7-1-1 Méthode RIA.....	42
2-7-1-2 Méthode ELISA.....	43
2-7-2 Spectrométrie de masse	44
2-8 Variations des taux d'hepcidine	44
2-8-1 Variabilités inter-individuelle	45
2-8-2 Variabilités intra-individuelle	45
2-8-3 Conditions de prélèvements	46
2-9 Valeurs de référence	46
 Partie 2 : Analyse des peptides par de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide	47
1-Chromatographie	47
1-1-Principe.....	47
1-1-1 Les différents types de chromatographie liquide	47
1-1-2 Appareillage	48
1-2- Applications de la chromatographie à l'analyse	50
1-2-1 Le chromatogramme	50
1-2-2 Aspect qualitatif.....	50
1-2-3 Aspect quantitatif.....	50
1-2-4 Etalon interne	50
1-3 - UPLC	51
2-Spectrométrie de masse.....	52
2-1- Spectre de masse	52
2-2-Principe.....	52
2-2-1 Source d'ionisation.....	53
2-2-2 Analyseurs.....	53
2-2-3 Détecteurs	54
2-3 Spectrométrie de masse en tandem	54
2-3-1 Filtre quadripolaire.....	54

2-3-2 Spectromètre de masse en tandem	55
2-4 Technique Maldi-TOF	56
3-Analyse des peptides en spectrométrie de masse	56
3-1 Ions parents	57
3-2 Fragmentation	57
4-Spécificité de l'analyse des peptides en chromatographie	58
 Partie 3 : Mise au point du dosage de l'hepcidine	 59
1-Objectifs	59
2-Matériels et méthodes	59
2-1- Solutions mères	59
2-2-Préparations des échantillons	59
2-2-1 Essais de mise au point	59
2-2-2 Gamme d'étalonnage pour quantification.....	60
2-2-3 Contrôles.....	60
2-2-4- Préparations des points de gamme et échantillons pour quantification	61
2-3 Appareil	61
2-3-1 Présentation de l'appareil	61
2-3-2 Rappel sur la SPE : extraction en phase solide	62
2-3-3- Chromatographie	62
2-4- Déterminations des transitions	63
2-5- Quantifications	64
2-6 Validation de la méthode	64
2-6-1 Gamme d'étalonnage	65
2-6-2 Fidélité	65
2-6-3- Limite de quantification	66
2-6-4- Contamination	67
2-6-5- Justesse	67
2-7 Participation à l'étude de la société française de biologie clinique	68
 Partie 4 : Résultats	 70
1-Mise au point du dosage	70
1-1-Choix des transitions	70
1-1-1 Ions précurseurs	70
1-1-2 Ions fils	70
1-1-2 tensions de cône et énergies de collision	71
1-2- Problèmes de spécificité survenue lors de la mise au point.....	71
2-Validation	73
2-1- Gamme d'étalonnage	73
2-2-Détermination de la limite de quantification	74
2-3 Essai de fidélité	74
2-4 Contamination	74
2-5 Valeurs normales au sein du laboratoire	75

2-6 Comparaison avec l'hôpital Louis Mourier	76
3-Résultats bruts de l'étude de comparaison des 5 laboratoires participants	78
4-Etudes approfondies des résultats	81
Discussion et conclusion	84
1- Amélioration à apporter à notre dosage.....	84
2- Amélioration à apporter à méthode de validation	86
3- Intérêt clinique de ce dosage	87
4- Conclusion.....	90
Bibliographie	92
Annexes	99
Serment	101

Listes des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1	17
Figure 2	18
Figure 3	20
Figure 4	21
Figure 5	23
Figure 6	25
Figure 7	25
Figure 8	27
Figure 9	28
Figure 10	29
Figure 11	45
Figure 12	45
Figure 13	45
Figure 14	48
Figure 15	52
Figure 16	54
Figure 17	55
Figure 18	56
Figure 19	57
Figure 20	57
Figure 21	61
Figure 22	62
Figure 23	70
Figure 24	70
Figure 25	70
Figure 26	71
Figure 27	71
Figure 28	71
Figure 29	72
Figure 30	72

Figure 31	73
Figure 32	77
Figure 33	78
Figure 34	78
Figure 35.....	81
Figure 36	81
Figure 37	82
Figure 38	82
Figure 39	88

Liste des tableaux

Tableau 1	32
Tableau 2	46
Tableau 3	60
Tableau 4	60
Tableau 5	63
Tableau 6	68
Tableau 7	70
Tableau 8	71
Tableau 9	73
Tableau 10	74
Tableau 11	77
Tableau 12	78
Tableau 13	79
Tableau 14	80
Tableau 15	82
Tableau 16	83
Tableau 17	90

Liste des abréviations

ALA	acide gamma-aminolévulinique
ALAS	acide aminolévulinique synthase
ANOVA	analysis of variance
BMP	bone morphogenetic protein
CIQ	contrôle de qualité interne
COFRAC	Comité français d'accréditation
EEQ :	évaluation externe de la qualité
EI :	étalon interne
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
HIF	hypoxia-inductible factors
HJV	hémojuvénine
HPLC	High performance liquid chromatography
IRE	Iron responsive element
IRIDA	Iron refractory iron deficiency anemia
IRP	Iron regulatory protein
LC	chromatographie liquide
LOD	limite de détection
LOQ	limite de quantification
MRM	multiple reaction monitoring
MS	spectrométrie de masse
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
RIA	radio immuno-analyse
SFBC	société française de biologie clinique
SPE	Extraction en phase solide

SS	solution stock
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

Introduction

Découverte et purifiée en 2001 à partir de prélèvements urinaires, l'hepcidine a tout d'abord été étudiée pour ses propriétés antimicrobiennes, mais très vite des recherches ont démontré que son action majeure résidait dans le fait qu'elle soit l'hormone de régulation du métabolisme du fer.

Ces avancées ont permis une meilleure compréhension des phénomènes de surcharges et de carences en cet oligoélément, ainsi que les voies de signalisation impliquées.

Depuis, de nouvelles études se sont intéressées à son utilisation en thérapeutique, son dosage plasmatique et l'intérêt de celui-ci dans diverses pathologies allant des surcharges en fer aux anémies inflammatoires.

La mise en place de ce dosage a rencontré plusieurs difficultés du fait de la faible immunogénicité de cette molécule et de sa petite taille : 25 acides aminés. Il a été montré qu'il existait une grande hétérogénéité en termes de valeurs cibles, de sensibilité et spécificité pour les différentes méthodes utilisées (ELISA, spectrométrie de masse).

C'est pourquoi, un groupe de travail sur « l'intérêt clinique du dosage de l'hepcidine » a été initié par la Société Française de Biologie Clinique dont les objectifs sont :

- comparer les différents systèmes analytiques actuellement disponibles
- définir les recommandations d'utilisation
- proposer un arbre décisionnel quant à la prescription de cette analyse.

Le CHU de Bordeaux, par l'intermédiaire du service de Biochimie du Professeur H de Verneuil, participe à ce groupe de travail. Le choix de la méthode de dosage s'est porté sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, au vu des résultats des publications existantes, du matériel et du savoir-faire présents sur le Plateau Technique de Mesures Physiques.

Après des notions générales sur l'hepcidine, ce travail aura pour but d'expliquer les étapes nécessaires à la mise en place de cette analyse et les résultats obtenus sur une cohorte de patients.

Partie 1 : Rôle de l'hepcidine dans le métabolisme du fer

1. Métabolisme du fer :

Pour comprendre le rôle important de l'hepcidine, il est nécessaire de faire un rappel sur le métabolisme du fer.

Du fait de sa capacité à accepter ou donner des électrons en fonction de son degré d'oxydation, le fer est un métal d'importance vitale pour l'homme.

C'est un oligoélément essentiel qui intervient dans différentes fonctions biologiques et est nécessaire à de multiples processus métaboliques (il est indispensable pour assurer le transport de l'oxygène, le transport d'électrons et la synthèse d'ADN). Mais c'est aussi un élément potentiellement toxique, car sous sa forme réduite Fe^{2+} libre, il est capable de catalyser la production de radicaux libres oxygénés, très réactifs et susceptibles d'altérer les structures cellulaires(1)(2). Pour cette raison, le fer n'existe pratiquement pas à l'état libre dans l'organisme mais lié à des protéines capables de le véhiculer dans les fluides biologiques ou à travers les membranes cellulaires ou encore le mettre en réserve sous une forme facilement disponible mais non toxique.

1.1. Distribution du fer :

La quantité de fer dans l'organisme est de 3 à 4 g chez l'adulte et est donc l'oligoélément le plus abondant(3). Il se répartit en plusieurs compartiments, quantitativement inégaux:

- le compartiment fonctionnel qui représente 70% du fer total, soit 2,8g. Il est constitué essentiellement par le fer de l'hémoglobine mais une faible quantité de fer (0,4g) se trouve dans la myoglobine et dans certaines enzymes cellulaires intervenant dans le métabolisme oxydatif : catalase, cytochromes, myéloperoxydase. Dans toutes ces protéines, il est lié à la molécule de porphyrine.
- Le compartiment de transport qui est quantitativement réduit et représente 0,1% du fer total, soit 4 mg. Dans le plasma, le fer est presque exclusivement lié à la transferrine (ou sidérophiline).

- le compartiment de réserve qui représente environ 1g chez l'adulte soit 25% du fer total.

1.2. Besoins en fer :

Le cycle du fer fonctionne en vase clos c'est-à-dire que le fer nécessaire à l'érythropoïèse provient de la récupération du fer de l'hémoglobine des globules rouges sénescents et phagocytés par les macrophages (moelle osseuse, foie, et rate)(3).

L'absorption digestive vise uniquement à compenser les pertes physiologiques et les éventuelles pertes excessives (saignements).

Il n'existe pas de mécanisme d'excrétion du fer et les pertes physiologiques chez l'homme sont principalement dues à la desquamation (cellules intestinales, peau, phanères), la sueur et correspond à environ 1 mg/jour(3). Chez la femme, ces pertes sont augmentées du fait des menstruations (30 mg par cycle), des grossesses et de l'allaitement (1mg/j).

Les apports alimentaires couvrent largement les besoins, mais l'organisme n'absorbe que 5 % du fer d'origine végétale et 20 % du fer animal (= lié à l'hème des viandes). Une alimentation équilibrée apporte 10 à 20 mg de fer par jour (fer ferrique). La teneur en fer varie en fonction des aliments. Les aliments les plus riches en fer sont : la viande, le foie, les épinards, les lentilles, les fruits secs, le vin. Le lait et surtout les farineux en sont relativement dépourvus, ce qui explique la fréquence des carences martiales chez le nourrisson de quelques mois, avant le passage à une alimentation diversifiée.

1.3. Absorption (fig 1)

L'absorption intestinale du fer s'effectue par des mécanismes actifs et régulés, et est localisée au niveau des entérocytes des villosités du duodénum et de la partie proximale du jéjunum.(3)

Les sécrétions intestinales, biliaires et pancréatiques facilitent cette absorption mais de nombreux facteurs peuvent l'inhiber (phosphoprotéines du jaune d'œuf, tannâtes et phytates des végétaux, carbonates, argiles et pansements digestifs, tétracyclines).

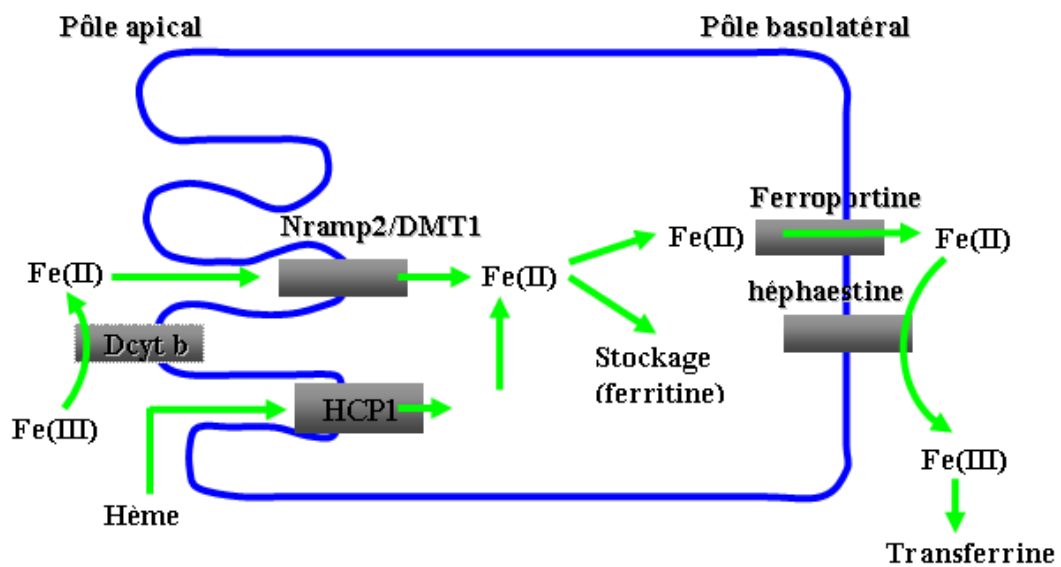


Figure 1: Mécanisme d'absorption du fer au niveau des entérocytes. L'absorption se fait soit par l'intermédiaire de l' HCP1 pour le fer héminique soit par l'intermédiaire du DMT1 après réduction par le DcytB pour le fer non héminique. Le transport transmembranaire du fer ferreux vers le plasma est assuré par la ferroportine. Il est ensuite réoxydé par l'héphaestine.

Cette absorption dépend de la nature chimique du fer :

- Le fer héminique : fer de l'hémoglobine et de la myoglobine (viandes): l'hème est capté par un transporteur membranaire spécifique (Heme carrier protein HCP1) et subit une dissociation dans l'entérocyte pour libérer le fer par une hème oxydase.(4)
- Le fer non héminique : ou végétal . Sous l'effet de l'acidité gastrique, le fer présent sous sa forme ferrique est dissocié des complexes alimentaires. Il est ensuite réduit en fer ferreux par une Cytochrome B réductase duodénale (DcytB), permettant sa prise en charge par un transporteur de cations divalents DMT1 et donc son transport vers le cytosol de l'entérocyte.(5) Il a été mis en évidence un second mécanisme qui permettrait également cette absorption de fer non héminique et qui ferait intervenir un complexe mucines-intégrines-mobilferrine.(6)

Une fois dans le cytosol, le fer ferrique est dirigé soit vers la ferritine (stockage) ou les protéines de l'entérocyte qui l'utilisent comme cofacteur, soit vers le pôle basal de celui-ci pour être transféré dans le compartiment sanguin.

Cette libération vers la circulation générale et la fixation à sa protéine de transport, la transferrine, nécessite l'intervention de plusieurs molécules :

- la ferroportine, qui assure le transport transmembranaire du fer ferreux vers le plasma. C'est une protéine transmembranaire codée par le gène SCL40A1, exprimée au pôle basal entérocytaire et à la membrane des macrophages, et responsable du transport du fer ferreux vers la circulation générale. Cette action a été prouvée in vivo par la description chez l'homme des surcharges en fer résultant d'une mutation dans le gène SCL40A1 rendant la ferroportine insensible à l'action de l'hépcidine.(7)
- l'héphaestine et la céruléoplasmine, qui réoxydent le fer en Fe^{3+} (8)

1.4. Transport

Le fer sérique est quantitativement faible et représente 0,1% du fer total, soit 4 mg(3). Il est presque exclusivement lié et transporté par la transferrine. La transferrine ou sidérophiline est une bêta-globuline, de masse moléculaire 76 kDa, synthétisée par les hépatocytes, qui possède deux sites de fixation pour le fer ferrique et dont les rôles sont :

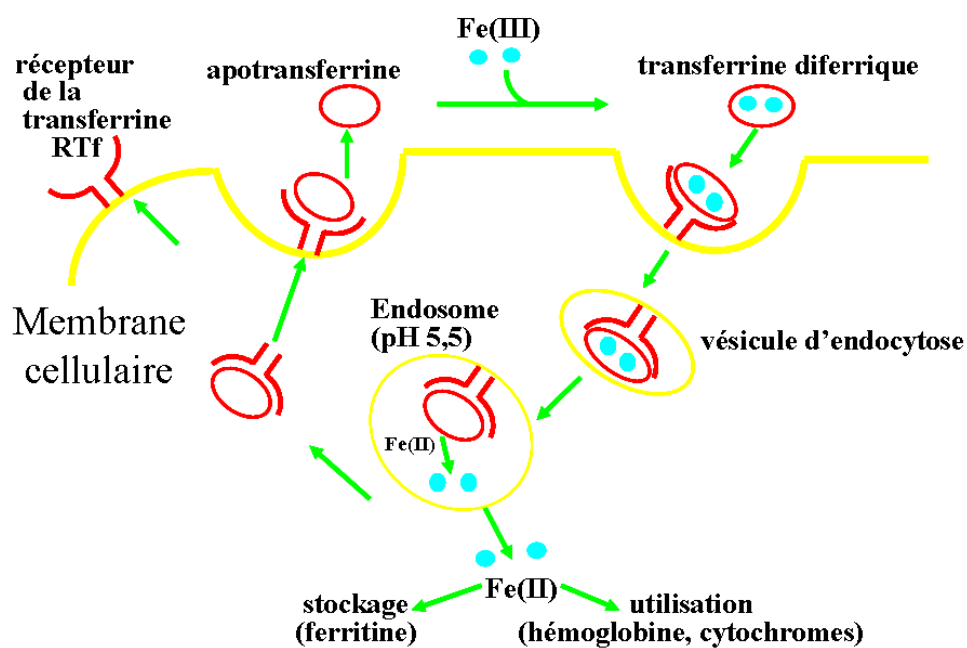


Figure 2: Cycle d'endocytose de la transferrine. Après liaison à son récepteur, le complexe transferrine-fer-récepteur est internalisé. Au niveau de l'endosome, le fer est libéré de la transferrine puis exporté vers le cytosol. L'apotransferrine et les récepteurs de la transferrine sont recyclés vers le plasma pour la première et la membrane plasmique pour le second.

- amener le fer à la moelle osseuse pour production de l'hémoglobine
- récupérer le fer produit par l'hémolyse physiologique au niveau du système réticulo-endothélial
- réguler la sortie du fer des cellules

Elle est présente dans le sérum d'un sujet normal à une concentration de 2 à 4g/L et est, à l'état physiologique, saturée à 30%. Dans le plasma on trouve également du fer au sein de complexes haptoglobine/Hb ou/et hémopexine/Hb.

1.5. Captation : (fig 2)

La transferrine di-ferrique est internalisée avec son récepteur en formant des vésicules au niveau de l'érythroblaste. Le récepteur de la transferrine (TfR : TransferrinReceptor) est un dimère situé à la surface des cellules(9). Il existe deux types de récepteurs dont le type 1 est celui impliqué dans la captation du fer :

- RTf1 codé par un gène présent sur le chromosome 3, de haute affinité et d'expression ubiquitaire mais très élevée au niveau des érythroblastes et absent au niveau des hématies.
- RTf2 codé par un gène présent sur le chromosome 7, de faible affinité et présent au niveau des hépatocytes et entérocytes du duodénum.

Les récepteurs sont concentrés dans les puits à la surface des cellules. Chaque molécule de récepteur fixe deux molécules de transferrine diferrique. Cette fixation entraîne la formation d'une vésicule d'endocytose et l'internalisation du complexe. L'acidification progressive de l'endosome permet la dissociation du fer de la transferrine. Le fer est ensuite réduit par une réductase endosomale (STEAP) et libéré dans le cytosol par DMT1(10). A pH acide l'apotransferrine reste fixée sur son récepteur et se trouve recyclée vers le plasma par fusion de l'endosome avec la membrane plasmique.

Le fer peut -être alors soit :

- aisément disponible pour être incorporé dans des protéines : compartiment de transit. C'est particulièrement le cas pour les érythroblastes, où le fer est incorporé à l'hème.

- être mis en réserve : compartiment de stockage (principalement au niveau des macrophages du foie).

1.6. Stockage

Le fer du compartiment de stockage représente environ 1g chez l'adulte soit 25% du fer total(3). Ce fer est stocké dans les cellules du système des phagocytes mononuclées (du foie, de la rate, de la moelle osseuse) et dans les hépatocytes, sous deux formes cliniquement différentes :

- La ferritine : correspond à la réserve rapidement mobilisable. C'est un complexe de 24 sous unités [qui peuvent être de 2 types : sous-unités L (liver) de 22 KDa et sous unités H (heart) de 18 KDa en proportions variables selon les cellules], qui peut contenir jusqu'à 4500 atomes de fer. Il existe en fonction des besoins (surcharge ou déplétion), un échange journalier de quelques milligrammes entre le compartiment circulant et la ferritine par système d'oxydoréduction. Sa synthèse est régulée par les stocks de fer. La ferritine est dégradée sous forme d'hémosidérine (contenant du fer non fonctionnel) par les lysosomes. Elle possède une activité fer-oxydase portée par la sous unité H ($\text{Fe}^{2+} \Rightarrow \text{Fe}^{3+}$). Bien qu'ubiquitaire, elle est localisée préférentiellement dans les macrophages du système réticulo-endothélial du foie, de la rate, de la moelle osseuse et dans les hépatocytes. Il existe aussi une forme mitochondriale Ft-mt codée par le gène localisée en 5q21.3, possédant une séquence terminale permettant son adressage à la mitochondrie. Elle interagit en permanence avec les complexes Fe-S participant à la protection contre le stress oxydant.(11)(12)
- L'hémosidérine : protéine lysosomiale correspondant à une forme dégradée de ferritine qui correspond à la forme de stockage insoluble, de mobilisation plus lente. Le taux d'hémosidérine augmente lorsque la synthèse d'apoferritine et l'incorporation du fer dans celle-ci sont maximales.(11)

1.7. Utilisation du fer dans l'érythropoïèse :

Environ 200 milliards de globules rouges sont produits chaque jour par la moelle osseuse pour compenser la destruction des hématies sénescents par les macrophages tissulaires. Les

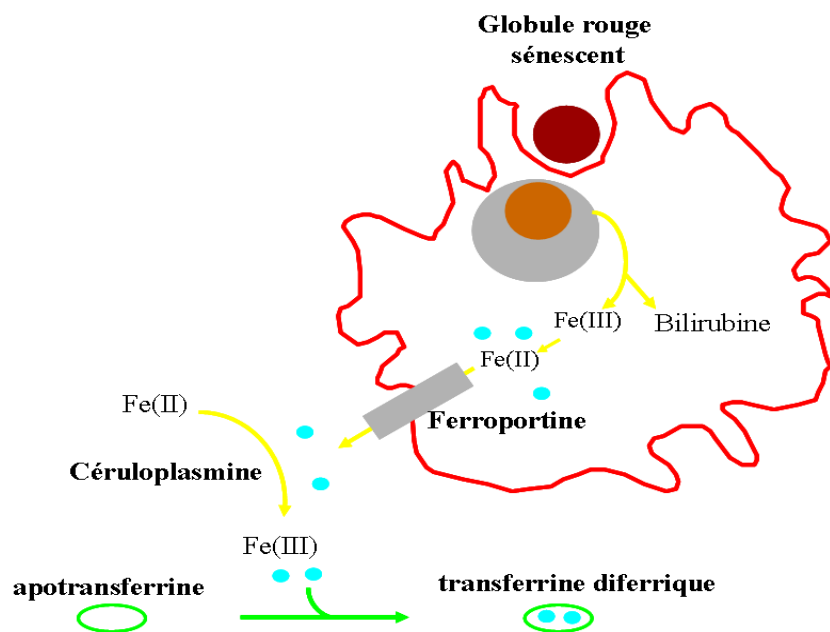


Figure 3: Recyclage du fer héminique par les macrophages: érythrophagocytose. Le globule rouge sénéscent est phagocyté par les macrophages de la rate, de la moelle et du foie. Le fer libéré par le catabolisme de l'hémoglobine est exporté hors du macrophage par la ferroportine. Il est ensuite oxydé en fer ferrique par la céruléoplasmine pour être pris en charge par la transferrine.

besoins en fer sont donc particulièrement importants au cours de l'érythropoïèse pour assurer la biosynthèse de l'hème et la formation de l'hémoglobine. Les précurseurs érythropoïétiques acquièrent le fer sous forme de complexe fer-transferrine par les RTf1 qu'ils expriment fortement(13). La majorité du fer capté par l'érythroblaste est adressée à la mitochondrie et incorporée dans la protoporphyrine IX pour former la molécule d'hème qui est ensuite exportée vers le cytosol par un transporteur de la famille des ABC-transporteurs, pour être associée aux chaînes de globines ou aux apocytochromes. En parallèle, le fer est aussi utilisé pour l'assemblage des centres Fer-Soufre impliqués dans les transports d'électrons.

1.8. Le recyclage du fer par les macrophages (fig 3)

Les globules rouges circulants ont une demi-vie d'environ 120 jours et les érythrocytes sénescents sont phagocytés par les macrophages de la rate ou moelle.

Ce processus, appelé érythrophagocytose, permet de recycler efficacement le fer héminique et assure les apports de fer nécessaires à l'érythropoïèse.

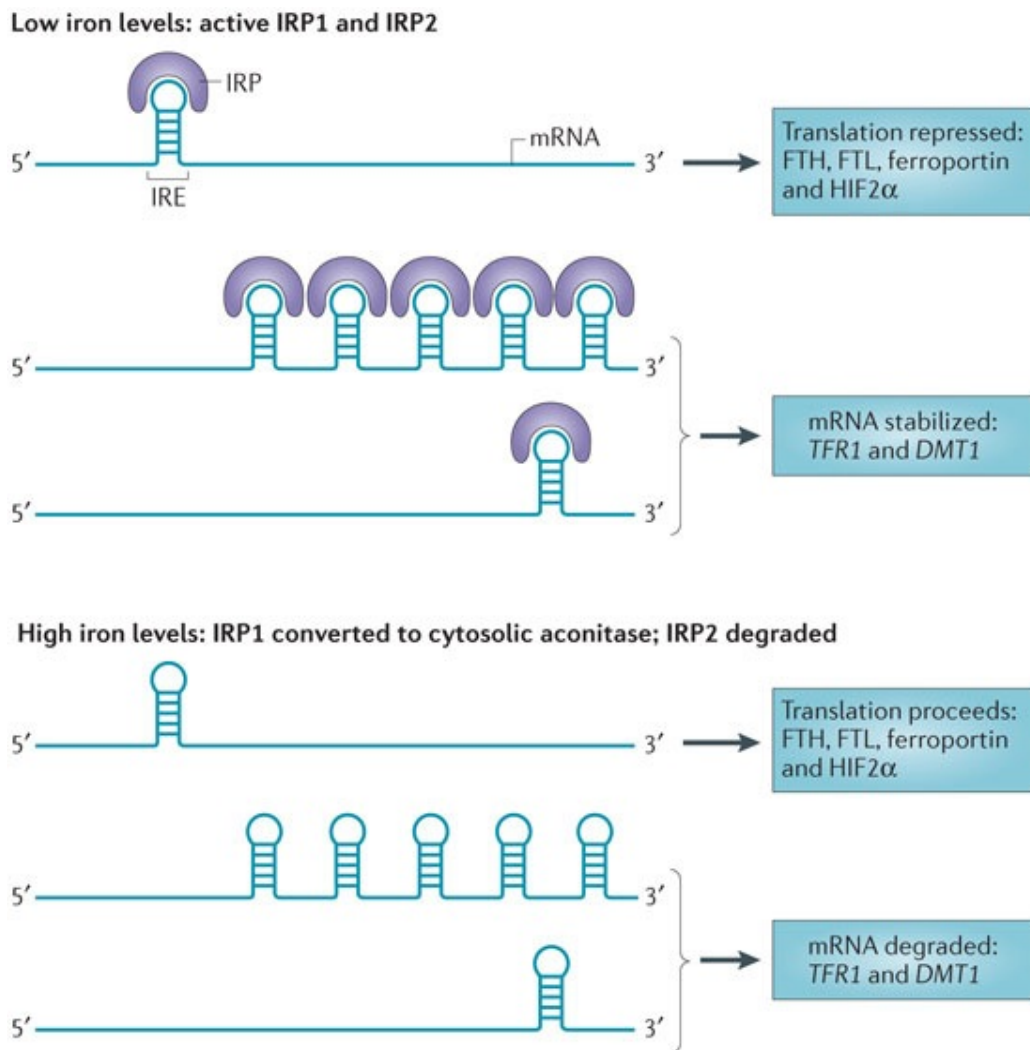
Le catabolisme intracellulaire de l'hème libère du CO₂, du fer et de la bilirubine sous l'action d'un complexe enzymatique ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique associant une réductase (STEAP), l'hème oxygénase et la biliverdine réductase(14). Le fer libéré peut être stocké sous forme de ferritine ou conduit vers le compartiment plasmatique par la ferroportine(7)(15). Le fer Fe²⁺ est oxydé par la céruléoplasmine sous forme Fe³⁺ et pris en charge par la transferrine pour être redistribué dans l'organisme et notamment au nouveau de la moelle où il est incorporé dans l'hémoglobine expliquant l'expression de « cycle fermé » utilisé pour parler du cycle du fer(16).

1.9. Régulation :

1.9.1. Régulation post-transcriptionnelle par le fer : IRE, IRP (fig 4)

Les IRE (Iron Responsive Element) sont des séquences nucléotidiques non traduites, capables d'adopter une en tige-boucle spécifique et présentes :

- En 5' sur l'ARNm de la ferritine, de la ferroportine.



Nature Reviews | Cancer

Figure 4 : Régulation post-transcriptionnelle par le fer. La fixation des IRP sur les IRE est possible lorsque le taux de fer est bas. Cette fixation réprime la traduction des ARNm si l'IRE se situe en 5'. Alors que si l'IRE se situe en 3', la traduction est favorisée par la liaison IRE/IRP.

- En 3' sur l'ARNm du RTf1 et de DMT1

Les IRP (Iron Regulatory Protein) : sont des protéines ayant la capacité de se fixer sur les IRE en absence de fer (17)

- Si IRE en 5' : L'IRP empêche le recrutement du ribosome, ce qui agit de manière négative sur la traduction
- Si IRE en 3' : la fixation de l'IRP stabilise l'ARNm en empêchant sa dégradation, ce qui agit, à l'inverse, de manière positive sur la traduction de la protéine correspondante.

Ces IRP existent sous 2 formes distinctes :

- IRP1 : En présence de fer, elle se complexe avec un cluster fer-soufre de type 4Fe-4S pour devenir l'aconitase ACO1. Si la concentration en fer dans la cellule devient insuffisante, l'aconitase se retrouve sous forme d'apoprotéine, c'est-à-dire sans cluster fer-soufre, et la protéine reprend une fonction d'IRP. Le site laissé vacant par le cluster permet la fixation d'une structure d'ARN en tige-boucle et donc la régulation traductionnelle.(17)
- IRP2 : En présence de fer, la protéine FBXL5 est stabilisée et provoque l'ubiquitination d'IRP2 et donc sa dégradation.(18)

En présence de fer, les IRP ne peuvent se fixer sur les séquences IRE, ce qui a pour conséquences:

- Une régulation positive de la traduction des ARNm codant pour la ferritine, la ferroportine et l'ALA synthase : enzyme qui catalyse la première étape de la biosynthèse de l'hème.
- Une régulation négative de l'ARNm codant pour le récepteur de la transferrine de type 1, par dégradation de cet ARNm.

Le but est d'empêcher un excès de fer libre au niveau intracellulaire toxique (formation de radicaux libres) en diminuant son entrée (action sur les RTf1), en majorant sa sortie (action sur ferroportine) en le stockant (taux de ferritine augmenté) et en l'intégrant à l'hème (action sur la ALAS).

En situation de carence en fer, les IRP ne se fixent pas sur les IRE ce qui :

- empêche la fixation du ribosome et donc la traduction des ARNm codant pour la ferritine, la ferroportine et l'ALA synthase
- limite la dégradation de l'ARNm codant pour les récepteurs de la transferrine.

Le but est de concentrer le fer libre au niveau intracellulaire en augmentant son entrée (action sur les RTf1), en diminuant sa sortie (action sur ferroportine), le stockage (taux de ferritine augmenté) et l'intégration à l'hème (action sur la ALAS).

1.9.2. Régulation transcriptionnelle de la ferroportine par l'hème

L'hème, libéré par les globules rouges sénescents, est un activateur de la transcription du gène SLC40A1. Cela passe par l'inactivation d'un répresseur transcriptionnel Bach1 permettant le recrutement de l'activateur Nrf2 qui s'associe aux petites protéines Maf.

Ce complexe Nrf2/sMAF reconnaît un élément de réponse MARE présent en amont du promoteur des gènes codant la ferroportine et l'hème oxydase.(19)

1.9.3. Régulation transcriptionnelle des gènes de la ferritine

Il existe différents gènes codant la ferritine présent sur le

- chromosome 11 q13 pour le gène FTH codant la chaîne lourde
- chromosome 19 q13.33 pour le gène FTL codant la chaîne légère
- chromosome 5 q21.3 pour le gène FTMT codant la forme mitochondriale.

Les gènes de la ferritine sont hautement régulés surtout le gène de la forme H présentant de nombreux éléments de réponse à des facteurs de transcription.(20)

1.9.4. Régulation par l'hepcidine et par HFE.

Cette partie sera abordée dans le chapitre action de l'hepcidine

2. Hepcidine :

C'est en 2000, par Krause A and al qu'elle fut la première fois mise en évidence dans de l'ultrafiltrat de plasma humain et fut nommée LEAP (liver enriched anti-microbial peptide)(21).

Par la suite, elle fut renommée en hepcidine : hep pour hépatocytes, son site de synthèse, et cidine pour ses propriétés bactéricides qui depuis ont été reléguées au second plan par la découverte de son action régulatrice sur l'homéostasie du fer.

Si l'activité bactéricide est réelle in vitro, elle se produit à des concentrations extrêmement élevées qui ne correspondent pas au taux sérique chez l'homme.

Son action hyposidérémiant a été mise en évidence par différentes études se basant sur le fait qu'il existait :

- une augmentation des transcrits d'hepcidine dans le foie des souris soumises à un régime riche en fer
- une surcharge viscérale en fer avec déficit en fer dans les macrophages de souris déficientes en hepcidine (déficit fonctionnel : souris knock out (KO) *Usp2* ou déficit génique : souris KO *Hepc1*)(22)
- une anémie ferriprive hypochromique chez des souris transgéniques surexprimant de façon constitutive et précoce de l'hepcidine(23).

2.1. Structure et Synthèse :

2.1.1. Structure (fig 5)

L'hepcidine est un petit peptide de masse moléculaire de 2789 Da, formé de 25 acides aminés dont 8 cystéines formant 4 ponts disulfures et se traduisant par une structure tertiaire très repliée(24).

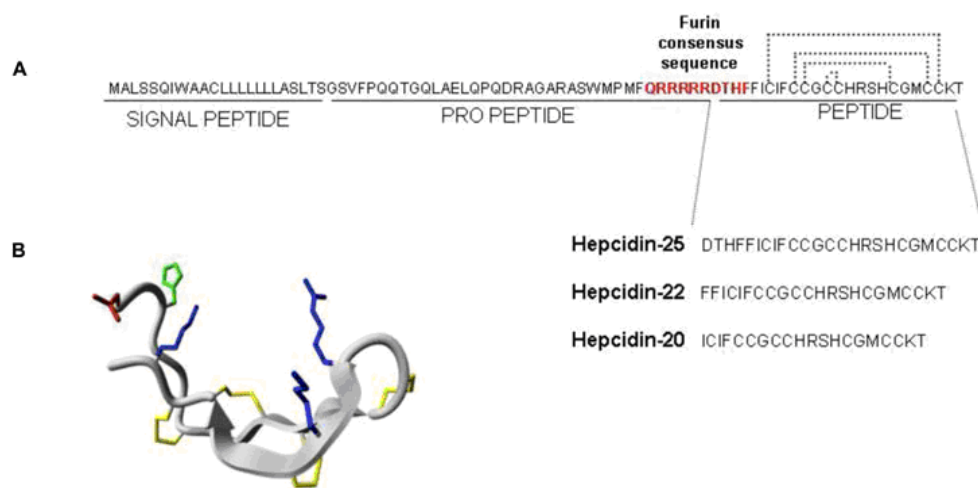


Figure 5: Structure de l'hepcidine. *A* : Représentation des structures primaires de l'hepcidine, de ces deux précurseurs pré-pro et pré hepcidine, ainsi que des 3 isoformes les plus décrites. *B* : Représentation de la structure tertiaire de l'hepcidine. L'hepcidine est représenté de couleur grise, à l'exception des résidus d'intérêt : les cystéines sont jaunes, les résidus basiques et chargés positivement (arginine et lysine) sont en bleu, l'acide aspartique résidu acide et chargé négativement est rouge.

2.1.2. Synthèse :

Chez l'homme cette protéine n'est codée que par un seul gène, le gène HAMP situé en position 19q13.1 et constitué de 3 exons.(24)

L'hepcidine est synthétisée sous la forme d'un pré-pro-peptide de 84 aa dont un peptide signal formé des 24 aa N-terminaux, correspondant à un signal d'adressage vers le réticulum endoplasmique qui par clivage donne naissance à un pro-peptide de 60 aa.(24)(25)

Celui-ci subira des clivages supplémentaires par des enzymes de la famille des furines (protéase à sérine qui catalyse le clivage d'un polypeptide au niveau typiquement d'une séquence basique) pour permettre la libération de l'hepcidine mature de 25 aa et biologiquement active contrairement aux autres isoformes (26).

En effet d'autres isoformes de cette molécule ont été détectées dans le sérum et les urines parmi lesquelles celles de 20 et 22 aa qui présenteraient une activité antimicrobienne plus importante que l'isoforme 25 mais une action sur la régulation du métabolisme du fer moindre voire nulle, tout en ne correspondant pas à un produit de dégradation de celle-ci. Elles sont présentes chez les sujets sains à des concentrations très faibles mais à des taux augmentés au cours des pathologies induisant une augmentation de la forme bioactive(26). D'autres isoformes ont récemment été décrites.(27)

2.2. Métabolisme :

L'hepcidine est synthétisée de façon prépondérante au niveau des hépatocytes mais il a été démontré qu'elle était exprimée à des taux plus faibles par d'autres organes notamment le cœur, l'estomac, les poumons, le pancréas et le rein.(25)(28)

Quelques études ont mis en évidence la présence d'ARNm hepcidine dans des macrophages activés (spléniques, pulmonaires) et dans les adipocytes mais ces sites d'expression restent à confirmer et le rôle de l'hormone dans ces tissus à déterminer.(28)

Après production, l'hormone circule principalement sous forme libre avec moins de 3% liaison avec l'albumine et l'alpha-2-microglobuline(29). Puis très rapidement en dehors de toute atteinte rénale, ce peptide semblerait être librement filtré à travers le glomérule, réabsorbé au niveau des tubules et subirait un catabolisme en intra-tubulaire comme le

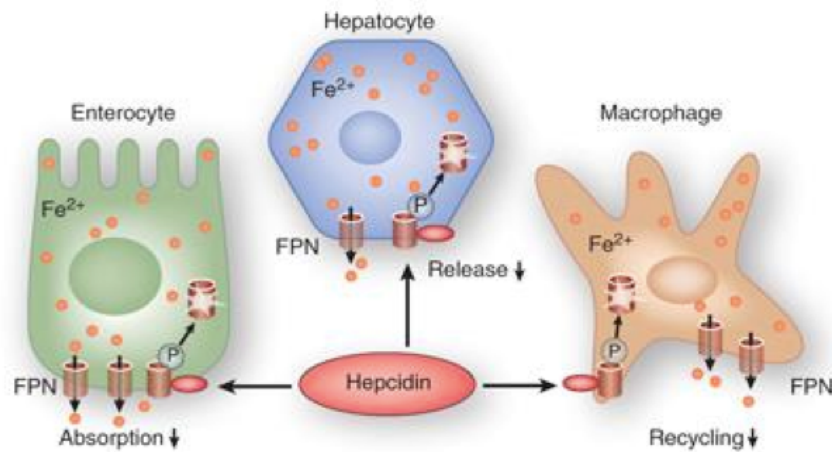


Figure 6: Mécanisme d'action de l'hepcidine d'après CUI Y and al. En se complexant avec la ferroportine, l'hepcidine est à l'origine de sa dégradation. Il en résulte une diminution de l'export du fer de l'entérocyte vers le plasma ainsi qu'une accumulation de fer au niveau des macrophages et du foie.

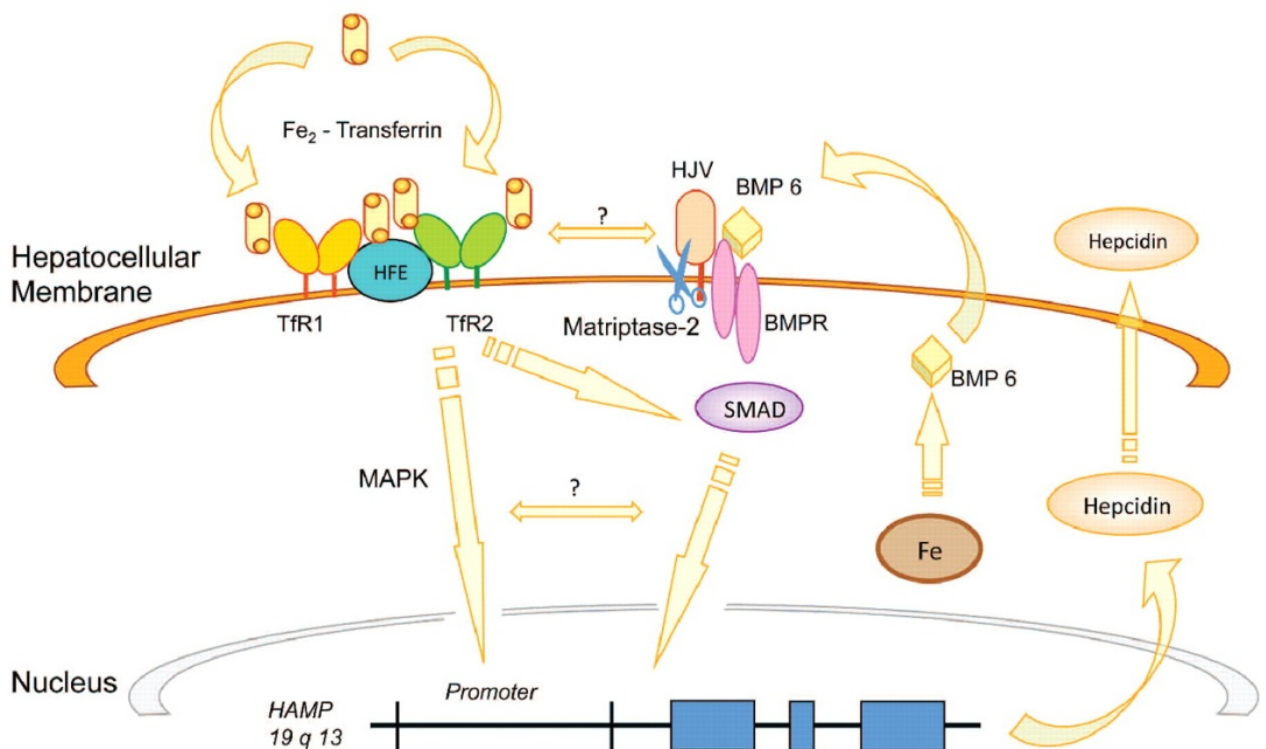


Figure 7 : Schéma général de régulation transcriptionnelle du gène HAMP par le fer d'après D Swinkels. Le fer peut activer la transcription du gène HAMP par deux voies. Il induit la synthèse hépatique de BMP6 qui après fixation à son récepteur active une voie de signalisation faisant intervenir SMAD. Mais il agit aussi par l'intermédiaire du complexe TfR1/TfR2/HFE dont les voies intracellulaires ne sont pour l'instant pas identifiées.

suggérerait son analogie de structure avec d'autres petites molécules comme la bêta-2-microglobuline. Mais cette hypothèse d'élimination n'est pas totalement confirmée. Sa fraction d'excrétion rénale chez un individu sain serait estimée selon les études entre 0 et 15%.(30)

2.3. Action : (fig 6)

L'hepcidine produite se fixe à la ferroportine entraînant la phosphorylation de la ferroportine par l'intermédiaire de Jak2. Celle-ci est alors internalisée, déphosphorylée, ubiquitinylée et acheminée au lysosome où elle est dégradée. Cette ubiquitination se produit sur les deux résidus lysines 240 et 258 de la ferroportine(31). Le site de fixation de l'hepcidine à la ferroportine est nommé HBD (hepcidin binding domain).(32)

2.4. Régulation :

Comme beaucoup de données concernant l'hepcidine, la régulation de l'expression de son gène n'est, à l'heure actuelle, que partiellement connue. (fig 7)

Ce sont des arguments expérimentaux obtenus chez la souris qui ont permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation d'expression. Il s'agit d'une régulation transcriptionnelle du gène Hamp possédant en amont de sa région promotrice des éléments de réponse des éléments de réponse à différents stimuli pouvant être :

- activateur de la transcription de HAMP : surcharge en fer, inflammation
- répresseurs: carence en fer, hypoxie, diminution du taux d'hémoglobine(33)

2.4.1. régulation par le fer

Les voies de signalisation qui contrôlent le niveau d'hepcidine sont complexes mais il a été mis en évidence que bien que l'hepcidine régule l'entrée du fer, le fer lui aussi régule l'expression de l'hepcidine par différents moyens.

2.4.1.1. La voie Hémojuvéline/BMP/SMAD :

2.4.1.1.1. les BMP

Les BMP (bone morphogenic proteins) sont une sous-famille de cytokines appartenant à la famille des TGF β (*Transforming Growth Factor β*) possédant deux types de récepteurs permettant la transmission du signal. L'interaction des deux récepteurs avec les BMP provoque la phosphorylation des récepteurs de type I par les récepteurs de type II, et dans un second temps, la phosphorylation des protéines cytoplasmiques SMAD 1/5/8 qui forment avec Smad4 un complexe protéique(34). Ce complexe est ensuite transloqué vers le noyau et interagit alors avec des séquences nucléotidiques de type BMP-responsive element qui ont été localisées au sein du promoteur du gène codant l'hepcidine : il en résulte l'induction de l'expression du gène HAMP(34). La surcharge hépatocytaire en fer stimule la production de BMP6 qui semble être le principal BMP activateur de l'expression de l'hepcidine *in vivo* (en effet c'est le seul BMP dont l'expression est corrélée à la charge en fer des hépatocytes chez la souris).

2.4.1.1.2. Hémojuvéline :

Cette protéine, dont le gène est situé sur le bras long du chromosome 1, est principalement synthétisée au niveau du parenchyme hépatique, du muscle strié squelettique et du muscle cardiaque.

Cette molécule existe sous 2 formes :

- une forme membranaire (HJVm): ancrée à la membrane cellulaire par son domaine GPI, qui joue le rôle de co-récepteur aux BMP (bone morphogenic proteins) et active la transcription du gène par une voie Smad4 dépendante.
- une forme soluble circulante (HJVs) : qui agit comme antagoniste compétitif des BMP ce qui a pour conséquence de diminuer l'expression de l'hepcidine en inhibant la signalisation liée aux protéines SMAD.

Il a été décrit que cette forme soluble proviendrait d'un clivage de HJVm par des des proconvertases de type furine au niveau du réticulum endoplasmique dont l'expression est augmentée par l'hypoxie. La saturation de la transferrine jouerait elle aussi un rôle car il a été

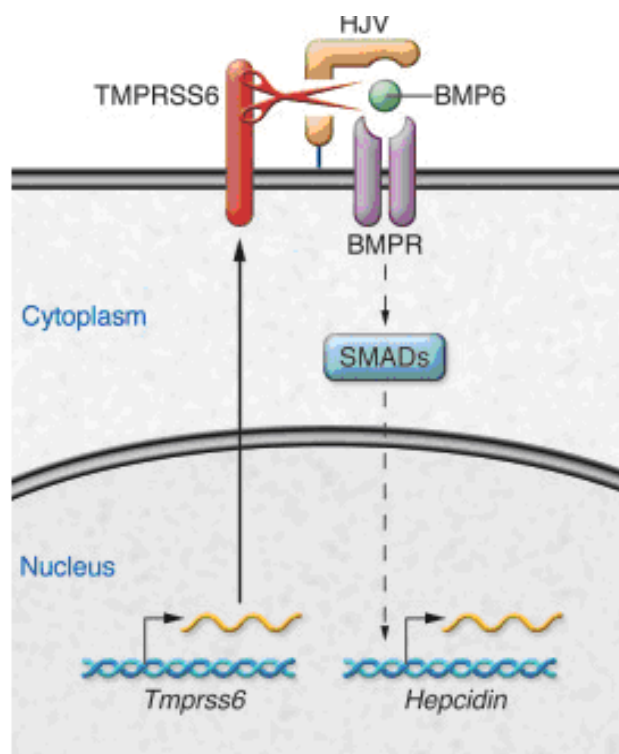


Figure 8 : Action de la TMPRSS6 sur l'hémojuvélène d'après FINBERG. Elle permet le clivage de l'hémojuvélène sous sa forme soluble ce qui entraîne une diminution la voie de signalisation BMP6 –hémojuvélène avec diminution de la transcription du gène HAMP.

décrit que le fer lié à la transferrine aurait la capacité de diminuer la libération de la forme soluble de l'HJV.

2.4.1.1.3. TMPRSS6 : facteur inhibiteur (fig 8)

Il a été démontré que la sérine protéase membranaire matriptase-2 ou protéine TMPRSS6 joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie du fer en réprimant l'expression de l'hepcidine. Cette protéine d'expression hépatique appartient à la famille des type two transmembrane serine protease ou sérine protéase membranaire de type II (TTSP) qui sont fréquemment impliquées dans l'activation d'hormones et des facteurs de croissance, ainsi que dans l'initiation des cascades protéolytiques(35).

Elle est constituée de différents domaines :

- domaine d'ancrage en N-terminal
- différents domaines d'interactions laissant envisager une modulation de cette protéase par diverses molécules
- un domaine sérine protéase contenant les résidus histidine, asparagine et sérine de la triade catalytique

La TMPRSS6 est une trypsin-like sérine protéase, synthétisée sous la forme d'une proenzyme inactive et nécessitant un clivage par autoprotéolyse pour être active. Une fois activée, elle permettrait la libération de la forme soluble de l'HJV ce qui diminuerait l'expression d'hepcidine.(36)

Des mutations du gène TMPRSS6 sont responsables d'une anémie microcytaire hypochrome de type iron refractory iron deficiency anemia (IRIDA) caractérisée par une déficience de l'absorption du fer intestinal due au défaut de répression du gène HAMP.(37)

La carence en fer aurait donc pour effet d'activer la TMPRSS6 pour in fine diminuer l'effet hyposidérémiant de l'hepcidine.

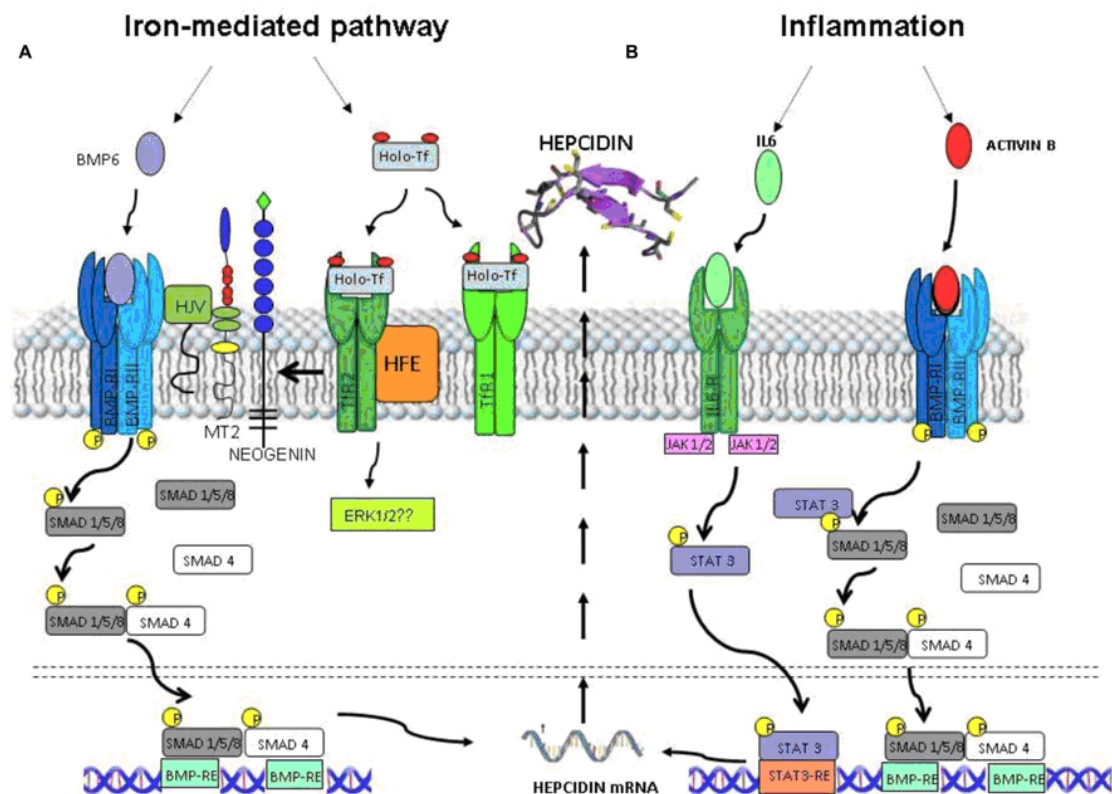


Figure 9 : Régulation de l'expression du gène HAMP d'après POLI and al. Les deux voies principales de régulation sont représentées ici. (La voie de régulation par le fer est déjà expliquée en figure). L'inflammation augmente la transcription du gène codant l'hepcidine par deux acteurs. L'IL6 est responsable de l'augmentation du taux d'hepcidine par action sur son récepteur IL6-R et de STAT3. L'activine B active comme le BMP6 un signal d'activation intracellulaire dépendant de SMAD.

2.4.1.2. La voie HFE/ TFR1/TFR2

Les mutations les plus fréquemment rencontrées dans les cas d'hémochromatose adulte sont présentes dans deux gènes : HFE (pour la plus fréquente) et le gène codant pour Tfr2. Ces hémochromatoses se caractérisent par des faibles taux sériques d'hépcidine discordant avec la surcharge viscérale dont souffrent les patients.

La protéine HFE (de l'anglais High et du symbole de l'élément fer: Fe) est une protéine de membrane, constituée de 343 aa, similaire aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et se trouvant associée avec l'alpha-2 macroglobuline. Elle est codée par le gène HFE présent en 6p21 et s'exprime majoritairement dans les cellules des cryptes duodénales.

Comme il a déjà été précisé, Tfr2 est un récepteur à la transferrine de type 2 (Tfr2), exprimé principalement à la surface des précurseurs érythroïdes. C'est la saturation de la transferrine qui module la régulation de l'hépcidine par le complexe Tfr1/Tfr2/HFE. En effet, HFE forme avec TR1 un complexe qui va se dissocier lorsque la saturation de la transferrine augmente. Tfr1 va alors fixer l'holotransferrine tandis que HFE se fixe à Tfr2. Cette interaction induit la phosphorylation de SMAD1/5/8, sans passer par BMP6.(38)

2.4.2. Régulation par l'inflammation (fig 9)

Les cytokines pro-inflammatoires sont à l'origine d'une augmentation de synthèse d'hépcidine par les hépatocytes en activant la transcription du gène Hamp. Ceci a été prouvé par la mise en évidence d'une augmentation de l'hépcidine urinaire chez des groupes d'individus recevant de l'IL6 par voie intra-veineuse ou chez lesquels un état inflammatoire a été induit par injection de lipopolysaccharides(31). L'IL 6 possède un récepteur (IL-6-R) exprimé à la surface des hépatocytes, et l'interaction IL6-récepteur active des facteurs JAK (Janus Kinases) qui vont à leur tour phosphoryler le facteur de transcription STAT3. Une fois phosphorylé, STAT3 est transloqué dans le noyau et se fixe sur son site de liaison STAT3-RE quelques dizaines de bases en amont du codon-initiateur. Un BMP-RE proche du STAT3-RE dans le promoteur du gène de l'hépcidine a été identifié, laissant penser que par encombrement stérique, les deux facteurs ne peuvent pas se lier en même temps au promoteur.(39)

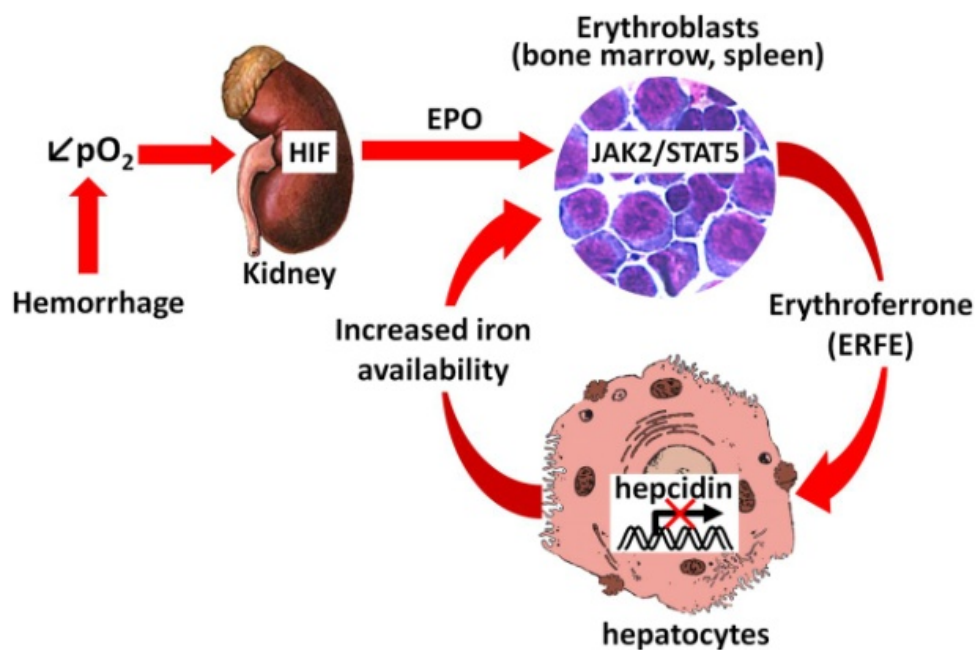


Figure 10: Mécanisme d'action proposé de l'erythroferrone sur la synthèse d'hepcidine d'après Nemeth and al. En réponse à une perte de sang, le rein augmente sa production d'EPO. La liaison de l'EPO à ses récepteurs sur les progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse conduit à la production rapide de Erythroferrone via la voie de signalisation JAK2 / STAT5. L'Erythroferrone est ensuite sécrétée dans la circulation et agit directement sur les hépatocytes en réprimant la synthèse d'hepcidine dans le but d'augmenter le taux sérique en fer pour faciliter la synthèse de nouveaux globules rouges.

Une autre cytokine pro-inflammatoire, l'activine B, appartenant à la famille du transforming growth factor beta (TGF beta) induit elle aussi l'expression du gène de l'hepcidine grâce au complexe SMAD 1/5/8. Ces données ont permis d'expliquer l'anémie présente lors des états inflammatoires persistants à cause de la production chronique de ces cytokines activant, par les voies citées ci-dessus, la transcription du gène HAMP. (40)

2.4.3. Régulation par l'érythropoïèse (fig 10)

Le fer est indispensable à une érythropoïèse efficace. En effet la molécule d'hémoglobine est une ferroporphyrine contenant 4 hèmes, donc 4 atomes de fer à l'état ferreux. Pour que le fer soit mobilisable et donc soit relargué des macrophages, il est nécessaire que le taux d'hepcidine soit faible et donc que la transcription de son gène soit inhibée.

Au départ, il a été admis que c'était l'érythropoïétine (EPO), facteur de croissance des érythroblastes produit en cas d'hypoxie, qui diminuait les taux d'hepcidine. Ceci avait été confirmé par le fait qu'une injection d'EPO entraînait une diminution très importante de l'expression d'hepcidine. Récemment une équipe américaine a découvert un nouveau régulateur érythropoïétique des stocks de fer : l'érythroferrone (famille des TNF).(41) Il s'agit d'une hormone, agissant comme facteur de transcription, produite par les érythroblastes en situation d'hypoxie. Cette synthèse serait sous la dépendance de l'EPO via une voie faisant intervenir le couple JAK2/STAT5. Puis l'érythroferrone libérée dans la circulation agirait directement sur le foie en réprimant la synthèse d'hepcidine. Mais à l'heure actuelle, tout n'est pas encore connu sur son mécanisme d'action, que ce soit sur son récepteur ou sur la voie de contrôle de la répression transcriptionnelle de l'hepcidine(42). Dans les situations complexes où peuvent coexister les anomalies de l'érythropoïèse et une surcharge en fer comme dans le cas des thalassémies, les taux d'hepcidine rencontrés sont bas ce qui suggère que l'érythropoïèse prime sur les situations de surcharge.

2.4.4. Régulation par l'hypoxie

Les facteurs induits par l'hypoxie (ou HIF : *Hypoxia Inducible Factors*) sont des protéines agissant comme facteurs de transcription dans tous les tissus et régulés par l'absence d'oxygène. Ils sont actifs sous forme d'hétérodimère HIF- α /HIF- β . HIF- α existe sous deux formes HIF 1- α et HIF 2- α .

En situation de normoxie, la sous-unité alpha, régulatrice, subit une hydroxylation, par des prolyl-hydroxylases (PHD), entraînant sa dégradation par ubiquitination et adressage au protéasome (cette étape se produit assez rapidement, puisque HIF- α possède une demi-vie de seulement 5 minutes dans le cytoplasme). La sous-unité bêta, quant à elle, est constitutivement exprimée et transloquée dans le noyau.(43)

En situation d'hypoxie, la sous-unité HIF- α est stabilisée car la PHD est inhibée. Elle peut alors être transloquée à son tour dans le noyau et interagir avec HIF- β . Le complexe néoformé va réguler ses gènes cibles en se fixant aux HRE (*Hypoxia Responsive Element*) présents dans leurs promoteurs. Pour le gène HAMP, la fixation du complexe HIF-1 α à son HRE est responsable d'une répression transcriptionnelle de ce gène. De plus HIF2 réprime indirectement l'expression de l'hepcidine via l'érythroferrone en induisant l'expression d'EPO(44). Il a été montré que les facteurs HIF réguleraient différentes protéines du fer intracellulaire :

- HIF-1 α active l'expression de la transferrine, grâce à l'HRE présent dans son promoteur, de même pour la céruléoplasmine.
- Des sites HRE reconnus spécifiquement par Hif-2 α dans leurs promoteurs des gènes codant pour Dmt1. La délétion de Hif-2 α dans l'intestin conduit donc à une réduction de l'absorption de fer, et de fait à un déficit en fer de l'organisme.

2.5. Pathologies humaines impliquant l'hepcidine :

Les gènes impliqués dans la régulation de l'hepcidine peuvent être le siège de mutations ayant pour conséquence des désordres au niveau de l'homéostasie du fer. En effet, un défaut en hepcidine augmente l'absorption du fer, qui s'accumule de manière excessive dans les organes et principalement au niveau hépatocytaire. A l'inverse, un excès d'hepcidine

empêche l'absorption du fer alimentaire et la mobilisation du fer recyclé par les macrophages engendrant une anémie par déficit en fer disponible pour une érythropoïèse normale.

2.5.1. Surcharges en fer

Souvent ce sont en fait des anomalies biologiques qui feront évoquer le diagnostic. Celui-ci doit être réalisé précocement pour éviter l'apparition des signes cliniques et des complications.

On distingue classiquement les surcharges primaires, dues à des anomalies génétiques qui perturbent le métabolisme de cet oligo-élément, des surcharges secondaires résultant le plus souvent d'un désordre métabolique indépendant et qui sont de loin les plus fréquentes.

2.5.1.1. Surcharge primaire :

La très large majorité des cas de surcharge héréditaire n'apparaît que de manière tardive, vers 50-60 ans, avec une détection plus précoce chez l'homme que chez la femme (protection vis à vis de la surcharge par les pertes menstruelles principalement). L'élément central de la physiopathologie de ces maladies est l'accumulation du fer au niveau de différents organes perturbant progressivement leurs fonctions et aboutissant à l'apparition des signes cliniques en absence de prise en charge.(45)

On utilise les termes de surcharge hémochromatosique ou hémochromatose lorsque la synthèse d'hépcidine ne répond plus à la charge en fer et de surcharge non-hémochromatosique (pour la maladie de la ferroportine).

Genetic disorders	Inheritance	Gene	Transferrin saturation	Iron overload	Hepcidin levels
Type 1 Hemochromatosis	AR	HFE	High	Parenchymal	Low (relative to serum ferritin)
Type 2a Hemochromatosis	AR	HJV	High	Parenchymal	Low
Type 2b Hemochromatosis	AR	HAMP	High	Parenchymal	Undetectable
Type 3 Hemochromatosis	AR	TFR2	High	Parenchymal	Low
Type 4a Hemochromatosis	AD	SLC40A1	Low/normal	Reticuloendothelial	High
Type 4b Hemochromatosis	AD	SLC40A1	High	Parenchymal	High

Tableau 1 : Les différents type d'hémochromatose héréditaires. Comparaison des modes de transmission, des gènes touchés et du taux d'hepcidine rencontré pour chaque type.(46)

2.5.1.1.1. Hémochromatose de type 1(47) :

Plus de 80% des cas d'hémochromatose classiques sont dus à une mutation du gène *HFE*. Le gène *HFE* possédant une localisation en 6p21.3, appartient à la famille des gènes codant les chaînes des molécules HLA de classe I. Il code une protéine de 343 AA et s'exprime majoritairement dans les cellules des cryptes duodénales.

Deux mutations ponctuelles principales C282Y et H63D ont été identifiées.

La mutation C282Y (p.Cys 282 Tyr : remplacement, en position 282, d'une cystéine par une tyrosine) est la plus fortement associée à l'hémochromatose. Elle empêche ainsi la formation d'un pont disulfure nécessaire au repliement de la protéine ce qui perturbe l'interaction de *HFE* avec la β -2-microglobuline. En France, 90% des patients porteurs d'une hémochromatose sont homozygotes pour la mutation C282Y. La transmission s'effectue sur un mode autosomique récessif mais la pénétrance est incomplète et l'expressivité variable. L'hétérozygotie simple C282Y n'a pas d'expression clinique.

La seconde mutation H63D du gène *HFE* (p.His 63 Asp: remplacement, en position 63, d'une histidine par un acide aspartique) n'est impliquée qu'en cas d'association à la précédente chez des patients hétérozygotes composites C282Y/H63D.

Il s'agit de la plus fréquente des maladies héréditaire récessive de l'adulte en Europe Occidentale avec une fréquence de 1/300 en France et une prévalence plus élevées dans les

pays du Nord. La mutation C282Y est retrouvée préférentiellement chez les populations celtes tandis que la seconde mutation H63D est plus fréquente dans les pays méditerranéens.

2.5.1.1.2. Hémochromatose de type 3 (48):

L'hémochromatose de type 3 est liée à des mutations du gène du récepteur de la transferrine de type 2 (TFR2) et est de transmission autosomique récessive.

La première mutation a été identifiée en 2000, il s'agit d'une substitution d'un C en A dans l'exon 6 causant l'apparition d'un codon-stop prématuré à la place d'une tyrosine (p.Y250X) et la synthèse d'une protéine tronquée. Depuis, un grand nombre de mutations dans le gène TFR2 ont été identifiées. Pour rappel, TFR2 a une structure très proche de TFR1 mais il diffère par son expression majoritairement hépatique. Il sert très peu à faire entrer du fer dans les cellules et n'est pas régulé par le fer intracellulaire. Il lie la protéine HFE comme TFR1 mais sur une partie différente de la molécule (TFR1 interagit avec les boucles $\alpha 1$ et $\alpha 2$ tandis que TFR2 se met plutôt en face de la $\beta 2$ -microglobuline). Ces interactions vont avec des fonctions tout à fait différentes puisque TFR2 régule le métabolisme du fer et le gène de l'hepcidine (dans le sens d'une activation de la transcription).

L'hémochromatose de type 3 est caractérisée par une faible expression d'hepcidine et par un faible nombre de cas. Cette pathologie donne un tableau clinique comparable à celui de l'hémochromatose classique HFE1 et on l'observe majoritairement chez l'adulte.

2.5.1.1.3. Hémochromatose de type 2 : hémochromatose juvénile (49)

Il en existe deux types a et b qui se distinguent par le gène en cause. Ce sont des maladies héréditaires transmises sur le mode autosomique récessif. Contrairement à l'hémochromatose classique, la particularité de ces deux formes d'hémochromatose est qu'elles sont à début précoce et qu'elles s'accompagnent d'une surcharge en fer très marquée qui va provoquer très rapidement une surcharge myocardique et endocrinienne sévères en se manifestant avant 30 ans. Les patients atteints par cette forme d'hémochromatose meurent jeunes, d'une atteinte cardiaque, s'ils ne sont pas soignés par des saignées ou des chélateurs de fer.

Ces pathologies impliquent des protéines du métabolisme du fer avec le gène HJV de l'hémojuveline qui intervient dans la voie de signalisation de la transcription de l'hepcidine (hémochromatose type 2A) et avec le gène HAMP de l'hepcidine (hémochromatose type 2B). La pénétrance de l'hémochromatose juvénile est beaucoup plus importante que celle de l'hémochromatose classique.

2.5.1.1.3.1. Hémochromatose de type 2a (50)(49):

Dans la grande majorité des cas, les mutations causant l'hémochromatose juvénile se situent dans le gène HJV. Elles sont de tout type : perte du cadre de lecture (car délétion, insertion), faux sens et non sens. On a décrit des mutations prédominantes, mais la plupart du temps ce sont des mutations familiales, sporadiques. Elles sont à l'origine d'une diminution d'hémojuveline fonctionnelle se traduisant par une diminution drastique de l'expression du gène Hamp.

2.5.1.1.3.2. Hémochromatose de type 2b(49) :

Chez certains patients atteints d'hémochromatose juvénile, des mutations du gène HAMP ont été identifiées. Elles sont là encore de tout type avec un certain nombre de mutations frameshift (c'est à dire une mutation modifiant le cadre de lecture). Il existe notamment des mutations provoquant l'apparition de codons AUG en amont du codon AUG initiateur qui font que le véritable codon initiateur n'est pas reconnu. Il va y avoir une consommation précoce des éléments de la machinerie de traduction et donc une réduction de la disponibilité du matériel pour la traduction de la bonne région codante et ceci aboutissant à une diminution de la traduction. Il y a enfin des mutations qui siègent sur des régions fonctionnelles du peptide :

- au niveau des cystéines : empêchant la formation des ponts di-sulfures et modifiant ainsi la structure secondaire du peptide ce qui lui fait perdre sa fonction
- au niveau des régions d'interaction avec des enzymes, en particulier des enzymes qui reconnaissent des acides aminés permettant le clivage de la partie pro-peptide
- au niveau du promoteur, les mutations seront alors responsables d'un défaut d'expression de l'hepcidine.

2.5.1.1.4. Hémochromatose de type 4 et maladie de la ferroportine(45)

Ces pathologies sont dues à des anomalies au niveau du gène SLC40A1 codant la ferroportine et contrairement aux autres formes d'hémochromatose, elles sont transmises sur un mode autosomique dominant.

Il existe 2 classes de mutation de la ferroportine qui diffèrent par leurs conséquences phénotypiques :

- Phénotype classique: perte ou réduction de la fonction d'export de la ferroportine avec séquestration du fer macrophagique, correspondant à l'hémochromatose (type 4B)
- Phénotype non classique: gain de fonction de la ferroportine devenant résistante à l'action de l'hepcidine avec augmentation de l'absorption du fer duodénal. Cette forme est appelée ferroportin disease (type 4A).

2.5.1.1.4.1. Maladie de la ferroportine(7) :

Elle se caractérise par une hyperferritinémie associée à un coefficient de saturation de la transferrine qui peut être normal ou insuffisamment élevé. En effet dans une hémochromatose classique on observe un coefficient de saturation à 90%. Dans cette pathologie, le coefficient reste à des valeurs inférieures à 60-70% alors que l'hyperferritinémie est du même niveau que celle d'une hémochromatose évoluée.

Une autre particularité réside dans le fait que la surcharge en fer prédomine dans les cellules du système réticuloendothélial. Les mutations les plus fréquentes sont responsables généralement d'un problème d'adressage de la ferroportine à la membrane plasmique qui reste localisée dans des vésicules intracellulaires. Il en résulte une inhibition de l'export de fer, qui est retenu dans les entérocytes et les macrophages.

Etant donné la faible saturation de la transferrine et la difficulté à mobiliser le fer retenu dans les macrophages, ces patients répondent très mal à la phlébotomie.

2.5.1.1.4.2. Hémochromatose de type 4B(45):

Elle se caractérise par un tableau tout à fait comparable à l'hémochromatose classique HFE1 : hyperferritinémie et coefficient de saturation très élevés qui répondent bien aux saignées et pour lesquels la surcharge en fer est hépatocytaire. Cette forme est associée à des mutations « gain de fonction » qui rend la ferroportine insensible à l'hepcidine. La ferroportine est correctement exprimée et adressée à la membrane, mais elle ne peut pas être internalisée par l'hepcidine qui est donc inefficace.

2.5.1.2. Surcharges secondaires :

Ce sont de loin les causes les plus fréquentes d'exploration d'hyperferritinémie.

2.5.1.2.1. Maladies hépatiques chroniques

Il existe de nombreuses atteintes hépatiques qui peuvent avoir pour conséquence une surcharge en fer du foie. Il peut s'agir de stéatose, surcharge en fer dysmétabolique associée ou non à une insulino-résistance, alcoolisme et hépatite chronique (virale...). Pour ces deux derniers cas, il a été démontré une diminution de l'hepcidine pouvant être responsable de la mise en place de la surcharge martiale.

2.5.1.2.2. Erythropoïèse inefficace :

Dans les situations où il existe une érythropoïèse inefficace, que ce soit une anomalie au niveau de la synthèse des chaînes de globines ou de l'hème, il se met en place au niveau intestinal une augmentation de l'absorption du fer pour essayer de rétablir le taux de globules rouges. Ceci peut être à l'origine d'une surcharge martiale. Dans ces situations complexes où coexistent signaux activateurs de la transcription de l'ARNm de l'hepcidine (surcharge martiale) et des signaux inhibiteurs (anémie), ce sont ces derniers qui prédominent sur la régulation(41). La correction d'une anémie étant plus importante pour la survie de l'individu à court terme. Ce sont donc les facteurs érythroïdes, et notamment l'érythroferrone qui induisent une répression de la transcription du gène HAMP à l'origine de l'hyper absorption intestinale. Ces érythropoïèses inefficaces peuvent être soit dues à une anomalie dans la biosynthèse des chaînes de globines (thalassémies) soit dans la biosynthèse de l'hème.

2.5.1.2.2.1. Anémies sidéroblastiques(51) :

Ces pathologies sont caractérisées par la présence de sidéroblastes présents au tour du noyau des érythroblastes et observables lors d'une coloration de Perls sur frottis de moelle osseuse. Il s'agit d'une accumulation de fer libre dans les mitochondries. Cette surcharge localisée est évocatrice d'un défaut de synthèse de l'hème au niveau des cellules érythroïdes. Cela est confirmé par le fait que la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients présentant ce type d'anémie est une mutation sur le gène ALAS2. Ce gène code pour l'isoforme érythroïde de la première enzyme de biosynthèse de l'hème formant l'acide gamma-aminolévulinique ou ALA.

2.5.1.2.2.2. Thalassémies(52) :

Elles regroupent les plus courantes des anémies héréditaires et font partie du groupe des hémoglobinopathies. Il s'agit de défaut de production des chaînes de globine, alpha pour les alpha-thalassémies, des chaînes bêta pour les bêta – thalassémies. Il y a alors présence d'un excès relatif de la chaîne complémentaire toxique qui est responsable d'une hémolyse extra vasculaire. De plus, pour les beta-thalassémies, l'excès de chaîne alpha provoque une apoptose des érythroblastes, elle-même à l'origine d'une érythropoïèse inefficace. Il y a accumulation du fer libéré par cette lyse intra médullaire des précurseurs érythroïdes. S'ajoute à ceci, le fait qu'un des traitements des thalassémies majeures réside en l'apport de globules rouges par transfusions et ceci dans le but de maintenir un taux d'hémoglobine dans des valeurs subnormales (entre 9 et 12 g/dL).

Or un culot transfusé apporte au malade environ 200 mg de fer qui n'est pas éliminé et s'accumule dans les différents organes (foie, cœur, glandes endocrines). Cette surcharge martiale doit alors être traitée par injection de chélateurs de fer car elle représente une cause majeure de morbidité et mortalité. Il a été mis en évidence un taux urinaire d'hepcidine anormalement bas pour le degré de surcharge en fer chez des patients avec β -thalassémie majeure ou intermédiaire ce qui confirme bien que la régulation par le taux d'hémoglobine prédomine sur la régulation induite par l'excès de fer.(53)(54)

2.5.1.2.3. Transfusions répétées :

Comme dit précédemment, les transfusions, quelles soient réalisées dans le cadre des thalassémies ou dans d'autres anémies hémolytiques, sont responsables d'un apport en fer potentiellement à l'origine d'une surcharge. L'emploi des chélateurs du fer peut alors être envisagé. Les indications principales sont les syndromes thalassémiques majeurs, la drépanocytose et les syndromes myélodysplasiques(52).

Le déféroxamine (Desféral®) est le chélateur de référence, il s'administre en perfusion continue sous-cutanée, mais les intolérances locales cutanées en limitent l'observance. Le défériprone (Ferriprox®) est efficace par voie orale en trois prises par jour : il est le plus efficace en cas d'atteinte cardiaque mais peut entraîner une agranulocytose (1 % des cas). Le déférasirox (Exjade®) a une efficacité inférieure sur la surcharge cardiaque mais affiche le meilleur profil de tolérance. L'utilisation de ces chélateurs s'envisage à partir d'une ferritine supérieure à 1000µg/L avec une surcharge en fer hépatique confirmée par IRM supérieure à 80µmol/g.

2.5.2. Carences en fer :

2.5.2.1. Anémie par carence martiale ou anémie ferriprive :

C'est l'étiologie la plus fréquente des anémies. Il s'agit d'une anémie microcytaire dont il existe deux causes fondamentales.

Il peut s'agir d'une insuffisance d'apport causé soit par un apport alimentaire insuffisant ou par une mauvaise alimentation (troubles alimentaires, problèmes d'acidité gastrique ou malabsorptions intestinales...).

Mais cela peut aussi provenir d'une augmentation des besoins que ce soit :

- entre 4 mois et 2 ans, âge où l'enfant investit 6 à 8 mg de fer (3)
- physiologiquement encore, chez la femme enceinte et pendant l'allaitement : chaque grossesse coûte environ 750 à 1 000 mg de fer, soit un cinquième des réserves normales(3)

- par augmentation excessives des pertes dans les états hémorragiques chroniques (digestifs...) ou lors des menstruations.(3)

L'anémie est généralement bien tolérée car d'installation progressive et constitue le stade évolué de la carence. La carence débute par une simple déplétion des réserves tissulaires et se traduit par une hypoferritinémie précédant les signes cliniques de plusieurs semaines. Dans cette pathologie, il a été mis en évidence des taux faibles d'hepcidine urinaire et sérique ayant pour objectif de pallier au manque de fer disponible pour l'érythropoïèse. Ceci résulte d'une inhibition de transcription du gène HAMP passant principalement par la voie HFE/TFR1/TFR2(39).

Le traitement de cette forme d'anémie réside dans un premier temps par le traitement de la cause de la perte en fer ou de l'insuffisance d'apport. A ceci est toujours associée une supplémentation orale par des sels ferreux. L'absorption intestinale du métal étant quantitativement limitée, la réponse au traitement est lente. Il est possible d'augmenter l'absorption par un régime riche en fer héminique.

2.5.2.2. Anémies inflammatoires :

L'apparition d'une anémie est un phénomène très courant dans les maladies inflammatoires. Avec l'anémie ferriprive, il s'agit de la seconde cause d'anémie la plus fréquente. Elle touche les sujets âgés en particulier.

Les principales affections associées à ce type d'anémie sont :

- les infections aiguës et chroniques qu'elles soient virales (VIH), bactériennes, parasitaires ou mycosiques
- les cancers tels que les tumeurs solides ou les atteintes hématologiques
- les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, les connectivites, les vascularites, la sarcoïdose, etc.

La sécrétion de cytokines en réponse à un état inflammatoire est capable d'activer l'expression de l'hepcidine, principalement par la voie de l'IL6 et de l'activine B(40)(41). Les organismes pathogènes ont besoin de fer pour leur prolifération et le récupèrent chez leurs hôtes. L'hepcidine va, en limitant le taux circulant de fer par son action hyposidéramiante,

permettre de lutter contre l'infection. En séquestrant le fer au niveau des macrophages, Il est alors moins disponible pour l'érythropoïèse entraînant sur le long terme l'apparition d'une anémie. C'est une anémie souvent modérée normocytaire pouvant devenir microcytaire. Au niveau biologique, en plus de la baisse du taux d'hémoglobine, il est observé un fer sérique faible et une ferritine légèrement augmentée. Cela provient du fait que le fer retenu dans les macrophages, inactive les IRP, menant à une augmentation de la transcription de la ferritine, qui se retrouve dans la circulation.

Pour traiter cette anémie, il faut exclusivement traiter l'inflammation. En effet, les apports en fer par voie orale s'avèrent inefficaces puisque l'hepcidine à taux élevé bloque l'oligoélément dans les entérocytes.(54)

2.5.2.3. Anémie de l'insuffisance rénale(55) :

L'anémie retrouvée chez les patients atteints d'une insuffisance rénale chronique est probablement d'origine multifactorielle. Il est bien connu que le facteur prédominant est l'insuffisance de synthèse d'EPO par le rein, mais on sait maintenant que l'hyperurémie provoque un état inflammatoire chronique pouvant être impliqué lui aussi dans la genèse de cette anémie. Dans les situations d'insuffisance rénale terminale hémodialysée, il peut y avoir aussi une activation immune chronique par les membranes de dialyse et un risque d'infection plus important.

L'EPO de synthèse utilisée pour traiter ces patients fonctionne de façon optimale quand le fer est présent en quantité suffisante et maintenant ce traitement est associé à l'injection de fer par voie intraveineuse. Une inhibition de l'expression d'hepcidine a été observée lors des injections d'EPO ce qui pourrait contribuer à l'efficacité du traitement.(56)(55)

2.5.2.4. IRIDA: Iron Refractory Iron-Deficiency Anemia.

Chez certains patients présentant une anémie ferriprive microcytaire, non-inflammatoire, non corrigée par le fer oral, il a été mis en évidence des mutations du gène codant la matrilysine 2. Elle peut être détectée dès l'enfance. Cette anémie est due à une baisse de la biodisponibilité plasmatique du fer résistante à la supplémentation martiale orale et répondant de façon incomplète à la supplémentation parentérale. Ces mutations siégeant sur le gène Tmprss6

codant la matriptase 2 sont responsables d'une diminution d'expression de celle-ci ce qui induit une expression anormale de l'HJV sur la membrane cellulaire. Cela aboutit à une expression anormalement élevée de l'hepcidine comparativement au statut martial par une absence d'inhibition de la voie HJV/SMAD(36). Malgré un déficit en fer disponible, les taux sériques et urinaires d'hepcidine restent anormalement élevés. On peut donc comparer cette situation avec celle observée au cours de l'anémie inflammatoire, qui est, elle, liée à la voie STAT3 et à l'IL-6. L'IRIDA est donc une forme rare d'anémie génétique, transmise sur le mode autosomique récessif dont le diagnostic repose sur le séquençage du gène TMPRSS6 à la recherche de mutations délétères. Le dosage de l'hepcidinémie pourrait permettre de renforcer l'hypothèse diagnostique.

2.6. Hecpidine : cible thérapeutique(55) (71):

L'hepcidine est donc clairement impliquée dans diverses pathologies, que ce soit à cause d'un déficit de production ou à l'inverse d'un excès. Elle a donc été étudiée comme potentielle cible thérapeutique. Plusieurs stratégies ont été envisagées pour soit bloquer son action ou au contraire l'augmenter. Les pathologies visées par ces traitements correspondant à celles qui font l'objet d'études sur l'indication du dosage. L'utilisation des agonistes de l'hepcidine pourraient avoir un intérêt dans les surcharges en fer que ce soit les hémochromatoses génétiques ou celles observées lors des béta-thalassémies. Tandis que l'utilisation d'antagoniste serait utile pour les anémies inflammatoires, de l'insuffisance rénale ou encore dans les IRIDA.

En prenant comme exemple le pancréas endocrine, une thérapie substitutive par de l'hepcidine exogène, comme pour l'insuline, a été envisagée. Mais l'hepcidine présente plusieurs caractéristiques qui limitent son utilisation potentielle en tant qu'agent thérapeutique. En raison de sa longueur et de sa structure complexe avec 4 ponts disulfures, il est très coûteux à produire. De plus sa sensibilité à la dégradation protéolytique empêche une absorption orale efficace.

C'est pourquoi d'autres thérapies ont été développées et sont en cours d'essai que ce soit dans le but de diminuer la surcharge en fer (mini-hepcidines composés des neuf acides aminés N-terminaux de l'hepcidine humaine) ou pour diminuer les effets de l'hepcidine (Antagonistes

des BMP-R de type I, fraction soluble de l'hémojuvéline fusionnée avec la fraction Fc d'immunoglobuline ou le LDN-193189, dorsomorphine).

2.7. Différentes méthodes pour le dosage de l'hepcidine :

Le dosage de l'hepcidine semble pouvoir être utile pour la compréhension physiopathologique des maladies du métabolisme du fer, mais il apparaît aussi qu'il serait un élément pertinent pour le diagnostic ou le pronostic à la fois pour les surcharges mais aussi des carences.(57)

La mise au point de ce dosage rencontre néanmoins plusieurs difficultés du fait de la faible immunogénicité de cette molécule, de sa petite taille et sa structure très repliée. Il existe aussi des risques d'agrégation et d'adhésion sur différentes surfaces ainsi que des interférences des différentes isoformes et des propeptides pour les tests immunologiques(58).

A l'heure actuelle il existe différentes techniques utilisées principalement à des fins de recherche se basant sur des immunoanalyses ou par spectrométrie de masse.

La mise en place d'une étude de comparaison des différentes méthodes existantes permettra par la standardisation du dosage d'en étudier la pertinence clinico-biologique et par la suite de définir les recommandations d'utilisation(59).

2.7.1. Tests immunologiques :

Ces tests se basent sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de l'hepcidine. Ainsi le point essentiel à maîtriser est la spécificité. En effet, il est important d'utiliser un anticorps dirigé contre un épitope présent de façon exclusive sur l'hepcidine 25 pour éviter les réactions croisées avec les autres isoformes ainsi qu'avec la prohépécidine.(60)

2.7.1.1. Méthode RIA :

Les dosages radio-immunologiques par compétition (RIA) sont des techniques de *in vitro* qui utilisent des composés radioactifs associés à des antigènes. Ils ne sont plus utilisés que pour des méthodes pour lesquelles aucune alternative non isotopique n'existe. Il existe à l'heure

actuelle un kit commercialisé utilisant cette technique et développé par Bachem, UK possédant un marquage CE mais les résultats n'ont pas encore été validés. Cette méthode utilise de l'hepcidine marquée à l'iode 125 et des anticorps anti-hepcidine produits chez le lapin. D'autres kits de RIA ont été développés par plusieurs équipes qui se sont avérés sensibles mais avec des variations dans la limite de quantification. De plus, même si aucune réaction croisée avec la pro-hepcidine n'a été démontrée, l'inconvénient de ces tests semble être une détection croisée (de 10 à 20%) entre l'hepcidine 25 et les isoformes 20 et 22(58)(61). La contrainte principale de ce dosage réside dans l'utilisation des radio-éléments qui en plus d'être instables dans le temps, nécessitent une réglementation contraignante à cause des potentiels risques ionisants. C'est pourquoi d'autres techniques d'immunoanalyses ont été développées.

2.7.1.2. ELISA :

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection d'antigènes présents dans un échantillon biologique par des anticorps liés préalablement à une enzyme donnant une réaction colorée en présence de son substrat.

Des techniques ont été développées pour doser soit l'hepcidine 25 soit la pro-hepcidine. Bien que le dosage de la pro-hepcidine par ELISA soit hautement sensible et reproductible, il ne semble pourtant pas corrélé au taux d'hepcidine sérique ni aux concentrations des autres paramètres du bilan martial. Il n'apparaît donc pas être approprié pour explorer les désordres liés au métabolisme du fer. Les premiers kits utilisaient une méthode par compétition qui est remplacée par les méthodes sandwich plus robustes. DRG international (USA) commercialise un kit sous forme de plaque 96 puits constitué de 6 standards (0 -2- 6,5 – 25 – 45 -80 ng/ml) permettant de réaliser la gamme d'étalonnage et de deux contrôles. D'après les données du fournisseur, ce test ne semble pas rencontrer de problèmes de cross-réaction avec les différentes isoformes et la pro-enzyme. Ce test est actuellement utilisé en routine par certains laboratoires.

L'existence de relations croisées avec les isoformes 20 et 22 a permis de montrer une augmentation plus importante de ces deux molécules par rapport à la forme biologiquement active chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique(55)(62). Le dosage de

l'hepcidine 20 et 22 dans ces situations pourrait s'avérer plus pertinent que celui de l'hepcidine 25 mais ceci reste encore à explorer.

2.7.2. Spectrométrie de masse :

Le principe de cette méthode sera développé ultérieurement au sein de ce travail car il s'agit de la technique choisie pour mettre au point notre méthode au sein du CHU de Bordeaux. Comme pour les autres techniques, plusieurs méthodes ont été développées avec deux types de spectrométries différentes : le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) en association au TOF (time-of-flight mass spectrometry) et le couplage chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem. Pour ces techniques, le dosage a été progressivement amélioré par l'utilisation d'étalon interne constitué soit par l'hepcidine 24 soit par une forme isotopique de l'hepcidine 25 et aussi par l'utilisation d'un spectromètre de type ion Trap qui augmente la résolution et la précision(30)(63)(64).

Comme pour les tests ELISA, de fortes différences dans les valeurs d'hepcidine ont été reportées. Ces résultats ont été confirmés par la réalisation d'une première comparaison de toutes ces techniques au sein d'une étude internationale (Round Robin). Celui-ci a montré qu'en plus des variations de concentration obtenues pour un même échantillon, il existe aussi une différence au niveau des seuils de détection et quantification(59)(64).

2.8. Variations physiologiques des taux d'hepcidine

Pour pouvoir interpréter correctement les résultats et pour pouvoir en faire une utilisation clinique pertinente, il est indispensable de connaître les variations d'un paramètre qu'elles soient intra-individuelles (au cours de la journée par exemple ...) ou inter-individuelles (en fonction de l'âge, du sexe...)(65).

La maîtrise du pré-analytique (heure de prélèvement, nature du tube ...) permet ainsi de minimiser la variabilité des résultats obtenus. Ce sujet a été l'objet de différentes publications dont les informations présentées dans ce paragraphe en seront une synthèse. Mais il semble difficile de comparer les résultats obtenus par différentes méthodes tant que la corrélation entre les différentes méthodes n'ait pu être démontrée.

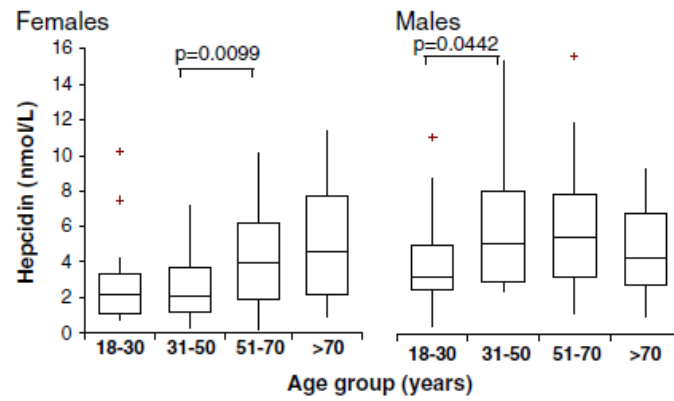


Figure 11 : Variations des taux d'hepcidine sérique en fonction de l'âge et du sexe.

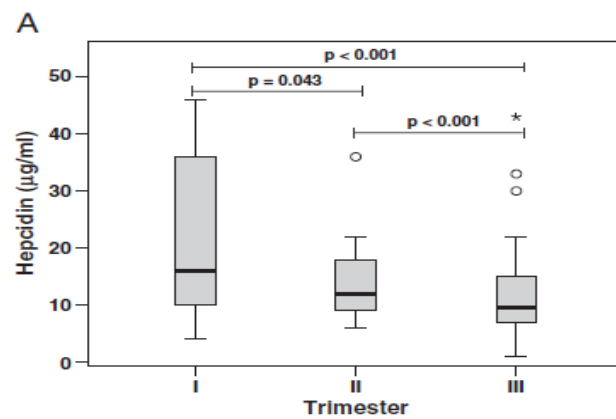


Figure 12 : Variations du taux d'hepcidine au cours des trois trimestres de grossesse.

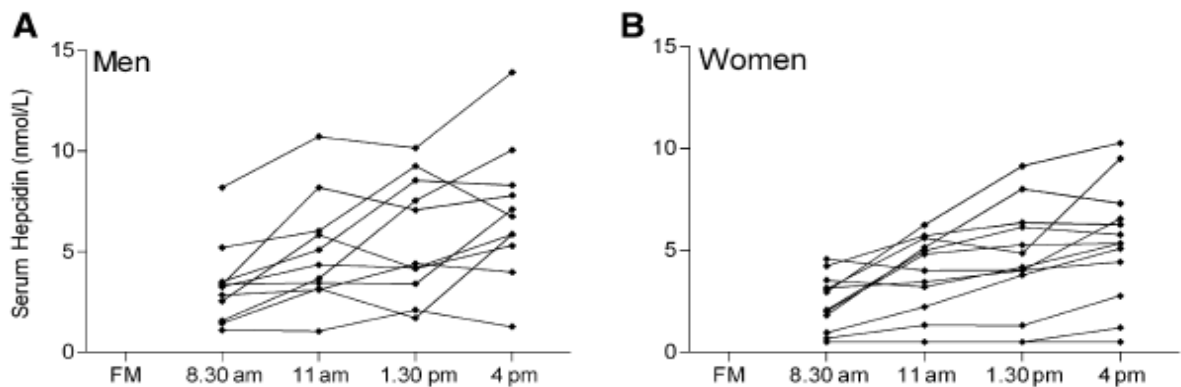


Figure 13 : Variations nycthémerales du taux d'hepcidine sérique chez les hommes et chez les femmes.

2.8.1. Variabilité inter-individuelle :

Elle est définie par la variation de la concentration d'un paramètre autour d'un point homéostatique de plusieurs individus. Comme beaucoup de variables biologiques, il existe pour l'hépcidine des variations significatives en fonction du sexe et de l'âge de l'individu. Jusqu'à 50 ans, il a été noté des taux sériques significativement plus faibles chez les femmes que chez les hommes, différence non observée après cet âge(66)(67). Ceci est en lien avec l'augmentation des pertes en fer au cours des menstruations qui nécessite des taux plus faible d'hépcidine pour compenser cette élimination. (fig 11)

Une étude est actuellement en cours pour mettre en évidence l'existence d'une variation de l'hépcidinémie au cours du cycle menstruel.

Par ailleurs, les hommes plus jeunes (18-30 ans) avaient des concentrations d'hépcidine inférieures à celles des plus de 30 ans. La raison en est actuellement inconnue(67).

Il en est de même pendant la grossesse, où l'absorption intestinale du fer augmente avec le terme, permettant de subvenir à l'augmentation des besoins. Et ceci semble corrélé avec une diminution progressive du taux d'hépcidine sérique au cours des 3 trimestres de grossesse(68). (fig 12)

2.8.2. Variabilité intra-individuelle

Elle est définie par la fluctuation aléatoire de la concentration d'un paramètre autour d'un point homéostatique d'un individu.

Il est logique que comme ce qui a été décrit pour le bilan en fer, il existe un cycle nycthémeral concernant la sécrétion d'hépcidine. Les niveaux sériques d'hépcidine augmentent de façon significative tout au long de la journée pour les 2 sexes(66)(67). (fig 13)

Il paraît donc préférable de réaliser le prélèvement le matin à jeun même s'il ne semble pas y avoir d'influence de la prise alimentaire sur les valeurs d'hépcidine obtenues. Cela permet de rester cohérent avec les recommandations utilisées pour le prélèvement d'un bilan martial(65).

2.8.3. Conditions de prélèvement :

Il n'a pas été noté de différence significative entre les prélèvements réalisés sur tube sec avec gel séparateur (Sérum) et sur tube contenant de l'héparinate de lithium (Plasma) ou un autre anticoagulant comme l'EDTA. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par les autres techniques que ce soit en RIA ou en ELISA(66).

2.9. Valeurs de référence :

Il a été établi des valeurs de référence pour l'hepcidine pour différentes techniques mais comme il n'a pas encore été démontré de corrélation entre les méthodes et même entre les différentes méthodes de préparation, il semble important de réaliser ces propres valeurs de référence. Pour des techniques de spectrométrie de masse comme celle que nous souhaitons développée, la concentration moyenne d'hepcidinémie varie aux environs de 10 ng/ml.

Les résultats retrouvés dans différentes publications sont :

Publications	Technique	groupes	valeurs d'hepcidine en ng/ml
Wolf	LC-MS/MS	hommes et femmes	3,35 à 42,13
Itkonen	LC-MS/MS	femmes < 50 ans	1,12 à 25,7
		femmes >50 ans	1,95 à 45,2
		hommes	3,1 à 43,5
Kroot	LC-MS/MS	femmes	1,4 à 20,1
		hommes	3,9 à 30,1
Hepcidinanalysis	SELDI-TOF	femmes < 50 ans	0,6 à 34,8
		femmes >50 ans	0,8 à 43,5
		hommes	1,3 à 40,7

Tableau 2 : Recueil des données de la littérature sur les valeurs de références de l'hepcidine pour des techniques de spectrométrie de masse(30)(66)(67).

Partie 2 : Analyse des peptides par couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide.

Il s'agit d'une technique analytique qui combine une méthode de séparation physique de composés (HPLC) avec un mode de détection, d'identification et de quantification par spectrométrie de masse (MS). Cette association très sensible et très spécifique connaît un essor dans de nombreux domaines que ce soit industriel ou médical.

1. Chromatographie :

C'est une méthode permettant la séparation et l'identification de composés chimiques présents dans un mélange.

1.1. Principe:

Cette séparation se base sur la différence d'affinité des composés chimiques entre une phase stationnaire et une phase mobile. Elle détermine ce qu'on appelle le temps de rétention. La phase stationnaire correspond à un liquide ou solide fixé sur une colonne ou surface plane. Elle est choisie de manière à retenir de façon inégale les composés à séparer. Pour la phase mobile, il s'agit soit d'un gaz inerte pour la chromatographie gazeuse (CPG), soit un liquide pour la chromatographie liquide. Elle se trouve en contact avec la phase stationnaire et est responsable de l'élution des molécules à séparer(72).

1.1.1. Les différents types de chromatographie liquide

Il existe différents types de chromatographie liquide en fonction des différents types d'interactions qui sont à l'origine de cette migration différentielle : taille, polarité, structure, charge électrique...Le tableau ci dessous résume les chromatographies liquides le plus souvent rencontrées. Le terme de chromatographie en phase normale est utilisé lorsque la phase stationnaire est polaire, la phase mobile est alors un solvant apolaire organique :

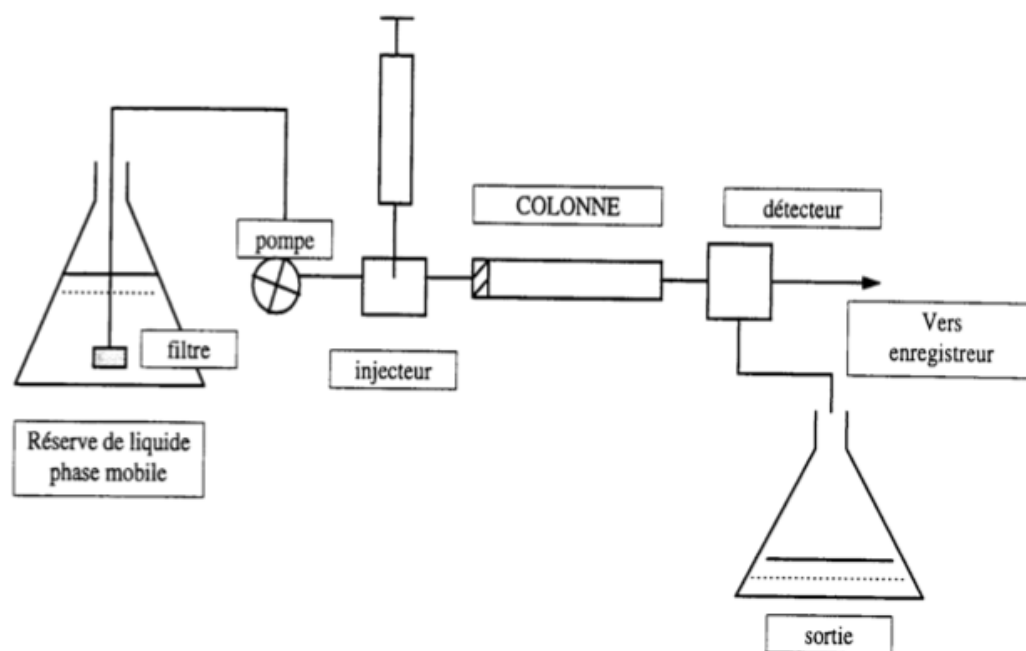


Figure 14 : Représentation des différents composants constituant un système chromatographique.

hexane, heptane, cyclohexane... Les composés apolaires seront élués avant les composés polaires puisqu'ils sont plus solubles dans la phase mobile. En ce qui concerne la chromatographie en phase inverse qui est la plus utilisée, la phase stationnaire est apolaire (silice greffée) et la phase mobile est le plus souvent un mélange de solvant polaire dont la composition peut varier au cours du temps(73).

1.1.2. Appareillage(73) : (fig 14)

La chromatographie liquide haute performance ou haute pression utilise une phase stationnaire constituée de microparticules (3-5 μm de diamètre) placées dans une colonne.

Le passage de la phase mobile dans la colonne provoque une augmentation de la pression nécessitant un appareillage spécifique (pompes, colonnes, injecteurs...).

- Réservoir : contient la phase mobile avec un ou plusieurs flacons de solvant. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.
- Pompe : elle sert au passage de la phase mobile dans la colonne. Elle assure un débit précis, constant et réglable tout en supportant des pressions élevées. Grâce à plusieurs voies, il est possible de travailler en mode :
 - Isocratique : la composition de la phase mobile ne varie pas au cours du temps.
 - Gradient d'élution : la composition de la phase mobile varie au cours de l'analyse
- Injecteur/Sample manager : il s'agit d'une boucle d'injection de volume variable assurant une bonne répétabilité dans les volumes d'échantillons injectés. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.
- Colonne : c'est un tube fait dans un matériau inerte aux produits chimique (inox généralement), de diamètre : 2-20 mm, longueur : 5-30 cm au sein de laquelle se

trouvent des microsphères de silice (particules de 3 à 5 μm) pouvant être greffées. La phase stationnaire varie en fonction du type de chromatographie. Les phases stationnaires sont de deux types :

- Imprégnées : Phase solide de silice retenant à sa surface les composés et surtout utilisées en chromatographie d'adsorption
 - Greffées : elles sont formées grâce à des liaisons covalentes entre les groupements silanols de la silice et des molécules organiques de nature variée. Elles peuvent être polaires (amines) ou apolaires (chaines linaires de 8 ou 18 carbones)
- Détecteurs : ils doivent fournir une réponse qui reflète en continu les variations de composition de l'éluat et varient en fonction des composés que l'on veut mettre en évidence :
- Spectrophotomètre à absorption UV ou visible : utilisé pour les composés qui absorbent dans l'UV – visible et sont régis par la loi de Beer –Lambert. Ce détecteur peut être monochromatique : permet une analyse à une longueur d'onde
 - Détecteur UV à barrette de diodes (DAD) : permet d'enregistrer les signaux à toutes les longueurs d'onde instantanément. Ainsi un spectre d'absorption est obtenue en lumière UV spécifique de la molécule.
 - Détecteur à fluorescence : utilisé pour les substances fluorescentes soit directement soit après transformation chimique. Cette méthode est plus sensible et sélective que la spectrophotométrie UV- visible du fait l'utilisation de deux longueurs d'ondes : celle d'excitation et celle d'émission.
 - Réfractomètre : basé sur la mesure en continue de l'indice de réfraction de l'éluant.
 - Spectromètre de masse (MS)

1.2. Applications de la chromatographie à l'analyse

1.2.1. Le chromatogramme

Le diagramme obtenu par traitement du signal enregistré en sortie du chromatographe est appelé chromatogramme. Chaque composé apparaît sous forme d'un pic et peut être caractérisé par leur temps de rétention (t_r).

1.2.2. Aspect qualitatif :

Chaque composant, dans des conditions données, va être caractérisé par son temps de rétention permettant son identification au sein d'un mélange. Pour que cela soit possible, il faut une bonne séparation des pics avec un temps d'analyse raisonnable. Cette séparation peut être caractérisée par :

- La sélectivité de la colonne : grandeur qui prend en compte uniquement les temps de rétention entre 2 composés.
- La résolution : grandeur qui prend en compte les temps de rétention mais également le recouvrement éventuel des pics.

1.2.3. Aspect quantitatif :

L'aire du pic chromatographie est proportionnelle à la quantité injectée du composé. Il est possible de les doser à l'aide d'une gamme d'étalonnage. Ceci implique que le rendement d'extraction des composés soit strictement identique pour chaque échantillon et que le volume injecté soit strictement identique pour chaque échantillon. Pour s'en affranchir, il est indispensable d'avoir recours à un étalon interne.

1.2.4. Étalon interne :

L'étalon interne (EI) est un composé absent du mélange initial, ajouté à la solution à doser en quantité connue. Ses caractéristiques sont qu'il possède :

- une structure proche du composé à doser

- des caractéristiques physico-chimiques semblables
- un temps de rétention voisin ou identique à la molécule à doser

En LC-MS/MS, l'étalon interne correspond, le plus souvent, au composé à quantifier marqué par un isotope stable entraînant une augmentation de sa masse molaire. Les isotopes fréquemment incorporés dans les molécules marquées sont : le deutérium, le carbone 13 ou l'azote 15. En ajoutant une quantité fixe d'EI dans les différentes solutions (gamme et à analyser), le rapport entre l'aire du composé à doser et l'aire de l'étalon interne est proportionnel à la concentration du composé à doser et s'affranchit d'une variabilité de rendement d'extraction ou de volume injecté. Cela permet d'obtenir une concentration déterminée précise et reproductible.

1.3. UPLC :

(Ultra Performance Liquid Chromatography) désigne des systèmes de chromatographie en phase liquide à haute pression qui reposent sur l'emploi de phase stationnaire composée de particules $< 2 \mu\text{m}$, alors que les colonnes HPLC sont habituellement remplies de particules de 3 à 5 μm . L'utilisation des colonnes permet d'augmenter la surface d'échange et limite la diminution de l'efficacité chromatographique à débit élevé(74). De ce fait, il est possible d'augmenter le débit, et donc la vitesse d'analyse, sans altérer les performances chromatographiques. Elle permet aussi une détection des composés à des concentrations de plus en plus faibles par le même mode de détection, optique ou MS :

- Grâce à l'utilisation des particules inférieures à 2 μm , le système peut fournir une sensibilité supérieure de 70 % selon le fournisseur.
- À efficacité égale mais avec des durées d'analyse plus courtes, la sensibilité est 3 fois supérieure à celle des particules de 5 μm
- La vitesse d'acquisition élevée des nouveaux analyseurs autorise le couplage de ces colonnes avec un spectromètre de masse de nouvelle génération.
- En spectrométrie de masse, les pics sont plus concentrés ce qui améliore l'efficacité de l'ionisation.

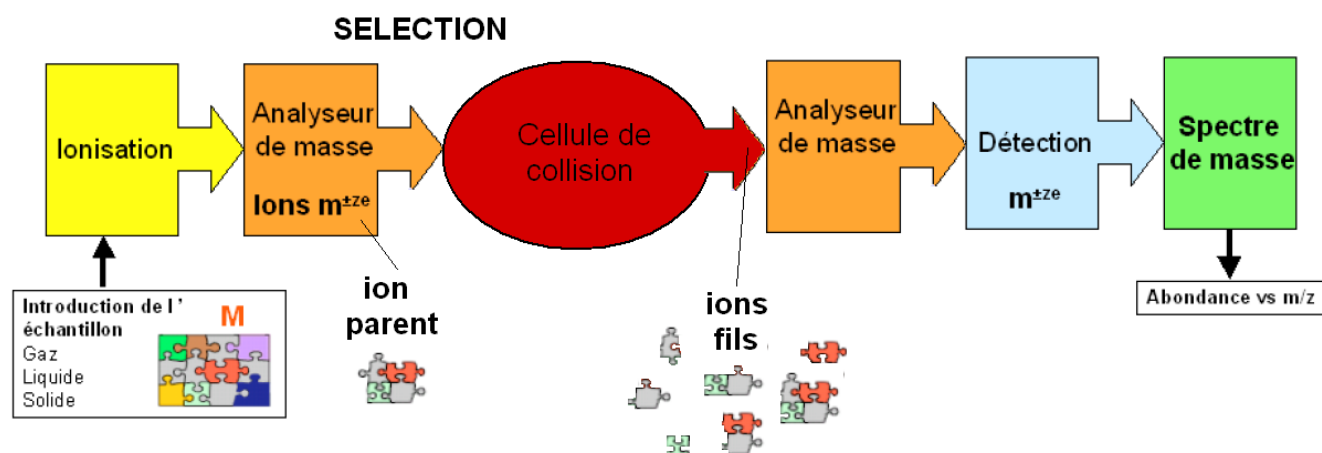


Figure 15 : Schéma simplifié des différents constituants d'un spectromètre de masse en tandem. La source d'ionisation permet de produire des ions en phase gazeuse. Les ions précurseurs sont sélectionnés par un premier filtre quadripolaire puis subissent une fragmentation au niveau de la chambre de collision. A sa sortie un deuxième filtre permet de sélectionner des ions fils souhaités qui sont détectés au niveau du système de détection.

2. Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Elle est aussi utilisée pour caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation et la détection de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Ces appareils peuvent être utilisés soit avec un système d'introduction directe (analyse de substance pure), mais sont le plus souvent couplés à des méthodes séparatives telles que les chromatographies en phase gazeuse, liquide haute performance (HPLC) et ses variants UPLC (Ultra Performance LiquidChromatography). Dans ces conditions, le spectromètre de masse fonctionne comme un détecteur classique permettant de déterminer la concentration d'un analyte grâce à la proportionnalité existante entre celle-ci et l'aire du pic chromatographique obtenu. Depuis sa découverte, cette technique est utilisée dans de très nombreux domaines scientifiques (astrophysique, chimie analytique..) et connaît un essor important en médecine et particulièrement en biologie médicale où, après avoir été initialement été cantonnée aux analyses de toxico-pharmacologie, ces domaines d'applications ne cessent de s'élargir.(75)

2.1. Spectre de masse :

Il s'agit d'un graphique, produit par un spectromètre de masse, qui présente le courant d'ions mesuré en fonction du rapport masse (dalton) sur la charge (m/z). L'ionisation va pouvoir créer des cassures au niveau des liaisons chimiques, à des endroits spécifiques de la molécule. Plusieurs ions fragments seront ainsi séparés selon leur rapport m/z . L'ensemble de ces ions fragments crée un spectre propre au composé à identifier.

2.2. Principe :

Le spectromètre de masse est un instrument qui comprend différentes parties placées en série et qui permettent successivement, après introduction de l'échantillon, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (analyseur) et enfin leur détection(76). (fig 15)

2.2.1. La source d'ionisation

La source d'ionisation est la technologie qui permet la formation d'espèces chimiques ionisées en phase gazeuse. Il est possible de distinguer deux types de sources : l'ionisation par électrospray (ESI) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)(76). L'ESI est celle la plus employée et adaptée à des petites molécules mais aussi à des peptides ou protéines. En spectrométrie de masse, on distingue différents types d'ions qui sont classiquement :

- L'ion moléculaire : c'est l'ion produit quand une molécule introduite dans la source d'un spectromètre de masse perd (M^+) ou acquiert un électron (M^-).
- L'ion pseudo-moléculaire : c'est l'ion résultant de la perte ou de l'addition d'atomes chargés à la molécule pour former un ion. Il permet la détermination de la masse moléculaire.
- L'ion parent ou précurseur : c'est un ion qui engendre un ion fils ou fragment. Ce terme est applicable à tout ion susceptible de se fragmenter.
- L'ion fils ou fragment : c'est l'ion produit par la perte d'un ou plusieurs fragments d'un ion précurseur.

2.2.2. L'analyseur :

L'analyseur de masse est le dispositif du spectromètre de masse qui sépare les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z . Comme pour les sources, il existe différents types d'analyseurs dont les modes de fonctionnement diffèrent par leur principe de mesure du rapport m/z des ions, qui est :

- la dispersion des ions, fondée sur leur moment ou leur énergie cinétique (instruments à secteur magnétique ou électrique)
- la séparation dans le temps, fondée sur la vitesse des ions (TOF)
- la transmission des ions traversant un champ électrodynamique (quadripôle)
- le mouvement périodique dans un champ magnétique ou électrodynamique (pièges ou trappes à ions)

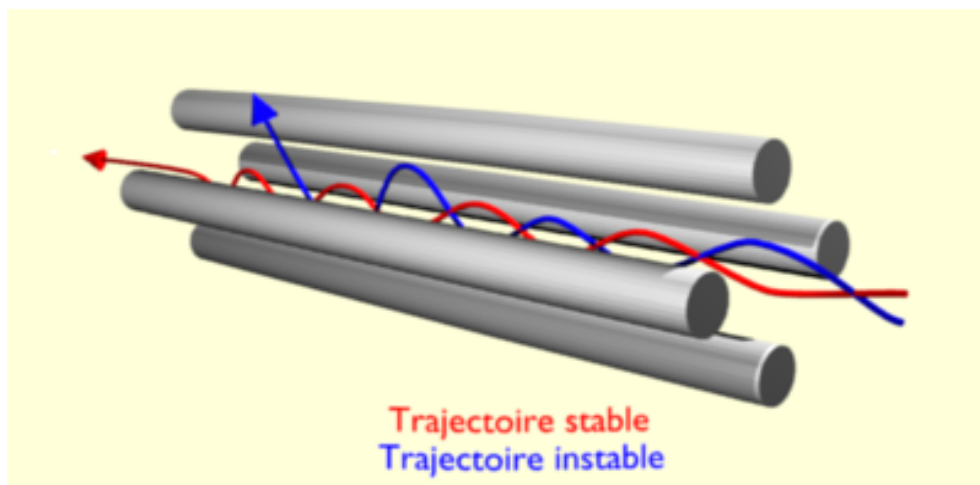


Figure 16 : Représentation du filtre quadripolaire et des deux trajectoires possibles des ions dans le quadripôle.

2.2.3. Le détecteur :

Les différents types de détecteurs possèdent le même rôle : compter les ions tout en étant basés sur des principes physiques différents. C'est une partie placée sous vide (10^{-5} - 10^{-7} Torr). Les deux principaux utilisés sont : le multiplicateur d'électrons et le multiplicateur de photons.

2.3. La spectrométrie de masse en Tandem :

La spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner un ion par un premier filtre de masse, à le fragmenter, puis à effectuer une deuxième sélection des ions par un autre filtre de masse placé en série. Elle peut être réalisée à l'aide d'appareils combinant des secteurs magnétiques, électriques, quadripolaires ou des temps de vol, mais aussi au sein d'un même analyseur dans le cas d'une trappe d'ions(77).

Seule l'analyse de type triple quadripôle, qui est la technique qui sera utilisé par la suite, ne sera développée ici.

2.3.1. Filtre quadripolaire: (fig 16)

Le filtre quadripolaire est composé de quatre barres métalliques reliées électriquement deux à deux et alimentées à la fois par du courant électrique alternatif et continu. Cette double alimentation électrique génère respectivement un champ de radiofréquence et électromagnétique(77). Deux possibilités peuvent se présenter :

- Soit l'ion entre en résonance avec les différents champs et sa trajectoire sera stable. Dans ce cas un ion de rapport m/z précis traversera le filtre et pourra être détecté.
- Soit la trajectoire de l'ion est instable et dans ce cas il est éjecté du filtre ou déchargé sur les barreaux et ne pourra donc pas être détecté.

Il est donc possible de sélectionner un ion à détecter en sélectionnant une combinaison de tension précise.

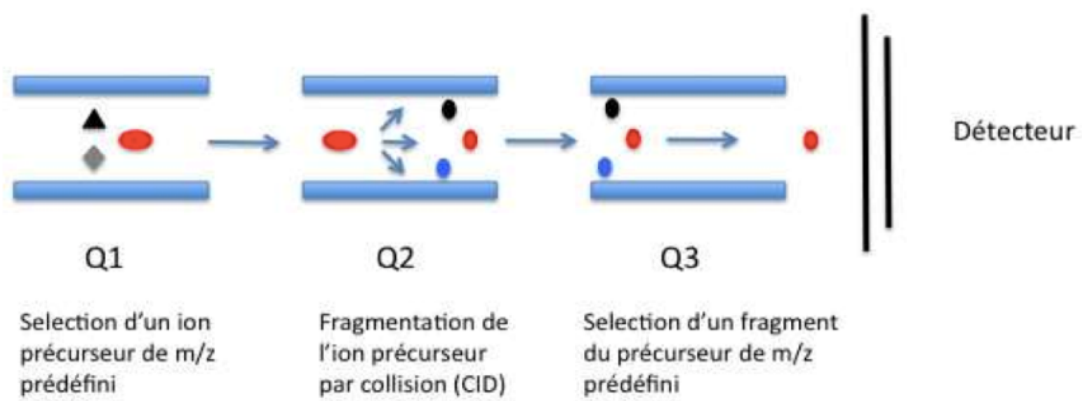


Figure 17 : Représentation schématique du fonctionnement en mode MRM du spectromètre de masse en tandem.

2.3.2. Le spectromètre de masse en tandem (77):

Il s'agit de l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision souvent constituée d'un quadripôle plus court. Cette combinaison de quadripôles permet de travailler en MS simple ou en tandem. Le premier et le troisième quadripôles sont des analyseurs susceptibles de séparer les ions tandis que le second correspond à une cellule de collision. Celle-ci est remplie d'un gaz inerte (argon par exemple) sous une pression relativement élevée. L'énergie cinétique de l'ion choisi est transformée lors de ses collisions successives en énergie interne. L'ion secondaire ou ion fils se formera lorsque son énergie interne sera devenue supérieure à l'énergie d'activation nécessaire à la fragmentation.

Les quadripôles peuvent être utilisés soit en mode :

- Statique c'est-à-dire qu'ils ne laissent passer qu'un ion à un rapport m/z donné.
- Balayage : ils laissent passer tous les rapports m/z d'une zone définie.

Cela permet plusieurs utilisations :

- Détermination de structure de petites molécules organiques ou biologiques : le troisième quadripôle laisse passer tous les ions formés par fragmentation d'un seul ion précurseur sélectionné par le premier quadripôle
- Identification structurale de métabolites d'une molécule : le premier quadripôle est en mode balayage et laisse passer les ions précurseurs présentant un ion fils fragment commun sélectionné par le troisième quadripôle.
- Amélioration de l'identification et quantification d'une molécule grâce au mode « *Selected reaction monitoring* » (SRM) ou « *multiple reaction monitoring* (MRM) » : un ou plusieurs ions sont sélectionnés par le troisième quadripôle à partir de la fragmentation d'un seul ion précurseur sélectionné par le premier quadripôle. La détection d'un ion précurseur et un de ses ions fragments correspond à une « transition ». Cette double sélection est très spécifique par combinaison de la valeur de m/z de la molécule à doser (précurseur) et de la valeur de m/z du fragment. Cela permet de diminuer le bruit de fond, ainsi le rapport signal/bruit obtenu est alors favorable à une diminution de la limite de quantification. (Fig17)

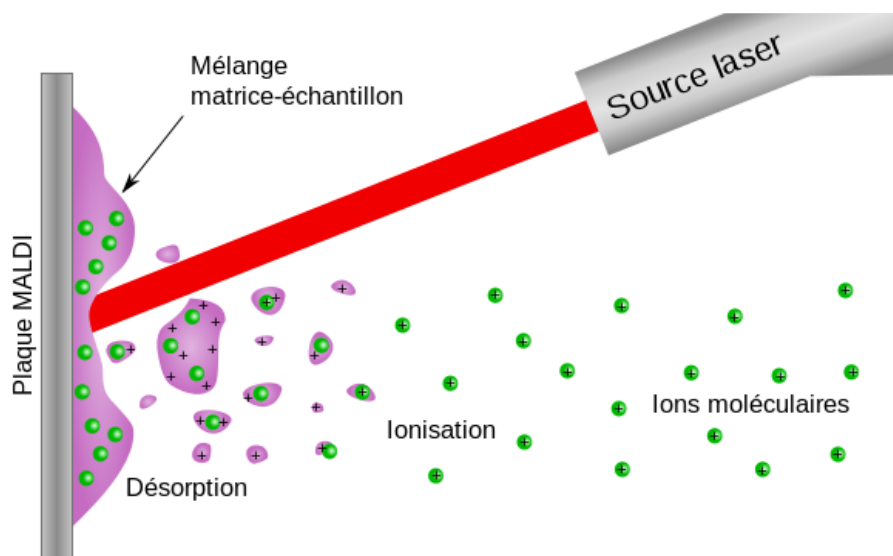


Figure 18 : Principe de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Un faisceau laser pulsé est utilisé, généralement dans le domaine des ultraviolets, pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon cocrystallisé sur une surface métallique, la cible.

2.4. Technique Maldi – TOF(78) (fig 18)

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (en anglais Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ou MALDI) est une technique d'ionisation douce utilisée en spectrométrie de masse, permettant l'analyse de biomolécules et les grosses molécules organiques qui tendent à devenir fragiles et à se fragmenter lorsqu'elles sont ionisées par des méthodes plus conventionnelles. L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Un laser UV (337 nm de longueur d'onde) d'azote (N₂) est pulsé en direction de la cible. La matrice ayant une grande réactivité pour l'absorption de la lumière UV absorbe l'énergie du laser protégeant ainsi les molécules protéiniques de la dégradation. L'énergie du laser produit deux phénomènes : tout d'abord, la matrice se vaporise libérant les peptides (désorption), ensuite, elle transfère ses protons à l'analyte qui s'ionise. Les ions peuvent être chargés positivement ou négativement selon leur nature. Les protéines et peptides ont des groupements accepteurs de protons et sont ionisés positivement. La spectrométrie à temps de vol est une technique séparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La séparation se fait entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à analyser. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression. Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions à atteindre le détecteur. Elles sont ainsi séparées en fonction de leur rapport masse/charge. Le détecteur envoie ensuite les informations enregistrées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre.

3. Analyse des peptides en spectrométrie de masse

L'intérêt de la mise au point de dosage de peptides ou biomarqueurs par méthode LC-MS/MS réside dans le fait qu'elles représentent une alternative potentielle aux méthodes d'immunoanalyse classiques. En plus de la capacité à réaliser plusieurs dosages dans la même analyse grâce à la séparation chromatographique, elles combinent spécificité analytique et fiabilité de la mesure de la concentration.

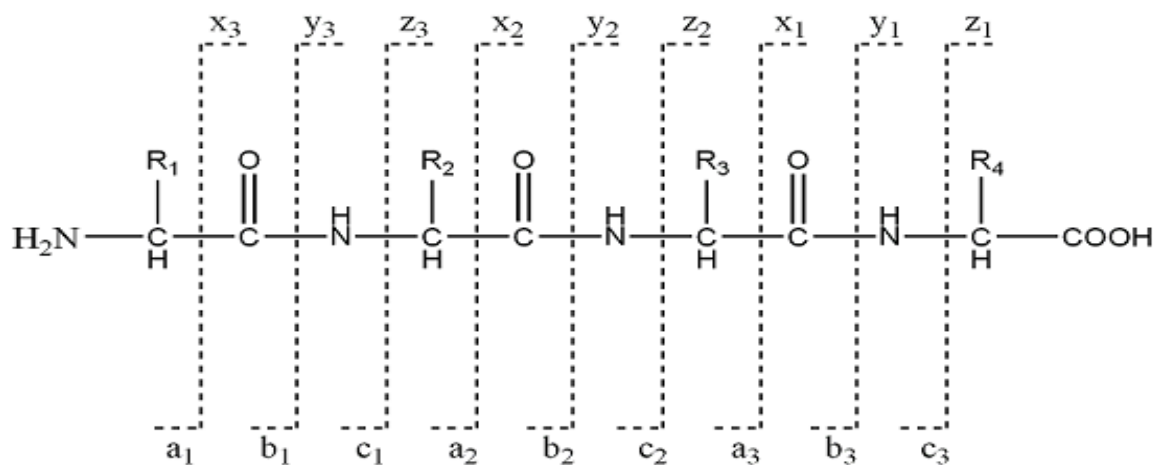


Figure 19 : Série de fragmentation. Les séquences polypeptidiques se clivent préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques. (Formation d'ions b et y) Il existe cependant des mécanismes complexes qui produisent d'autres types ruptures de liaison (formation des ions a, x, z et c), ce qui peut rendre difficile la lecture des spectres de masses et la détermination de la séquence.

Ion immonium

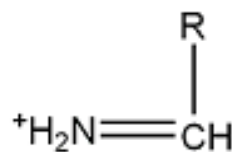


Figure 20 : Structure chimique d'un ion immonium.

3.1. Ions parents :

Contrairement aux médicaments dosés par cette même technique, il est courant de retrouver des ions précurseurs multichargés et donc plusieurs rapports M/Z pour une même molécule. En effet, en mode électrospray positif, les peptides possédant plusieurs sites accepteurs de protons peuvent être multichargés. Ceci rend possible la détection des grands peptides dans des régions basses de rapport m/z (compris entre 500-2000)(79). Il est possible de prédire la valeur m/z des ions précurseurs par calcul : pour cela il ne faut pas oublier que la molécule se ionise par ajout d'un ion H⁺ (masse molaire 1) donnant la formule suivant : (masse molaire +z)/z où z = 1, 2, 3, 4 ou 5.

3.2. Fragmentation :

Les peptides ou protéines se scindent en de très nombreux fragments de plus ou moins faible intensité. Il est possible de noter la présence de rapport m/z plus faible ou plus élevé, du fait de l'existence de ces multicharges, ce qui diffère de l'analyse des autres molécules où il est rare de rencontrer des ions fils avec un rapport m/z supérieur à celui de l'ion précurseur. Pour des raisons de stabilité, les séquences peptidiques se clivent préférentiellement au niveau des liaisons amides (peptidiques)(79). Mais de nombreux autres mécanismes complexes produisent d'autres types de ruptures rendant plus difficile la lecture des spectres de masses et le choix de l'ion fils le plus spécifique et pertinent. On peut définir, en fonction du lieu de cassure, différents types d'ions regroupés en série de fragmentation(80) (fig 19)

Pour une meilleure spécificité il est préférable de choisir des ions formés par la scission de la liaison peptidique et non ceux provenant des autres cassures. : Ions b et ions y.

Le piège à éviter est d'utiliser un ion immonium comme ion de quantification car ce sont des ions non spécifiques. Un ion immonium se forme lorsqu'il se produit une combinaison de fragmentation a et Y et possède un rapport m/z souvent inférieur à 200. (fig 20)

Tout comme pour les ions précurseurs, des logiciels aident aux choix des ions fils. C'est le cas des logiciels Intellistart® et UNIFI®.

Pour construire la méthode MRM, des ions pères et fils de plus haut rapport m/z permettent d'obtenir une plus grande spécificité.

4. Spécificité de l'analyse des peptides -Chromatographie :

Le problème majeur des peptides est une adsorption non spécifique de ces molécules sur les supports plastiques que ce soit les tubes de pré-traitement ou les tubulures du système chromatographique.

Partie 3 : Mise au point du dosage de l'hepcidine

1. Objectifs

L'objectif de notre travail est de mettre au point une méthode de dosage de l'hepcidine dans le sérum et plasma dans un premier temps, puis ensuite la valider selon les recommandations du comité français d'accréditation (COFRAC) et de l'European Medicines Agency (EMA). Cette technique sera utilisée pour l'analyse d'échantillons envoyés par le groupe de travail « hepcidine » de la SFBC dans le but de comparer les méthodes utilisées. Et si les résultats sont concluants, ce dosage pourra être utilisé en routine hospitalière.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Solutions mères :

Les poudres pures d'hepcidine et d'étalon interne choisi ont été commandées chez Pepta Nova GmbH (Germany). L'étalon interne correspond à une hepcidine isotopique possédant 18 carbones 13 au niveau des deux phénylalanines (position 4 et 9) et trois azotes 15 sur les deux phénylalanines et sur la glycine (position 12). Pour l'hepcidine non isotopique ou légère une solution stock a été préparée pour une concentration de 200 µg/ml à partir de 0.11 mg de poudre (lot 640601) repris dans 550 µL dans un mélange eau (70%)- acétonitrile (30%) – acide formique (0.1%). Puis la SS a été répartie en 10 aliquotes de 50 µL qui ont été congelés à -80°C. La même méthode a été appliquée pour l'EI (lot) à partir d'une poudre de 24 µg pour une concentration finale de solution stock de 48 µg/ml.

2.2. Préparation des échantillons :

2.2.1. Essais de mise au point :

Les essais de transitions indispensables à la mise au point du dosage sont réalisés sur des solutions d'hepcidine à 10 µg/ml. Cette concentration élevée par rapport à celles souhaitées pour réaliser la gamme permet de choisir les différents ions précurseurs et fils, de façon optimale.

2.2.2. Gamme d'étalonnage pour quantification

Huit solutions d'hepcidine dans un mélange eau (70%) acétonitrile (30%) acide formique 0.1% à des concentrations 5 fois celles souhaitées dans le sérum ont été réalisées. Ceci permet d'obtenir les points de gamme par dilution au cinquième de ces solutions dans du sérum de chèvre. Notre choix de matrice s'est porté sur le sérum de chèvre car celui-ci est dépourvu en hepcidine 25 tout en gardant une composition proche d'un sérum humain. Ceci permet d'obtenir une gamme d'étalonnage passant par l'origine, contrairement à un sérum humain pour lequel il aurait fallu substituer l'hepcidine déjà présente.

Point de gamme	0	1	2	3	4	5	6	7
Concentration – solution (ng/ml)	0	10	20	50	100	200	400	600
Concentration finale dans sérum (ng/ml)	0	2	4	10	20	40	80	120

Tableau 3 : Concentrations des différents de points de gamme.

2.2.3. Contrôles

Les contrôles sont au nombre de 3 et permettent de cibler les valeurs basses, moyennes et hautes et ont pour but de démontrer la fidélité de la mesure. Ils sont préparés à partir des solutions d'hepcidine humaine envoyées par le laboratoire de Biochimie de l'hôpital Louis Mourier. Ceci permet de s'affranchir d'un biais dans la préparation des solutions qui ont donc été réalisées à partir de 2 lots différents et par 2 personnes différentes.

Point de contrôle	1	2	3
Concentration – solution (ng/ml)	25	150	500
Concentration finale dans sérum (ng/ml)	5	30	100

Tableau 4 : Concentrations des différents de points de contrôle.



Figure 21 : spectromètre type TDQ (WATERS®) couplé à un système chromatographique de type UPLC-Acuity (WATERS®) avec module OSM.

2.2.4. Préparation des points de gamme et échantillons pour quantification :

25µL de solution – gamme/contrôles sont ajoutés à 100 µL de sérum de chèvre (Sigma - Aldrich®) pour obtenir par dilution au 1/5 la concentration sérique souhaitée, ainsi que 25 µL de solution d’EI indispensable pour une reproductibilité du dosage. Pour chaque point, un prétraitement par acide trichloroacétique à 10 % permet de précipiter les protéines tout en préservant les petits peptides. Après centrifugation 15 min à 10900 rpm, une solution limpide est obtenue, 50µL placés dans des vials sont injectés dans le spectromètre. Pour les échantillons-patient, le même procédé est réalisé de façon à se placer dans les mêmes conditions que les points de gamme. 100µL de sérum sont additionnés de 25 µL d’un mélange eau-acétonitrile –acide formique, même solvant que les solutions contrôle et gamme exempt d’hepcidine et 25µL de solution d’EI.

2.3. Appareil :

Pour réaliser la mise au point du dosage ainsi que sa validation et l’analyse de 10 solutions tests fournis par le groupe de travail sur l’hepcidine, il a été choisi de travailler sur un spectromètre type TDQ (WATERS®) couplé à un système chromatographique de type UPLC-Acquity (WATERS®). En effet, un essai sur un couplage HPLC (ALLIANCE 2795 HT -WATERS®) à un spectromètre de masse de première génération de type QUATTRO MICRO ne s’était avéré pas assez sensible pour obtenir des valeurs situées dans les valeurs biologiques normales décrites dans différentes publications.

2.3.1. Présentation de l’appareil : fig 21

Le détecteur de masse TQD (Waters) est un spectromètre de masse triple quadripolaire développé pour les applications quantitatives issues du couplage UPLC/MS-MS. Ce couplage permet d’obtenir des limites de détection basses ainsi que d’excellentes résolutions chromatographiques tout en diminuant la durée d’analyse. Dans notre étude, en plus des différentes parties présentes normalement, un module OSM (online –solid phase extraction manager) a été ajouté et permet de réaliser la phase de préparation d’échantillons de façon connectée et automatisée.

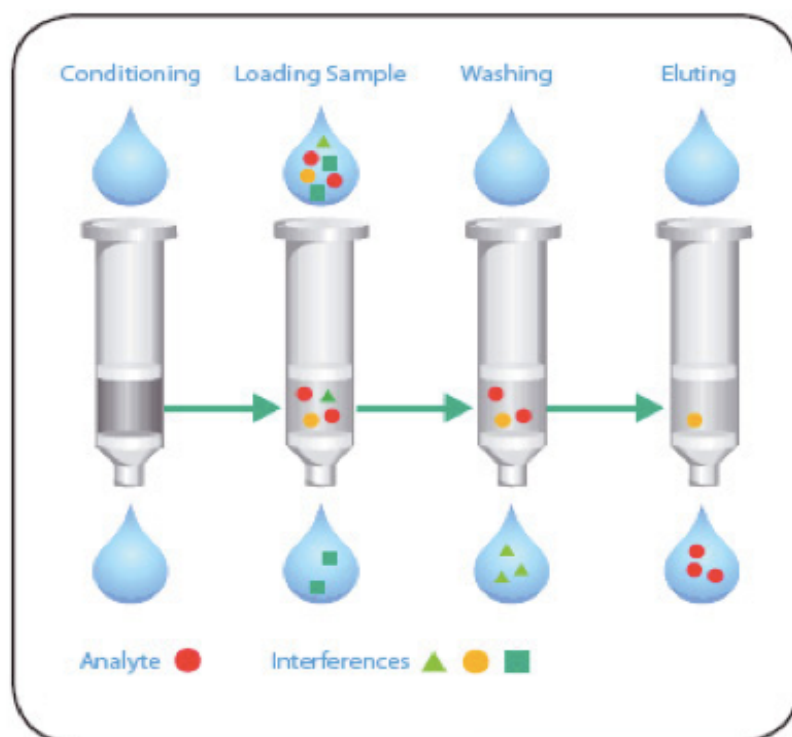


Figure 22 : Principe de l'extraction en phase solide

2.3.2. Rappel sur la SPE : extraction en phase solide (fig 22)

L'extraction en phase solide est basée sur le partage des composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase stationnaire, l'adsorbant. Le choix de l'adsorbant sera essentiel pour permettre de sélectionner les composés d'intérêt de manière la plus efficace possible. Ces adsorbants peuvent être de différents types : silice ou polymères. Comme pour les phases stationnaires utilisées pour la chromatographie liquide, les supports sont de 4 types et permettent de travailler en mode :

- Phase inverse : silice greffé par des groupements hydrophobes
- Phase normale : greffés par des groupements cyano et diols
- Échanges d'ions : en fonction du greffon il s'agira d'échanges d'anions ou de cations
- Mixte : double greffage : hydrophobe et échanges d'ions.

Le processus d'extraction se compose de quatre étapes :

- Conditionnement : Il permet de mouiller le support au moyen d'un solvant organique et d'activer les sites de rétention.
- Dépôt d'échantillons
- Lavages : visant à éliminer des interférents faiblement retenus
- Elution du composé d'intérêt.

Ce module ne sera utilisé que pour la réalisation des dosages à partir des solutions sériques, mais pas pour les premières étapes de mise au point à partir des solutions pures.

2.3.3. Chromatographie :

La séparation chromatographique s'effectue grâce à une colonne ACQUITY UPLC® CSH-130Å C18 1.7 µm (2.1x100 mm) optimisée pour la séparation des peptides. En effet, une porosité de 130Å des billes de silices de 1.7 µm permet une meilleure diffusion des peptides. La colonne est placée dans une enceinte thermostatée à 45°C. Concernant les phases mobiles utilisées, il a été décidé de travailler avec un débit de 300 µL/min et un gradient d'élution

débutant à 95% de phase A : mélange eau et acide formique (0,1%) et 5% de phase B : mélange acétonitrile et acide formique (0,1%) et évoluant vers un ratio inversé de 85% de phase B et 15% de phase A en 4 min suivi d'un retour aux conditions de départ en 2 min. Les données sont résumées dans les tableaux suivants.

Temps en min	Débit en ml/min	% de phase A	% de phase B
0	0.300	95	5
0.5	0.300	95	5
4	0.300	15	85
5	0.300	95	5
5.10	0.300	95	5

Tableau 5 : évolution du gradient d'élution au cours de notre chromatographie.

2.4. Détermination des transitions :

Elle est réalisée à l'aide d'une solution pure d'hepcidine concentrée à 10µg/ml qui sera injectée directement dans le spectromètre. La même méthode est utilisée pour l'EI.

L'ion père est déterminé en utilisant le mode MS-SCAN : Dans ce mode, l'ensemble de la gamme de masse est balayée afin de trouver un rapport M/Z correspondant à la molécule recherchée. Une variation de la tension de cône permet de retenir la valeur pour laquelle l'ionisation la plus stable est obtenue.

L'ion fils est déterminé en utilisant le mode DAUGHTER-SCAN. Dans ce mode, un ion parent de rapport m/z donné est sélectionné. Il est fragmenté puis l'ensemble de la gamme de masse est balayée pour analyser les ions fils produits. Une variation de l'énergie de collision permet de définir celle donnant la fragmentation la plus stable et intense. L'ion fils le plus intense servira pour la quantification tandis qu'un (ou plusieurs) autre pourra être sélectionné

comme ion de confirmation. Le choix des 2 transitions permet de construire une méthode MRM « multiple réaction monitoring » spécifique de la molécule.

2.5. Quantification :

En chromatographie, l'aire du pic d'une molécule est proportionnelle à la quantité injectée de ce composé. Ainsi, une concentration peut être déterminée en utilisant une courbe de calibration par régression linéaire du rapport entre aire de l'hepcidine et l'aire de l'étalon interne. Ce ratio permet de s'affranchir des variations sur les rendements d'extraction, les volumes d'injection ou sur les variations de la source. Il a été choisi d'utiliser un isotope de l'hepcidine comme étalon interne ne différant du composé « léger » seulement par sa masse (2810 Da versus 2789 Da) et donc par la masse des ions formés au niveau du spectromètre.

Les données sont acquises via le logiciel Masslynx® qui les transforme en résultats directement utilisables :

- Intégration des pics,
- Tracés de la courbe d'étalonnage : calcul de l'équation de la droite, du coefficient de corrélation
- Exactitude des contrôles rendue en pourcentage de déviation
- Calculs de la concentration des échantillons testés.

2.6. Validation de la méthode

Il est important d'utiliser une méthode analytique correctement validée pour obtenir des résultats fiables qui pourront être ainsi interprétés de façon satisfaisante. Les critères de validation comprennent la spécificité, sélectivité, répétabilité, reproductibilité, exactitude, linéarité, limite de détection/quantification, ainsi que des essais de stabilité. Cette validation a pour but de démontrer la fiabilité et reproductibilité des résultats. Elle s'appuie sur :

- les exigences de la norme ISO 15189 en utilisant comme documents de référence les guides techniques d'accréditation de la section Santé Humaine du COFRAC: SH-GTA-04 : validation des méthodes, SH-GTA-14 : incertitudes de mesure.

- les critères nécessaires pour valider une méthode de bio-analyse décrits par le « guideline on bioanalytical method validation » émis par l'European Medicines Agency (EMA). Ce guide apporte des éléments et renseignements plus spécifiques aux dosages réalisés par technique chromatographique.

2.6.1. Gamme d'étalonnage :

Il est préférable de réaliser une gamme dans une matrice proche de celle utilisée pour chez les patients. Elle doit être composée d'au moins 6 points et d'un blanc (matrice dépourvu de l'analyte). Ceci correspond au nombre de points suffisant pour définir la relation entre la concentration de la molécule dans la matrice et la réponse correspondante du détecteur. Le point le plus bas de la gamme doit correspondre à la limite de quantification. Pour qu'une gamme soit valide il faut :

- l'ordonnée à l'origine doit être non statistiquement différente de 0
- le coefficient de corrélation non statistiquement différent de 1 ($r^2 > 0.99$)
- l'erreur relative pour chaque point doit être < 15 : il correspond à la comparaison des concentrations calculées (Ccal) aux concentrations ajoutées (Cref) selon la formule :

$$ER (\%) = ((C_{ref} - C_{cal}) / C_{ref}) \times 100$$

2.6.2. Fidélité (ou précision)

Elle regroupe la répétabilité ou fidélité intra-jour et la reproductibilité ou fidélité inter-jour ou encore fidélité intermédiaire. L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour la même analyse dans des conditions standardisées : même procédure de mesure, même opérateur, même système de mesure, mêmes conditions de fonctionnement, même lieu pendant une courte période de temps. Cette évaluation a pour objet de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement du système analytique. Les données acquises peuvent être ultérieurement utilisées pour mettre en évidence un dysfonctionnement au cours du temps. L'essai de reproductibilité consiste à analyser un même échantillon dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents. Cette évaluation permet de connaître la variabilité

analytique d'une méthode. Ces données sont exploitées pour le calcul de l'incertitude de mesure utile à l'interprétation des résultats de patients. La fidélité est évaluée à l'aide des coefficients de variation calculés à partir des résultats des contrôles en utilisant un test d'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais ANOVA : analysis of variance). C'est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population. Il est réalisé par l'intermédiaire du logiciel Xlstat.

Il est utilisé 3 niveaux de contrôles : un point bas de gamme, un moyen de gamme et un haut de gamme auxquels est ajoutée la LOQ. Ils sont préparés à partir des solutions d'hepcidine humaine envoyées par le laboratoire de Biochimie de l'hôpital Louis Mourier donc une solution mère différente de celle utilisée pour les points de gamme. Ces contrôles et la LOQ sont analysés 5 fois par jour pendant 3 jours successifs. Pour chacun d'entre eux, la concentration moyenne, l'écart type, le coefficient de variation et le biais ($100 \times (C \text{ mesurée} - C \text{ cible}) / C \text{ cible}$) sont calculés. Un test d'Anova est réalisé pour chaque niveau de contrôles afin de déterminer :

- la répétabilité : CV intra-jour
- la reproductibilité : CV inter-jour et CV intra-jour.

Ces coefficients doivent être inférieurs à 15 %, sauf pour la LOQ où ceci peut être < 20%.

2.6.3. Limite de quantification :

Elle représente la plus petite quantité d'analyte être quantifiée. Elle est déterminée expérimentalement en réalisant 5 dosages pour des concentrations faibles et correspond au point le plus bas pour lequel la répétabilité, la reproductibilité et le biais sont < 20 %. La limite de détection est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée et correspond à trois fois le blanc.

Dans notre cas, il n'est pas nécessaire de déterminer la LOD puisque les résultats < à la LOQ seront rendus sous forme : concentration < LOQ en ng/ml et on considère donc ici que la LOQ= LOD.

2.6.4. Contamination :

Sur les trois jours de validation, un blanc constitué d'acétonitrile exempt d'hepcidine et d'étalon interne a été injecté directement après le point de gamme le plus haut. Les aires des deux molécules au niveau du blanc sont alors comparées avec celles trouvées dans la LOQ. Le rapport des aires blanc / LOQ ne doit pas excéder 20 % pour la molécule et 5% pour l'étalon interne.

2.6.5. La justesse

Une étude de justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible. L'écart observé correspond au biais. Le biais ne peut être établi qu'à l'aide de l'externalisation des CIQ. En absence d'externalisation des CIQ, le laboratoire établit l'inexactitude de sa méthode en comparant les valeurs obtenues sur des échantillons d'EEQ aux valeurs cibles. Selon le SH –GTA 06 : « Pour les examens pour lesquels il n'existe pas d'EEQ organisée et pertinente, le laboratoire met en place un autre moyen d'évaluation de la justesse et/ou de l'exactitude :

- Par une comparaison avec d'autres laboratoires avec un échange d'échantillons,
- Par analyse d'un matériau de référence de pureté connue
- Par la comparaison avec une méthode de référence.

Dans ces conditions le laboratoire formalise les limites acceptables en tenant compte des exigences analytiques et clinico-biologiques. »

Il a été décidé de réaliser une comparaison inter-laboratoire avec le laboratoire où sont envoyés pour le moment les dosages demandés par les cliniciens (Louis Mourier). Lorsqu'un dosage d'hepcidine est demandé par un service, une partie de sérum est envoyée au laboratoire sous-traitant et la deuxième partie nous sert à réaliser un dosage par notre technique. Les résultats des 10 EEQ du groupe d'étude de la SFBC seront ajoutés à cette comparaison des deux laboratoires.

Les deux séries de résultats seront comparées par régression linéaire tout en sachant que le laboratoire de l'hôpital Louis Mourier utilise aussi une méthode LC-MS/MS et utilise les mêmes transitions que nous. De plus, ils ont été un des premiers centres à publier une

méthode de dosage de l'hepcidine avec une validation de celle –ci. Le calcul du coefficient de corrélation ne s'applique qu'à des variables indépendantes pour démontrer un lien entre deux variables x et y. Ce n'est pas le cas lors d'une comparaison de technique. La valeur du coefficient de corrélation n'a donc pas d'intérêt pour la comparabilité des deux méthodes. Les données pertinentes sont apportées par l'équation de la droite de régression dont la pente et l'ordonnée à l'origine exprimeront la similitude des méthodes comparées (similitude optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0). Pour chacun des couples retenus x_i (valeurs Louis Mourier) et y_i (valeurs Bordeaux) sont calculés :

- les différences des valeurs absolues $x_i - y_i$
- les rapports $(y_i - x_i) / x_i$ correspondant à la différence en pourcentage

Puis il sera établi les graphiques des différences, $(x_i - y_i)$ fonction de x_i et $((y_i - x_i) / x_i)$ fonction de x_i .

Ces valeurs seront comparées à des valeurs admissibles qui ont été définies arbitrairement en tenant compte de l'impact de ces variations sur la pertinence du résultat et en se basant sur les recommandations de la SFBC pour d'autres paramètres.

	Valeurs du CQI correspondant en ng/mL	Différence admissible en valeur absolue	Différence admissible en %
Niveau bas	5	1.5	30
Niveau moyenne	30	6	20
Niveau haut	100	15	15

Tableau 6 : Différences admissibles pour la comparaison interlaboratoire en valeurs absolues et en pourcentage en fonctions du taux d'hepcidine.

2.7. Participation à l'étude de la société française de biologie clinique :

10 sérums ont été aliquotés et chaque laboratoire participant à cette étude ont reçus 10 aliquotes de 500 μ L. Chaque participant doit, après avoir mis au point une méthode, doser les 10 « EEQ » sans connaître les résultats obtenus par les autres équipes. Puis ceux-ci ont été

envoyés au laboratoire du CHU de Rennes qui assure la comparaison des résultats par méthode statistique. Puis les résultats de cette étude sont renvoyés par mail à chaque laboratoire en précisant le phénotype biologique ainsi que certains paramètres biochimiques dosés en parallèle par le laboratoire de Rennes. Ces 10 EEQ sont traités comme des échantillons patients et seront tous analysés trois fois sur trois jours différents au sein d'une série comprenant une gamme d'étalonnage et quatre contrôles (comprenant la LOQ). Les résultats obtenus par les différents centres sont comparés en utilisant le z-score.

Le Z-score est une grandeur sans unité, calculé par la formule suivante :

$$z = \frac{X - \mu}{\sigma} \quad \square$$

Où x est le résultat du laboratoire et μ la moyenne du groupe de participants et σ : l'écart – type. Il donne l'écart relatif entre la valeur mesurée et la valeur cible (moyenne du groupe de participant). Le Z-score est un indicateur de performance du laboratoire par rapport aux autres.

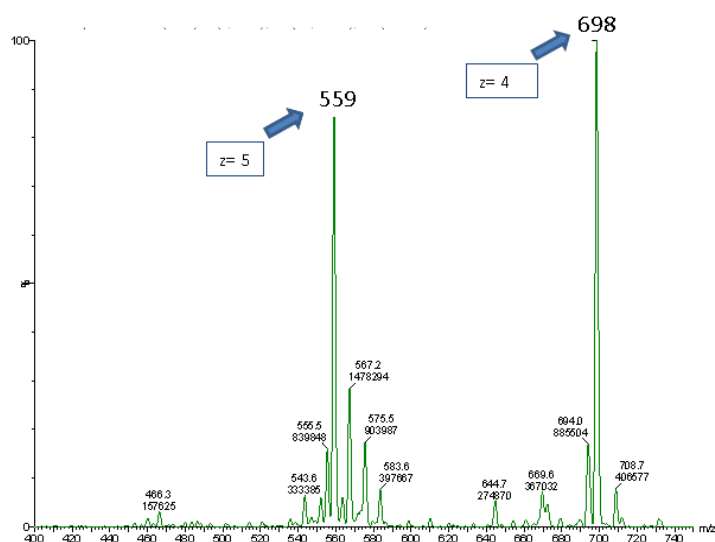


Figure 23 : spectre de masse des ions précurseurs de l'hépcidine 25. Il est possible de distinguer deux rapports m/z de la molécule.

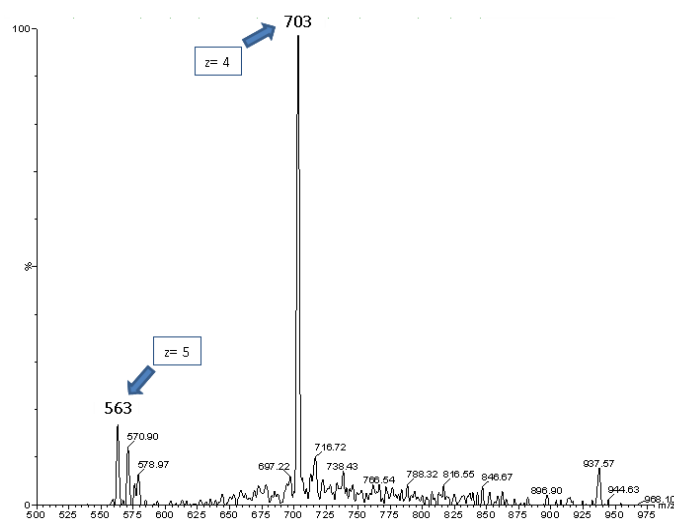


Figure 24 : Spectre de masse des ions précurseurs de l'EI.



Figure 25 : Représentation de la fragmentation de l'hépcidine. Les ions 354 et 1040 correspondent respectivement à l'ion b23 et y19.

Partie 4 : Résultats

1. Mise au point du dosage

1.1. Choix des transitions: ion père et fils

En mode MS-SCAN puis en mode Daughter –SCAN, les transitions pour l’hepcidine légère et pour l’hepcidine lourde ont été définies tout en recherchant les tensions de cônes et énergies de collision optimales.

1.1.1. Ions précurseurs: (fig 23, 24, 25)

Un seul pic chromatographique a pu être observé après injection de solution pure au niveau du système LC. A son niveau, deux rapports m/z ont été identifiés par notre technique pour chaque molécule, ils correspondent à :

	rapport m/z hepcidine	rapport m/z EI
$z=5$	559	563
$z=4$	698	703

Tableau 7 : Ions précurseurs obtenus pour les deux molécules.

L’ion 698 a donc été préféré car plus stable et présentant une intensité plus importante.

1.1.2. Ions fils : (fig 26 et 27)

Deux ions ont été retrouvés de façon constante sur plusieurs essais de fragmentation et pour différentes énergies de collision prouvant ainsi leur stabilité et ceci malgré une fragmentation complexe. Le choix de ces deux ions a été conforté par le fait que l’ion 354 est un fragment b et l’ion 1040 est un fragment y.

Pour l’EI le même ion 354 a aussi été choisi comme ion de quantification du fait de sa stabilité. Le fait que les deux molécules aient les mêmes ions fils ne s’est pas avéré être un problème puisque aucune interférence des transitions n’a été observée. Pour cela les deux

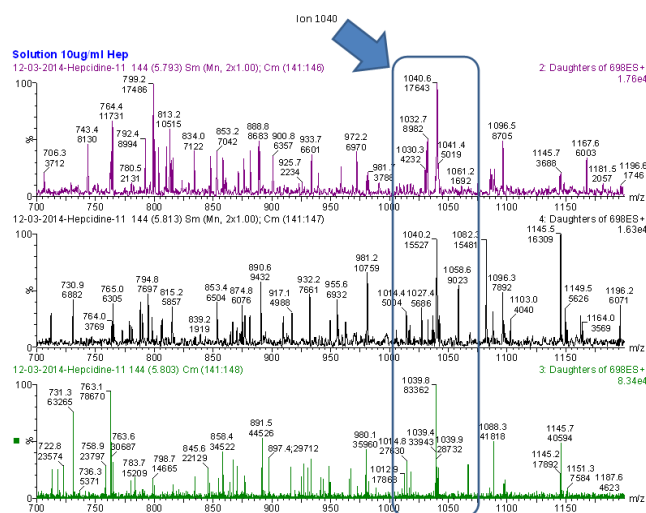


Figure 26 : Spectre de masse des ions fils de l'hepcidine après sélection de l'ion précurseur 698 pour différentes énergies de collision. L'ion 1040 (ion z) a été choisi pour sa stabilité.

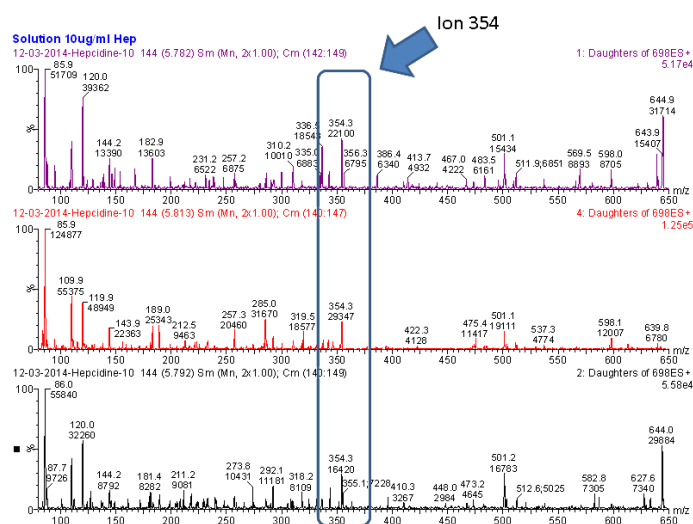


Figure 27 : Spectre de masse des ions fils de l'hepcidine après sélection de l'ion précurseur 698 pour différentes énergies de collision. L'ion 354 (ion b) a été choisi pour sa stabilité.

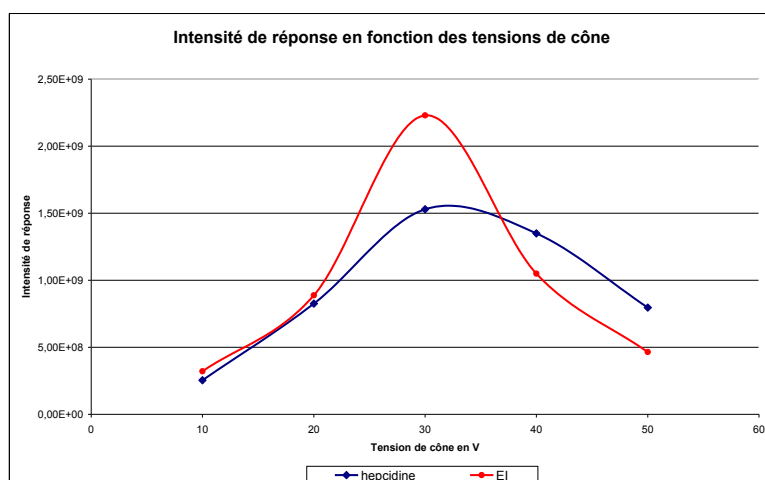


Figure 28 : Détermination de la tension de cône optimale pour l'hepcidine 25 et l'EI.

molécules ont été injectées séparément et elles n'ont induit que des signaux négligeables au niveau de l'analyte absent.

1.1.3. Tension de cône et énergie de collision: (fig 28 et 29)

Différentes tensions de cônes et énergie de collision ont donc été testées. Les déterminations de la tension de cône et de l'énergie de collision se font de telle sorte que l'on obtienne le maximum de réponse pour l'ion sélectionné.

Le choix de tous les paramètres est résumé dans le tableau suivant.

Molécules	Masse molaire (g/mol)	Ion précurseur sélectionné	tension de cône choisie (volt)	Ions fils sélectionnés	Energie de collision (électron volt)	Temps de rétention (min)
hepcidine	2789	698	30	354	30	2,2
				1040	30	
EI	2810	703	30	354	25	2,2

Tableau 8 : tableau récapitulatif des transitions, énergies de collision et tensions de cône choisies pour l'hepcidine et son étalon interne.

1.2. Problèmes de spécificité survenus lors de la mise au point :

Lors de la mise au point du dosage plusieurs problèmes ont été rencontrés et ceci à plusieurs niveaux que ce soit au niveau de la spécificité, la quantification ainsi que sur la sensibilité et l'obtention d'une limite de quantification souhaitable. Il existe dans les échantillons biologiques utilisés pour le dosage une haute abondance de peptides et protéines pouvant possiblement interférer avec notre molécule d'intérêt. Ces substances dites « interférentes » altèrent le signal de mesure et peuvent entraîner des résultats erronés. Le choix des transitions ainsi que la préparation des échantillons sont des causes possibles à ce type d'anomalies. Comme il a été décrit pour les peptides, la fragmentation de l'hepcidine et de son étalon

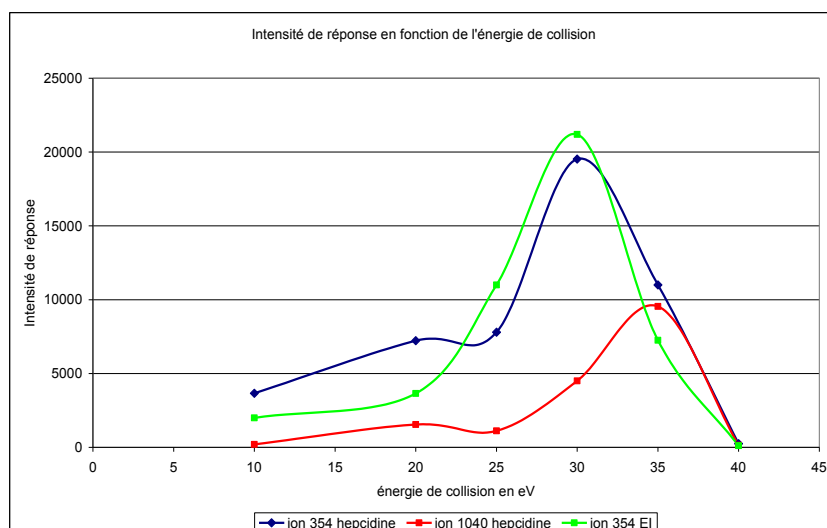


Figure 29 : Détermination de l'énergie de collision optimale pour les trois ions fils sélectionnés.

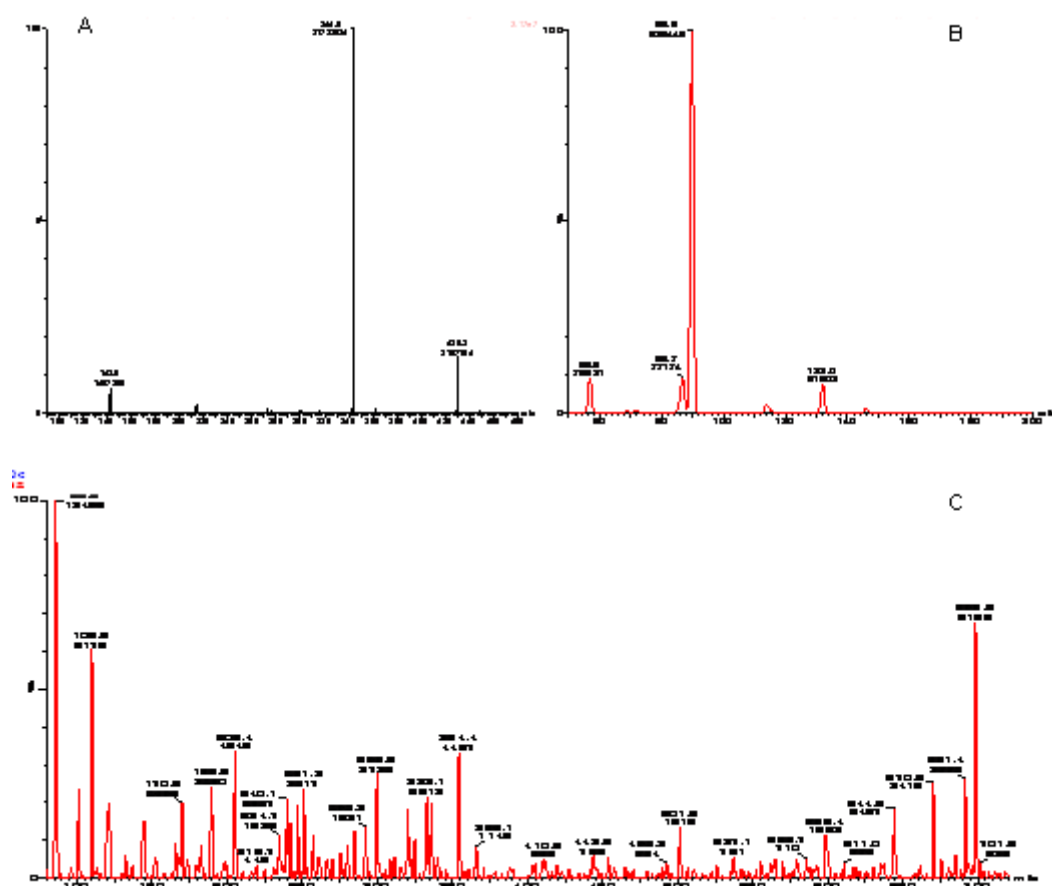


Figure 30 : Comparaison de différentes fragmentations pour un antirétroviral : l'elvitegravir (A), pour la créatine butylée : tripeptide dérivatisé par du butanol (B) et l'hepcidine (25). Une fragmentation beaucoup plus complexe est observée pour le peptide de 25 acides aminés.

interne est aléatoire et induit de nombreux ions de faible intensité rendant le choix des ions de quantification et de confirmation difficile. (fig 30).

Pour augmenter la spécificité du dosage, il est préférable d'utiliser des transitions avec m/z élevés. En effet, plus l'ion choisi à un m/z fort, plus il correspond à un enchainement important de plusieurs acides aminés. La probabilité qu'un même fragment soit commun avec plusieurs molécules diminue quand le nombre d'acides aminés le constituant augmente. De plus, les faibles rapports m/z correspondent parfois à des ions immoniums.

Nous avons pu ainsi observer l'effet de ceci sur la spécificité analytique. En effet, des ions 86, 110 et 120 étaient présents à de fortes intensités et à de nombreuses reprises. Ces ions correspondent à des ions immoniums formés à partir de l'isoleucine (86), l'histidine (110) et de la phénylalanine (120). Devant leurs fortes intensités et leur présence quasi-constante lors des essais de fragmentation, certains ont été choisis comme ions de quantification. Mais lors des essais sur matrice sérique, il a été noté des aberrations au niveau des faibles valeurs de la gamme. Normalement, le ratio entre les ions de quantification et de confirmation est constant pour les différentes concentrations de l'analyte : du fait de l'augmentation proportionnelle des aires des deux transitions. Lorsque l'ion 110 était choisi :

- le ratio 110/354 variait entre les faibles valeurs (3 premiers points de gamme) et les autres points.
- La courbe d'étalonnage n'était plus linéaire.
- Le pic chromatographique pour la transition 698>110 était de 2.27 min alors que pour l'autre transition 698>354 et celle de l'étalon interne restait à 2.22 min.

Tout ceci témoigne donc d'un manque de sélectivité de ces transitions provoquant des interférences au niveau de notre méthode de dosage. C'est pourquoi, les ions 354 et 1040 ont été choisis. Bien qu'ils ne possèdent pas une aussi forte intensité que les ions immoniums, ces ions b et y se sont avérés beaucoup plus spécifiques. Aucune interférence n'a été mise en évidence, même entre elles alors qu'elles possèdent un ion fils commun. Ce problème de sélectivité peut aussi venir de la méthode de préparation des échantillons. Nous réalisons une précipitation des protéines dans le but de les éliminer au maximum et de minimiser les altérations de notre signal. Tout en obtenant un échantillon « propre », une bonne méthode de préparation permet de gagner en sensibilité avec le moins de perte possible de la molécule d'intérêt lors des étapes de pré-traitement.

Correlation coefficient $r = 0.999096$, $r^2 = 0.998194$
Calibration curve: $0.0219808 \times x + -0.0129702$

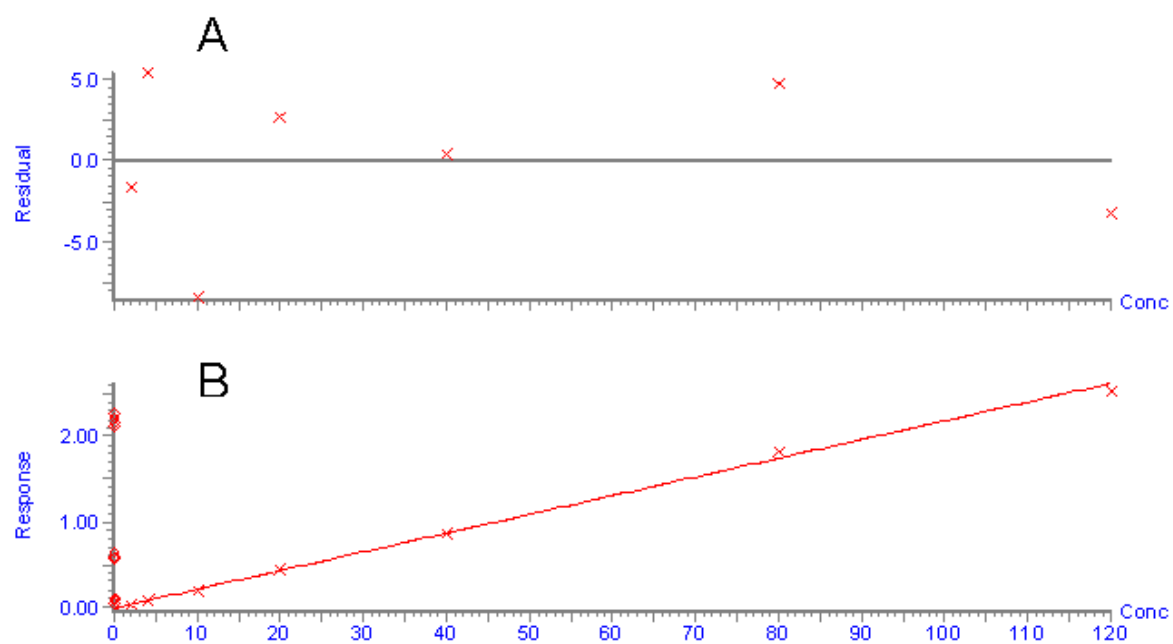


Figure 31 : Exemple de gamme d'étalonnage obtenue lors de la validation de méthode

2. Validation de la méthode

2.1. Gamme d'étalonnage :

Après avoir sélectionné nos transitions, une gamme d'étalonnage en neuf points a été étudiée de 0 ng/mL à 120 ng/mL. Ces concentrations ont été choisies pour couvrir les valeurs physiologiques et pathologiques. Elles ont dû être modifiées du fait que le point à 1 ng/mL ne présentait pas un CV < 20 %. Les points choisis sont donc 0-2-4-10-20-40-80-120 ng/mL.

Pour réaliser l'étude de fidélité, trois gammes ont été effectuées et les résultats obtenus pour les valeurs des points de gamme, de la pente, du coefficient de corrélation et de l'intercept (ordonnée à l'origine) ont été comparés. (fig 31)

standard	Jour 1	Jour 2	Jour 3	moyenne	SD	CV (%)	Biais (%)
2	2	1,9	2,4	2,1	0,26	12,60	5,00
4	4,2	3,8	4,4	4,1	0,31	7,39	3,33
10	9,2	11,3	10,1	10,2	1,05	10,33	2,00
20	20,5	18,7	22	20,4	1,65	8,10	2,00
40	40,2	40,8	38	39,7	1,47	3,72	-0,83
80	83,5	79,4	79,2	80,7	2,43	3,01	0,88
120	116,1	119,4	133,8	123,1	9,41	7,65	2,58
pente	0,022	0,015	0,017	0,018	0,004		
intercept	0,600	0,200	0,645	0,482	0,245		
r²	0,998	0,998	0,996	0,997	0,001		

Tableau 9 : Comparaison des trois gammes d'étalonnage utilisées pour la validation de méthode.

Nos résultats répondent aux critères de validation : $r^2 > 0.99$ et % de déviation < 15% pour tous les points de la gamme.

2.2. Détermination de la limite de quantification

Nous avons défini arbitrairement notre LOQ à 2 ng/ml puisque sur 5 passages à partir de 5 échantillons à cette concentration, le coefficient de variation obtenu était inférieur à 20%. Il a donc été envisagé de diminuer cette LOQ, en testant des solutions à plus faible concentration. Les résultats obtenus n'ont pas été concluant puisque pour des valeurs <2 ng/ml les CV ou exactitudes étaient tous > 20%. La sensibilité de notre technique reste donc à améliorer car elle ne couvre pas entièrement les valeurs physiologiques rapportées par la littérature.

2.3. Essai de fidélité :

Les essais ont été réalisés trois jours de suite, avec 5 passages de 3 niveaux de contrôle et la LOQ. Cela a permis de définir les CV intra-jour et inter jour selon la technique Anova. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

	LOQ	QC1	QC2	QC3
concentration en ng/ml	2	5	30	100
CV intra-jour	10,40	6,47	4,12	2,3
CV inter -jour	12.89	5,96	4,76	2,1

Tableau 10 : Résultats obtenus pour l'essai de fidélité : CV- intra et inter –jour.

Les Cv intra-jour représentant la répétabilité et les CV inter-jour représentant la reproductibilité sont tous inférieurs à 15 % même pour la LOQ où il est toléré jusqu'à 20%. Ceci nous conforte dans la fidélité de la méthode et constitue une manifestation de la robustesse de celle-ci.

2.4. Contamination :

Aucune contamination que ce soit par l'hepcidine ou par son étalon interne n'a pu être mise en évidence avec des aires nulles pour l'hepcidine et l'étalon interne dans le blanc. Cette opération a été réalisée cinq fois avec pour chaque passage le même résultat obtenu. Pour notre amplitude de concentration, nous pouvons conclure qu'il n'existe pas de carry-over.

2.5. Valeurs normales au sein du laboratoire

Des normes ont été établies au sein du laboratoire à partir de sérums de 31 sujets sains (14 hommes, 17 femmes) de 13 à 83 ans prélevés de préférence le matin (entre 7h30 et 10h30 du matin) et ayant des paramètres du métabolisme ferrique normaux, une créatinine normale et une protéine C-réactive normale. En partant du principe que la distribution de la population est gaussienne, les valeurs de référence seront données par l'intervalle $[m-2s ; m+2s]$.

Les valeurs obtenues pour les deux sexes sont :

- femmes : 9,6 ng/mL avec un écart-type de 3,9 ng/mL
- hommes : 12 ng/mL avec un écart-type de 4,9 ng/mL

Même si la valeur moyenne trouvée chez les femmes est très légèrement inférieure à celle des hommes, un test de Student (avec un risque $\alpha = 0,05$) n'a pas montré de différence significative entre les taux d'hepcidine observés chez les hommes et chez les femmes. Nous avons donc calculé une moyenne et un écart-type global pour les deux sexes.

La moyenne obtenue m est de 11.30 ng/mL et l'écart-type s est de 5,7 ng/mL

Comme précisé dans le guide d'accréditation du COFRAC , toutes les valeurs $> m + 2s$ et $< m - 2s$ ont été écartées et la moyenne et l'écart-type (écart-type tronqué) ont été recalculés à partir des valeurs ainsi retenues. Une seule valeur répondait à ces critères d'exclusion : 31.6 ng/ml pour un patient de 72 ans.

La moyenne corrigée obtenue est de 10.7 ng/ml avec un écart-type de 4,5 ng/mL.

Les valeurs de référence par notre technique LC-MS/MS couplé au module OSM sont donc : [1.7 ; 19.7 ng/ml], avec 3 ng/ml pour la plus faible valeur obtenue dans le groupe de patients sains (femme de 25 ans) et 19.1 ng/ml pour la plus élevée (homme de 28 ans).

Notre technique ne permet donc pas de couvrir toutes nos valeurs de références. Une optimisation de la préparation des échantillons permettrait de diminuer notre LOQ.

2.6. Comparaison avec les résultats de l'hôpital Louis –Mourier :

Les résultats de notre comparaison sont regroupés dans le tableau suivant

ID.	sexe	Age	Pathologie suspectée	BILAN BIOCHIMIQUE					LOUIS MOURIER	BORDEAUX	différence en valeur absolue	différence en %
									LC/MS-MS	LC/MS-MS		
				Fer	Saturation de la Tf	Ferritine	Créatinine	CRP	HEPCIDINE			
				(μmol/l)	(%)	(μg/l)	(μmol/l)	(mg/l)				
LAG M	F	78	Surcharge en fer d'origine génétique	38,4	90	1289	95	3	5,6	7,9	2,3	0,4
RIC M	M	36	Surcharge en fer d'origine génétique	NC	NC	600	NC	0,9	17,0	18,7	1,7	0,1
DAB C	F	53	Surcharge en fer sur thalassémie	11,3	20	800	67	3,1	33,0	29,0	-4,0	-0,1
BRO A	F	27	Suspicion d'IRIDA	5	5	4	313	0,3	1,5	3,2	1,7	1,1
DAM S	F	36	Exploration d'une microcytose familiale sans anomalies génétiques retrouvées	19,1	NC	26	70	13	1,7	3,0	1,3	0,8
DAM A	F	39	Exploration d'une microcytose familiale sans anomalies génétiques retrouvées	NC	NC	32	65	3,1	18,6	20,1	1,5	0,1
EEQ HEPCIDINE 1	NC	NC	Inflammation	5	14,3	644	91	280,9	107,6	65	-42,6	-0,4
EEQ HEPCIDINE 2	NC	NC	Inflammation	7,6	17,9	800	84	114,1	60	38,6	-21,4	-0,4
EEQ HEPCIDINE 3	NC	NC	Insuffisance rénale chronique	11,8	26,2	752	648	29,6	60,4	40,6	-19,8	-0,3

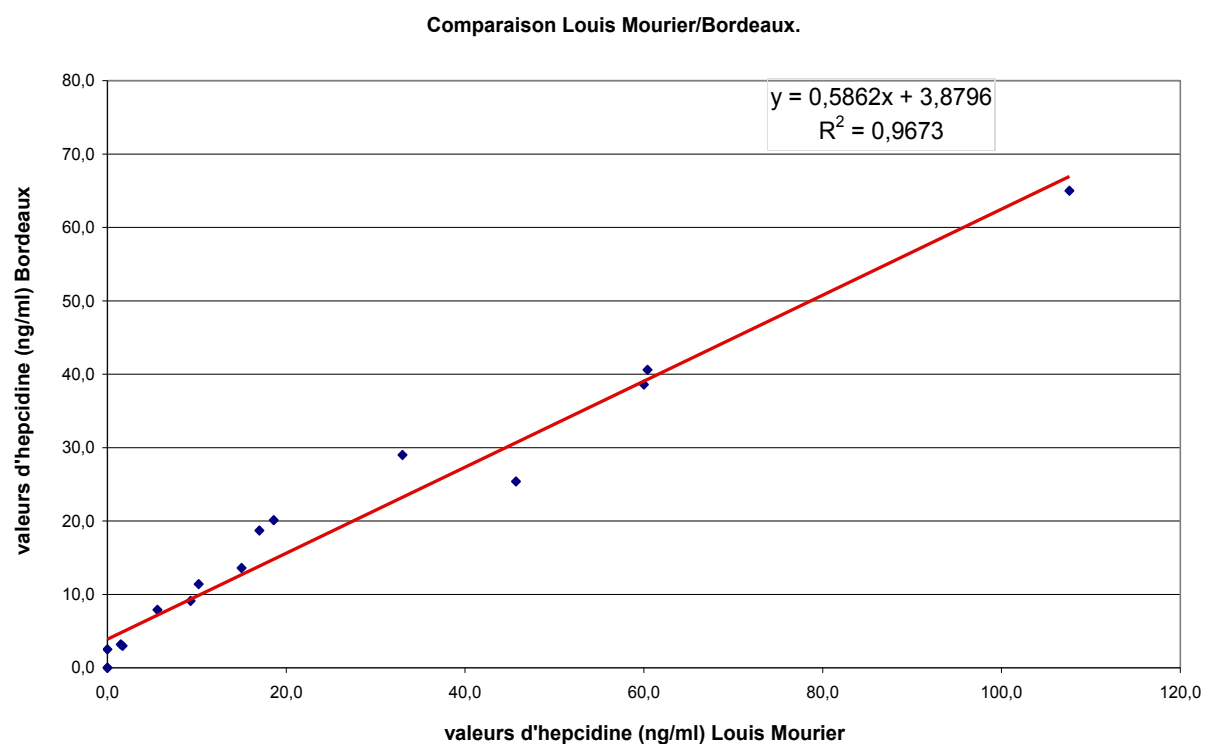


Figure 32 : Comparaison de méthode entre les laboratoires des hôpitaux Louis Mourier et CHU de Bordeaux par régression linéaire et calcul de la pente et ordonnée à l'origine.

EEQ HEPCIDINE 4	NC	NC	Insuffisance rénale chronique	13,7	36,5	1049	313	66,2	45,7	25,4	-20,3	-0,4
EEQ HEPCIDINE 5	NC	NC	Carence martiale	5,3	7,3	18	86	8,3	0	2,5	2,5	Ncal
EEQ HEPCIDINE 6	NC	NC	Hémochromatose C282Y	18	33	121	85	2,1	0	0	0,0	Ncal
EEQ HEPCIDINE 7	NC	NC	Hémochromatose C282Y	25,9	47,1	801	87	1,7	0	0	0,0	Ncal
EEQ HEPCIDINE 8	NC	NC	NORMAL	18,2	33,1	105	89	1,9	9,3	9,1	-0,2	0,0
EEQ HEPCIDINE 9	NC	NC	NORMAL	18,8	28,9	156	68	2,6	10,2	11,4	1,2	0,1
EEQ HEPCIDINE 10	NC	NC	NORMAL	10,3	17,2	174	87	4,3	15	13,6	-1,4	-0

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des échantillons utilisés pour la comparaison inter-laboratoire entre le CHU de Bordeaux et l'hôpital Louis Mourier.

Il est à noter que les valeurs normales de Louis Mourier ont un intervalle plus grand avec une valeur limite supérieure plus élevée : 1,7 -19,7 ng/mL contre 1.3-29.2 ng/mL

La droite de régression nous donne l'équation suivante : valeurs de Bordeaux = $3,88 + 0,59 \times$ valeurs de Louis Mourier.

Le test de la pente et de l'ordonnée à l'origine nous donne pour 16 observations et 14 degrés de liberté une valeur $R^2 = 0,967$ (fig 32)

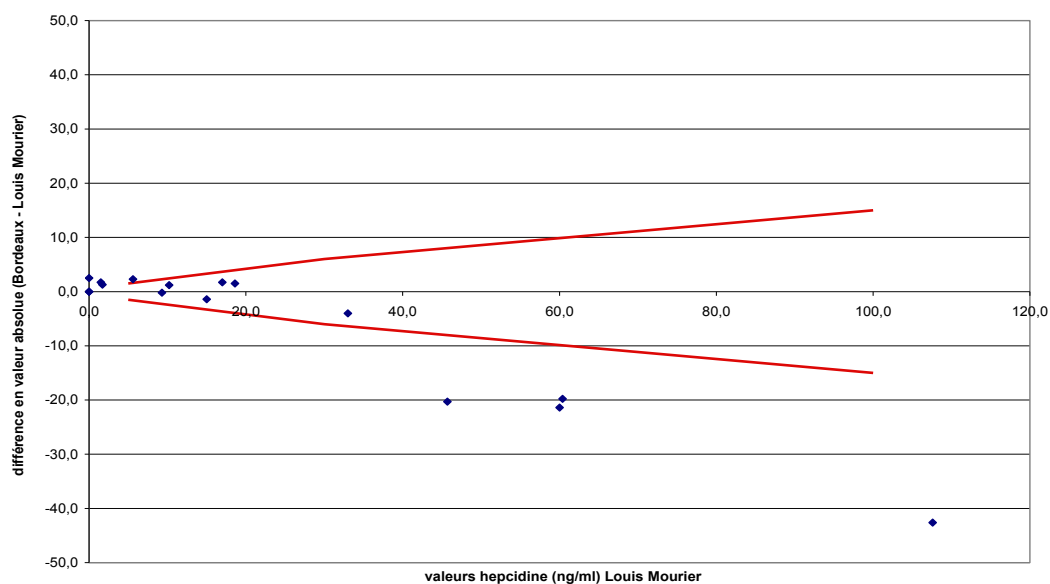


Figure 33 : Comparaison des différences des valeurs absolues des résultats des hôpitaux Louis Mourier et CHU de Bordeaux par rapport à des valeurs seuils. Les différences obtenues ne sont pas acceptables pour les faibles valeurs (<10 ng/ml) et pour les fortes valeurs (>40 ng/ml)

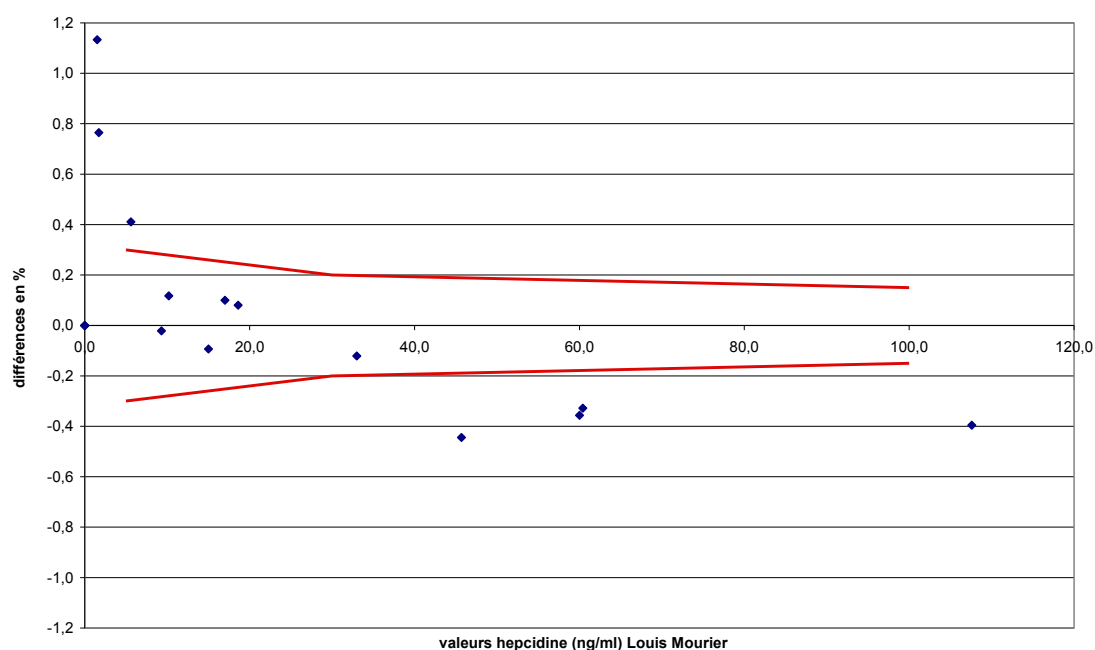


Figure 34 : Comparaison des différences des valeurs en pourcentage des résultats des hôpitaux Louis Mourier et CHU de Bordeaux par rapport à des valeurs seuils. Les différences obtenues ne sont pas acceptables pour les faibles valeurs (<10 ng/ml) et pour les fortes valeurs (>40 ng/ml).

Source	Valeur	Ecart-type	t	Pr > t	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Ordonnée à l'origine	3,880	1,095	3,543	0,003	1,531	6,228
Pente	0,586	0,029	20,335	< 0.0001	0,524	0,648

Tableau 12 : Résultats du test de la pente et de l'ordonnée à l'origine.

Grâce à ces tests statistiques, nous pouvons conclure que :

- la pente est significativement différente de 0 mais <1 : nos valeurs sont en moyenne égales à 60 % celles de l'hôpital Louis Mourier.
- l'ordonnée à l'origine significativement différente de 0 : il existe une erreur systématique entre notre résultat et celui de Louis Mourier , en particulier pour les valeurs basses.

Nos résultats sont donc différents de ceux obtenus par la méthode réalisée à l'hôpital Louis - Mourier. Ce qui est confirmé par les deux graphes (fig 33 et 34) qui montrent bien que nos résultats sont comparables entre 10-30ng/ml mais qu'ils diffèrent pour les faibles et fortes valeurs.

3. Résultats bruts de l'étude de comparaison des cinq laboratoires participants.

Les trois séries dans lesquelles ils ont été passés, sont toutes valides c'est-à-dire que les gammes et contrôles répondent aux exigences précédemment citées.

numéro	Valeur 1	Valeur 2	Valeur 3	Moyenne	Ecart type	Cv
EEQ hepcidine 1	67,1	61,1	66,7	64,97	4,24	6,53
EEQ hepcidine 2	42	38	35,8	38,6	2,82	7,33
EEQ hepcidine 3	44,8	36,5	40,4	40,57	5,86	14,47
EEQ hepcidine 4	24,8	24,01	27,3	25,37	0,56	2,20
EEQ hepcidine 5	2,3	3	2,3	2,53	0,49	19,53
EEQ hepcidine 6	<2	<2	<2	NC	NC	NC
EEQ hepcidine 7	<2	<2	<2	NC	NC	NC
EEQ hepcidine 8	9,4	9,2	8,8	9,13	0,14	1,55
EEQ hepcidine 9	12,6	11,3	10,3	11,4	0,92	8,06
EEQ hepcidine 10	14,2	13,5	13	13,6	0,50	3,65

Tableau 13 : Résultats des 10 EEQ au sein du laboratoire du CHU de Bordeaux.

Les résultats des différents centres ont été résumés dans le tableau ci –dessous avec calcul des Z-scores. Le laboratoire de Rennes a choisi de ne pas tenir compte des signes < lors du calcul du Z-score : exemple si valeur <2, elle est remplacée par 2.

ID.	N°	Phénotype biologique (pool de sérum)	BILAN BIOCHIMIQUE					MONTPELLIER	BRUXELLES	RENNES	BORDEAUX	LOUIS MOURIER	HEPCIDINE Groupe		MONTPELLIER	BRUXELLES	RENNES	BORDEAUX	LOUIS MOURIER
			Fer	Saturation de la Tf	Ferritine	Créatinine	CRP	HEPCIDINE					Moyenne	Ecart-type	z-score				
			(µmol/l)	(%)	(µg/l)	(µmol/l)	(mg/l)	ng/ml					ng/ml	ng/ml					
EEQ 1	318333	Inflammation	5	14,3	644	91	280,9	221,0	35,9	174,0	65	107,6	120,7	76,4	1,3	-1,1	0,7	-0,7	-0,2
EEQ 2	318334	Inflammation	7,6	17,9	800	84	114,1	131,4	26,8	126,3	38,6	60	76,6	49,2	1,1	-1,0	1,0	-0,8	-0,3
EEQ 3	318335	Insuffisance rénale chronique	11,8	26,2	752	648	29,6	131,5	29,9	165,9	40,6	60,4	85,7	59,8	0,8	-0,9	1,3	-0,8	-0,4
EEQ 4	318336	Insuffisance rénale chronique	13,7	36,5	1049	313	66,2	55,4	20,9	135,0	25,4	45,7	56,5	46,1	0,0	-0,8	1,7	-0,7	-0,2
EEQ 5	318337	Carence martiale	5,3	7,3	18	86	8,3	<0,5	0,0	0,0	25	<0,75	0,8	1	-0,2	-0,7	-0,7	1,6	0
EEQ 6	318338	Hémochromatose C282Y	18	33	121	85	2,1	<0,5	0,0	0,0	< 2	<0,75	0,7	0,8	-0,2	-0,8	-0,8	1,7	0,1
EEQ 7	318339	Hémochromatose C282Y	25,9	47,1	801	87	1,7	<0,5	0,0	0,0	< 2	<0,75	0,7	0,8	-0,2	-0,8	-0,8	1,7	0,1
EEQ 8	318340	NORMAL	18,2	33,1	105	89	1,9	21,8	8,3	28,4	9,1	9,3	15,4	9,2	0,7	-0,8	1,4	-0,7	-0,7
EEQ 9	318341	NORMAL	18,8	28,9	156	68	2,6	22,2	7,9	29,3	11,4	10,2	16,2	9,1	0,7	-0,9	1,4	-0,5	-0,7
EEQ HEPIDINE 10	318342	NORMAL	10,3	17,2	174	87	4,3	37,9	10,3	36,8	13,6	15	22,7	13,5	1,1	-0,9	1,0	-0,7	-0,6

Tableau 14 : Résultats de la comparaison inter-laboratoire initiée par la SFBC.

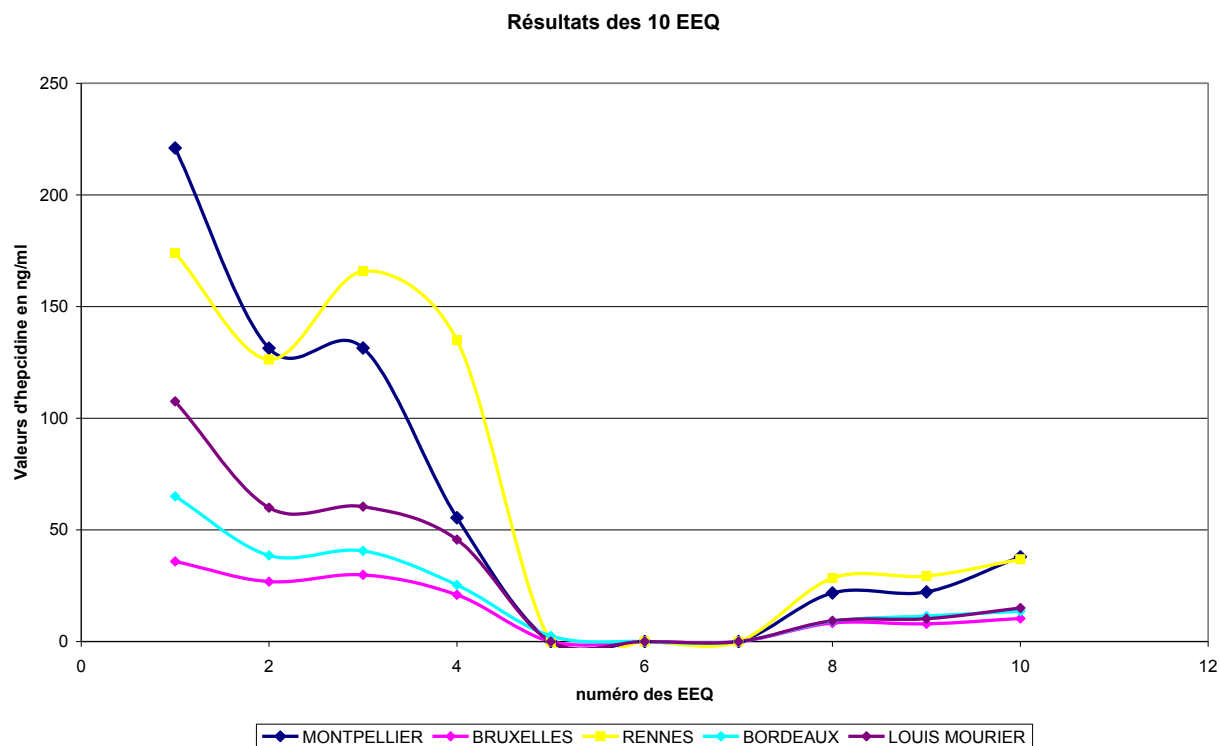


Figure 35 : Résultats des 10 EEQ pour les différents laboratoires. Les losanges représentent les laboratoires utilisant la spectrométrie de masse; le carré celui utilisant l'ELISA.

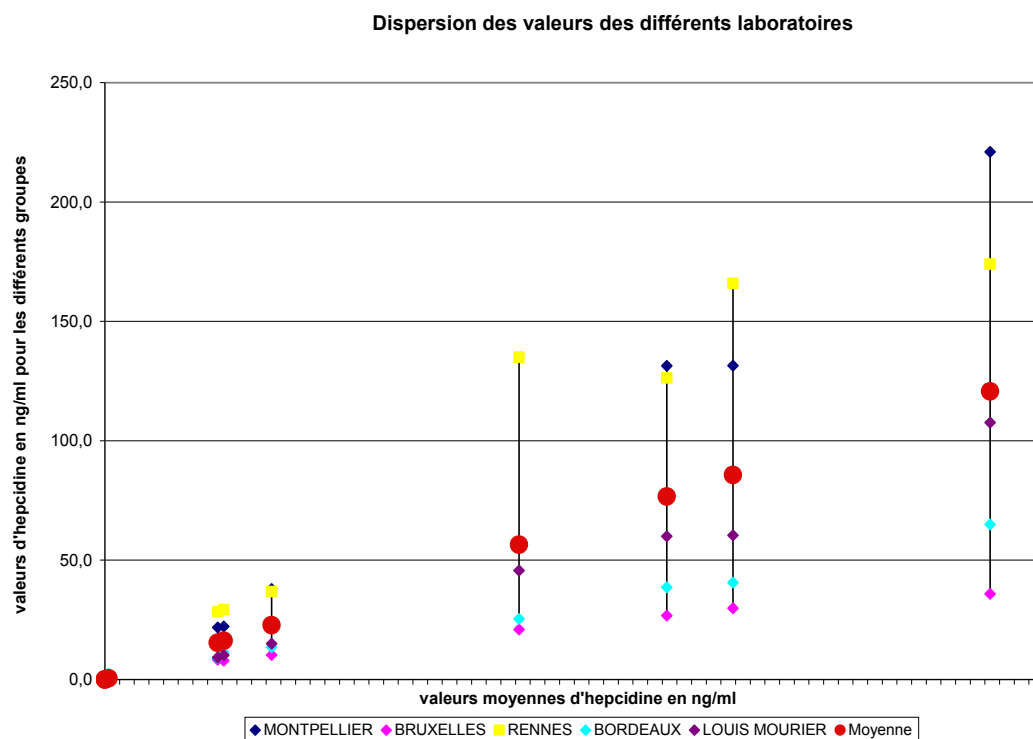


Figure 36 : Dispersion des valeurs obtenues par les différents laboratoires en fonction des valeurs moyennes des EEQ. La dispersion augmente fortement avec la valeur d'hepcidine en ng/ml.

4. Etude approfondie de la comparaison des résultats

Limite de l'étude :

Le Z-score est une grandeur corrélée à l'écart-type. Il dépend donc fortement de la dispersion des résultats des laboratoires et donc du CV. Le Z score exprime le nombre «d'écarts types» pour lequel le résultat du laboratoire s'écarte au-dessus ou au-dessous de la moyenne de la population. Pour les CV importants, il doit être considéré avec prudence. Ce qui est le cas pour notre étude où certains CV atteignent 70%. Ces Z-scores ne sont donc pas utilisables pour estimer si nos différentes techniques sont équivalentes. Celui-ci doit donc être calculé avec des paramètres robustes.

On note une très forte variation des valeurs absolues au sein des différents groupes. Cette dispersion augmente avec les valeurs d'hepcidinémie. (fig 35 et 36)

Cependant dans tous les cas, les variations des taux sont en accord avec celles attendues en fonction des pathologies.

Pour la technique ELISA, les différences observées peuvent être dues à la non spécificité des anticorps utilisés qui devraient être responsables d'une surestimation des résultats par réactions croisées avec les différentes isoformes ou même le pro-peptide. Cette comparaison peut le laisser envisager car les résultats du laboratoire de RENNES sont en moyenne plus élevés que ceux obtenus par spectrométrie de masse.

Concernant cette deuxième technique, les variations de valeurs absolues peuvent s'expliquer par les différentes sources d'hepcidine utilisées pour réaliser les points de gamme. Mais aussi par les problèmes évoqués de perte de peptides sur les matériaux plastiques par adsorption non spécifique.

Pour normaliser ces résultats avec fortes variations des valeurs absolues, il est possible d'utiliser un point comme standard et d'exprimer les autres résultats en fonction de celui-ci. Ce système permet de s'affranchir des variations des valeurs absolues pour un dosage en exprimant le résultat sous forme de ratio. Pour cela, tous les laboratoires doivent posséder un échantillon, le plus souvent avec une valeur comprise dans les normales physiologiques, qui est utilisé comme standard en lui attribuant la valeur de 1. Les autres résultats sont alors exprimés en ratio : résultat du dosage / valeur du dosage du standard. Pour notre

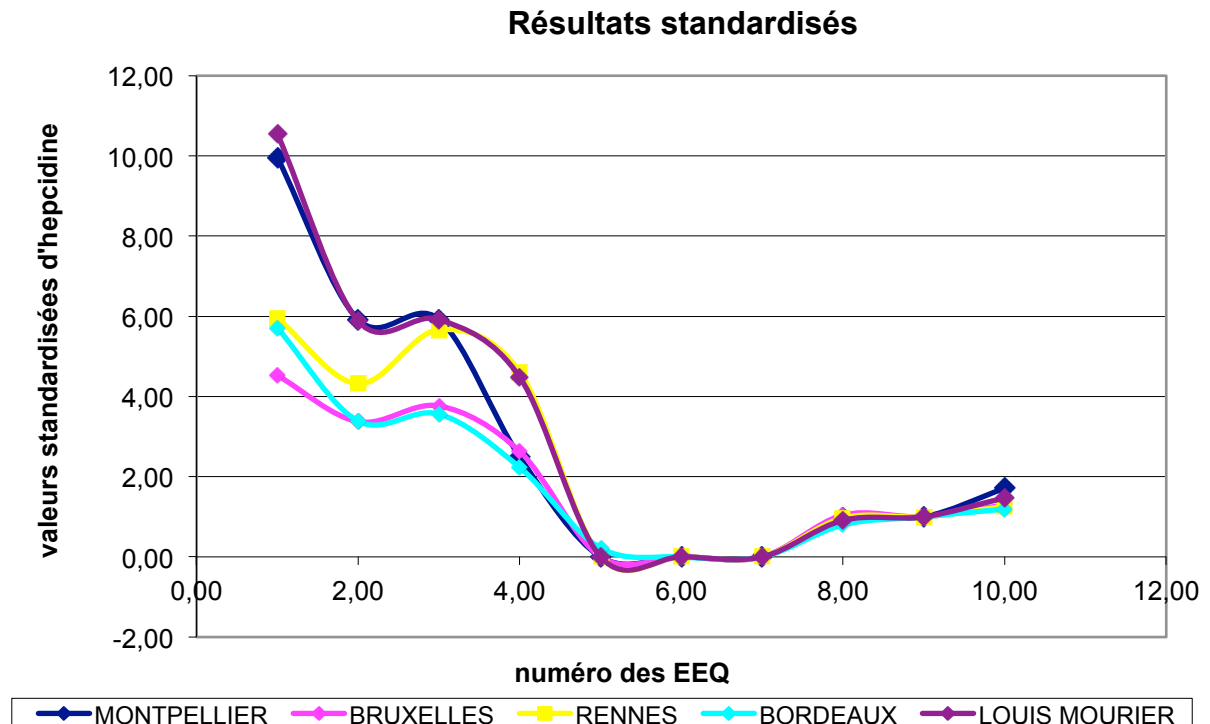


Figure 37 : Résultats standardisés des 10 EEQ pour les différents laboratoires. Les losanges représentent les laboratoires utilisant la spectrométrie de masse ; le carré celui utilisant l'ELISA.

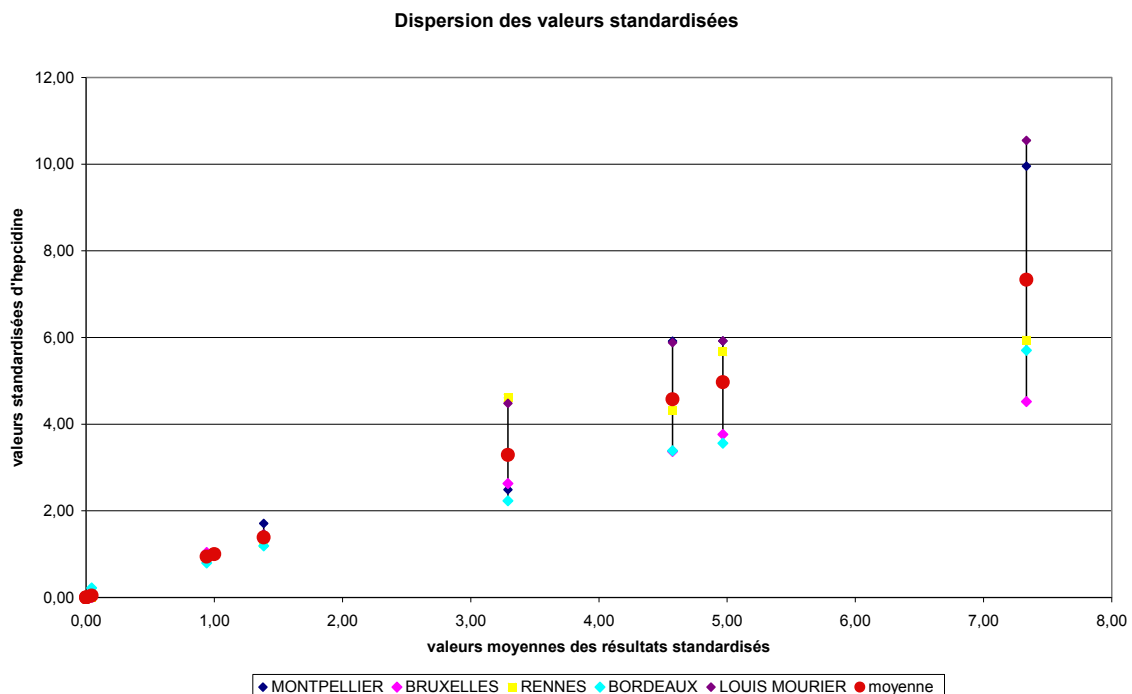


Figure 38 : Dispersion des valeurs standardisées des différents laboratoires en fonction des valeurs moyennes des EEQ. La dispersion augmente fortement avec la valeur d'hepcidine en ng/ml.

standardisation nous avons choisi l'EEQ 9 comme standard 1. Nos résultats standardisés sont obtenus par la formule : résultat EEQ / valeur EEQ 9.

ID.	MONTPELLIER	BRUXELLES	RENNES	BORDEAUX	LOUIS MOURIER	moyenne	écart - type
EEQ HEPCIDINE 1	9,96	4,52	5,94	5,70	10,55	7,33	2,73
EEQ HEPCIDINE 2	5,92	3,37	4,31	3,39	5,88	4,57	1,27
EEQ HEPCIDINE 3	5,92	3,76	5,67	3,56	5,92	4,97	1,20
EEQ HEPCIDINE 4	2,49	2,63	4,61	2,23	4,48	3,29	1,16
EEQ HEPCIDINE 5	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,04	0,10
EEQ HEPCIDINE 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EEQ HEPCIDINE 7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EEQ HEPCIDINE 8	0,98	1,04	0,97	0,80	0,91	0,94	0,09
EEQ HEPCIDINE 9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
EEQ HEPCIDINE 10	1,71	1,30	1,26	1,19	1,47	1,39	0,21

Tableau 15 : Résultats standardisés des taux d'hepcidine. EEQ 9 est pris comme standard 1. Les résultats des autres EEQ sont exprimés en fonction de ce standard.

On peut observer que grâce à la standardisation les résultats des EEQ sont beaucoup plus semblables. Ils sont mêmes très proches pour les 5 derniers EEQ où les tracés se superposent. Cela nous permet de calculer un z-score plus pertinent et informatif en utilisant un groupe de pair utilisant la même technique (Bruxelles, Bordeaux, Louis Mourier et Montpellier). Les valeurs avec signes « inférieur à » seront mises arbitrairement à zéro. (fig 37 et 38)

ID.	moyenne du groupe de pair	écart-type groupe de pair	coefficient de variation	MONTPELLIER	BRUXELLES	BORDEAUX	LOUIS MOURIER
				LC/MS-MS	LC/MS-MS	LC/MS-MS	LC/MS-MS
				z-score			
EEQ HEPCIDINE 1	7,68	3,02	39,32	0,75	-1,05	-0,65	0,95
EEQ HEPCIDINE 2	4,64	1,46	31,47	0,88	-0,87	-0,86	0,85
EEQ HEPCIDINE 3	4,79	1,3	27,14	0,86	-0,79	-0,94	0,86
EEQ HEPCIDINE 4	2,96	1,03	34,80	-0,45	-0,32	-0,70	1,50
EEQ HEPCIDINE 5	0,05	0,11	220,00	-0,50	-0,50	1,50	-0,50
EEQ HEPCIDINE 6	0,00	0	NC	NC	NC	NC	NC
EEQ HEPCIDINE 7	0,00	0	NC	NC	NC	NC	NC
EEQ HEPCIDINE 8	0,93	0,11	11,83	0,47	1,03	-1,29	-0,21
EEQ HEPCIDINE 9	1,00	0	0,00	NC	NC	NC	NC
EEQ HEPCIDINE 10	1,42	0,23	16,20	1,30	-0,54	-0,99	0,23

Tableau 16 : Estimation de la justesse par calcul des Z-score sur un groupe de pair.

Les résultats de cette comparaison inter-laboratoire mettent en évidence une différence franche entre les valeurs absolues obtenues pour un même dosage et ceci malgré une standardisation des résultats. Il est donc difficile de conclure sur la justesse des valeurs obtenues sachant qu'il n'existe pas de méthode de référence. Il est donc indispensable pour un laboratoire de réaliser ses propres valeurs de références pour pouvoir interpréter les résultats rendus aux prescripteurs.

Discussion et conclusion

1. Amélioration à apporter à notre dosage

Notre méthode présente une limite de quantification à 2 ng/ml. Or d'après les données de la littérature la limite normale basse pour l'hepcidine se situe au environ de 1 ng/ml (particulièrement chez les femmes avant ménopause). Notre méthode ne semble donc pas assez sensible pour couvrir la totalité des valeurs physiologiques ainsi que pouvoir mettre en évidence des taux très faibles présents dans certaines pathologies (hémochromatoses HFE..). Le problème s'est rencontré aussi sur les EEQ envoyés par Rennes où il n'a pas été possible de rendre 2 valeurs car inférieures à notre LOQ.

Pour améliorer la sensibilité il faut principalement améliorer la préparation des échantillons pour obtenir un faible rapport signal sur bruit de fond.

Pour les peptides, il existe deux phénomènes à l'origine d'une perte de peptide c'est-à-dire à la préparation d'une solution dont la concentration obtenue est plus faible que la concentration souhaitée. Il peut s'agir soit d'un problème de solubilité soit de mécanismes d'adsorption non spécifique. Il en résulte si cela se produit au niveau de la solution à l'origine des solutions standard une diminution de la pente de la droite d'étalonnage. En effet, le signal obtenu pour chaque point de gamme est attribué à une valeur de concentration plus élevée qu'elle ne l'est réellement. Cela provoque une surestimation des valeurs d'hepcidinémie chez les patients pour lesquels les sérums sont passés dans la série contenant ces valeurs fausses de point de gamme.

Pour éviter des problèmes de pertes du peptide, il faut pouvoir maîtriser la solubilité de celui-ci ainsi que des possibles adsorptions. Il est important d'avoir une solubilité complète du peptide pour pouvoir le mettre entièrement en solution lorsque les solutions stock. Pour cela, il faut connaître la composition en acides aminés du peptide, son point isoélectrique pour pouvoir choisir le solvant le plus adapté. Notre choix de solvant s'est porté sur un mélange eau/acétonitrile/acide formique car comme l'hepcidine est un peptide basique (pHI 8.5) et possède des acides aminés hydrophobes, des solutions acides avec léger pourcentage de phase organique sont les plus efficaces pour dissoudre une telle molécule.

De plus, il existe une adsorption non spécifique des peptides et protéines sur différents matériaux d'autant plus si ils sont en matière plastique. Ce phénomène est appelé NSB : non specific binding. Cette liaison du peptide peut se produire sur la matière du contenant dans lequel il est conservé ce qui provoque, en plus d'une erreur de quantification, une non linéarité de la gamme d'étalonnage surtout au niveau des valeurs faibles des standards.

Pour éviter ce phénomène, plusieurs solutions ont été envisagées. Il a été préparé des solutions stock très concentrées pour saturer au maximum les sites de fixation non spécifiques. De plus, ces solutions ont été placées dans des tubes Eppendorf protein LoBind. Jusqu'à présent, les tubes devaient être saturés avec de la BSA avant de l'utiliser pour améliorer la récupération des protéines dans le tube en matière plastique ou les solutions devaient être préparées directement dans une matrice sérique. Avec ces tubes particuliers, ce n'est plus nécessaire. Les taux de récupération sont estimés à plus de 97%. La seringue au niveau de l'injecteur a, elle aussi, été choisie pour minimiser cet accrochage non spécifique.

Il est aussi important d'optimiser la préparation des échantillons. Notre choix s'est porté sur la méthode OSM car elle nous permet d'injecter des volumes plus élevés d'échantillons. En effet, en injection directe il est possible d'injecter au maximum 20µl. Une injection d'un plus grand volume permet d'injecter une plus grande quantité de matière ce qui est intéressant puisqu'il était difficile au départ de descendre dans les valeurs basses physiologiques. Cette méthode permet aussi la purification de notre échantillon puisque il est d'abord débarrassé des protéines par précipitation puis de possibles molécules interférentes par lavages de la cartouche de SPE. D'autres techniques de préparation ont été testées, aucune d'elles n'utilisant le module OSM.

- une précipitation des protéines par l'acétonitrile puis évaporation de ce solvant et reprise de l'extrait par le mélange des phases mobiles
- une SPE avec plaque HLB Oasis Water® : support hydrophile-lipophile en phase inverse utilisable avec tous les composés
- une précipitation des protéines par l'acétonitrile en milieu acide puis séparation de la phase aqueuse (contenant l'hepcidine ionisée) de la phase organique (acétonitrile) par du chloroforme.

Seule la SPE a donné des résultats convenables même si la LOQ était plus élevée que souhaitée (au environ de 10). Les autres techniques ne permettent pas d'avoir un rendement

d'extraction compatible avec les valeurs physiologiques de notre paramètre. Il semble envisageable d'améliorer notre méthode par combinaison d'une SPE HLB et module OSM ce qui purifierait encore plus notre échantillon tout en le concentrant. Mais ce qui augmenterait aussi fortement le prix de l'analyse. D'autres supports de SPE peuvent être aussi envisagés et plus particulièrement les supports mixtes en phase inverse avec échangeur d'anions faibles ou cations faibles. Leur utilisation a été décrite pour les peptides et le laboratoire Louis Mourier utilise Oasis® MAX, support de mode mixte en phase inverse échangeur d'anions pour l'analyse de l'hepcidine.

Ces nouveaux modes de préparations seront possiblement testés pour voir si cela permet d'augmenter la sensibilité de notre dosage.

2. Amélioration à apporter à notre validation de méthode

Dans notre validation de méthode à cause de difficultés de réalisation, l'effet matrice n'a pas été étudié. Il est défini comme l'effet de substances résiduelles de la matrice co-éluées sur l'ionisation de la molécule d'intérêt. La suppression ou la potentialisation de la réponse de l'analyte s'accompagne d'une diminution de la fidélité et exactitude de la méthode. L'effet matrice est dépendant du type d'ionisation, du pré-traitement de l'échantillon et du type de matrice utilisée. Pour l'évaluer, il faut comparer le signal obtenu pour une solution pure avec celui obtenu avec un blanc matrice surajouté avec une solution pure à la même concentration. Les signaux mesurés en aire doivent être comparable c'est-à-dire avec un biais < 15%.

Plusieurs problèmes n'ont pas permis de l'étudier pour notre paramètre. (Utilisation du module OSM directement couplé à la chromatographie)

Nous nous sommes donc basés sur le fait que normalement l'utilisation d'un analogue isotopique stable comme étalon interne permet de s'affranchir des répercussions sur la fidélité et l'exactitude puisqu'on considère que le rapport des réponses sera conservé.

3. Intérêt clinique du dosage de l'hepcidine

Grâce à des méthodes de plus en plus sensibles et robustes, il semble maintenant possible d'entrevoir l'utilisation du dosage de l'hepcidine à des visées diagnostiques, pronostiques et de suivi dans de plusieurs pathologies 54). L'intérêt du dosage reste encore à étudier mais l'étude du groupe de travail de la SFBC permettra d'établir des recommandations sur la prescription de ce paramètre et des arbres décisionnels dans différentes situations où il existe déjà quelques résultats.

Surcharge en fer :

Il semble logique qu'en présence d'une surcharge en fer le taux d'hepcidine augmente. Mais dans le cas des hémochromatoses génétiques liées au gènes HFE, TRF2, HAMP et HJV, les anomalies présentes sur ces gènes sont à l'origine d'un déficit en hepcidine responsable de cette surcharge. Pour l'hémochromatose de type 4, ce n'est pas la synthèse mais l'action d'hepcidine qui est abolie et les taux sériques en hepcidine sont normaux voire augmentés(54).

L'analyse génétique permet dans la grande majorité des cas d'établir le diagnostic, sachant que plus de 80% des cas d'hémochromatoses classiques sont dus à une mutation du gène *HFE*. Mais parfois, aucune mutation connue n'est retrouvée et le dosage d'hepcidine sérique peut alors s'avérer utile. Si le taux d'hepcidine est faible, il est alors dit inadapté vis-à-vis de la surcharge présente et permet donc d'envisager une anomalie génétique touchant la voie de régulation du gène HAMP.

Anémies hypochromes microcytaires avec suspicion d'origine héréditaire :

Le dosage de l'hepcidine dans ces situations est utile pour orienter le diagnostic étiologique et l'étude génétique. En cas d'atteinte du gène *TMPRSS6*, l'absence de la matriptase 2 (inhibiteur) provoque une transcription anormale du gène HAMP avec production importante d'hepcidine, étant elle-même l'étiologie du trouble hématologique observé(36). Les anémies sidéroblastiques sont dues à une anomalie de la synthèse de l'hème et non à un trouble siégeant au niveau du métabolisme du fer. Certes l'impossibilité d'incorporation du fer dans l'hème entraîne une surcharge en fer localisée potentiellement à l'origine d'une stimulation de la synthèse de cette hormone hyposidérémiante, mais comme la stimulation par la voie

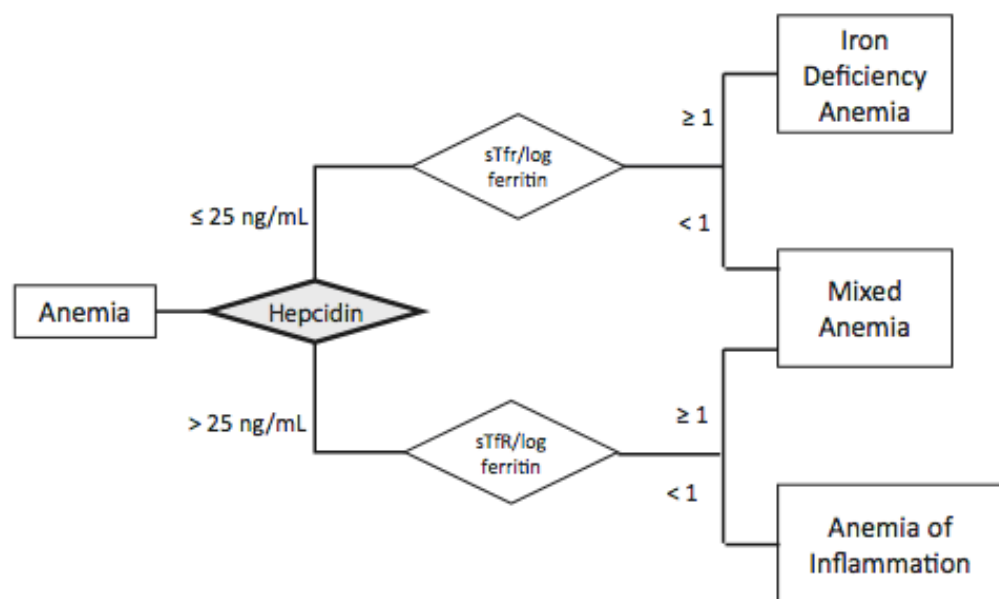


Figure 39 : Schéma proposé de discrimination biochimique de la carence en fer par rapport à l'état inflammatoire.

EPO/érythroferrone prédomine, des taux d'hepcidine normaux ou bas sont alors rencontrés(41).

Le dosage permet de différencier les anémies de type IRIDA (taux d'hepcidine élevé) des autres anémies microcytaires d'origine génétique (hepcidinémie normale ou parfois diminuée) et donc d'orienter sur les anomalies génétiques à rechercher.

Syndrome inflammatoire chronique :

Par l'intermédiaire de l'IL6, l'inflammation provoque une augmentation des taux d'hepcidine assez importante. En comparant deux groupes de patients, le premier où les patients avaient une CRP<10 mg/L et le second où elles étaient > 10mg/L, Delaby and al ont pu observer des concentrations significativement plus élevées (de l'ordre de 50ng/ml) dans le second groupe pour des valeurs d'hepcidinémie dans le premier groupe de l'ordre de 6 ng/ml. Connaître le statut inflammatoire d'un patient semble donc être essentiel pour interpréter les résultats d'un dosage d'hepcidine(64).

Dans une situation inflammatoire, il peut coexister une carence martiale d'étiologies diverses (saignements concomitants par exemple). Il y a alors une double origine à l'anémie : inflammation et carence en fer et ces anémies sont dites mixtes. Or la synthèse de la ferritine est directement augmentée par l'inflammation, et ce indépendamment du niveau de réserves en fer. Il est donc difficile de mettre en évidence la composante carencielle à une anémie. Les autres paramètres du bilan martial normal ne sont pas plus informatifs : le fer est diminué dans les deux situations et la transferrine est une protéine négative de l'inflammation c'est-à-dire que son taux diminue au cours d'un syndrome inflammatoire. L'augmentation de la transferrininémie pour augmenter les apports à la moelle n'est donc pas présente et ne peut pas servir d'indicateur. Pour cela le dosage des récepteurs solubles de la transferrine peut être réalisé. Le nombre de récepteurs de la transferrine à la surface cellulaire est régulé positivement par l'activité érythropoïétique et la carence en fer de la cellule. La forme soluble est obtenue par protéolyse de la forme membranaire et sa concentration sérique est proportionnelle au niveau d'expression tissulaire. Son avantage principal est son indépendance vis-à-vis du statut inflammatoire et son dosage peut être utile dans le cas des anémies mixtes. Mais il peut aussi être augmenté dans les situations d'érythropoïèse intense comme les hémolyses chroniques et il a été proposé différents ratios (RsTf/log ferritine et RsTf/ferritine) pour augmenter la performance du dosage des récepteurs solubles. Un ratio récepteur soluble de la transferrine/log ferritine élevé permet d'évoquer une carence martiale

associée à un état inflammatoire. Dans cette situation de diagnostic plus difficile, certains auteurs essaient d'utiliser l'hepcidine comme marqueur des anémies mixtes à l'instar des récepteurs solubles de la transferrine(41). Delaby and al ont même proposé un arbre décisionnel utilisant l'hepcidine, les récepteurs solubles de la transferrine et la ferritine pour mieux différencier les anémies mixtes, inflammatoire et carencielle.(64) (fig 39)

Anémie de l'insuffisance rénale chronique :

Dans les premières études réalisées chez les patients insuffisants rénaux, il a été mis en évidence des taux élevés d'hepcidine sérique. Cette augmentation pourrait avoir plusieurs origines : défaut de filtration glomérulaire, état inflammatoire chronique ou encore due aux quantités de fer administré aux patients supplémentés en EPO. Mais le rôle de cette hormone dans ce type d'anémie reste encore à préciser. De plus, sachant que l'injection d'EPO semble provoquer une inhibition de l'expression d'hepcidine, il peut être envisagé un lien entre la résistance à l'EPO et la persistance de taux élevés d'hepcidine. Elle pourrait être alors un indicateur sur le statut martial de ces patients ou encore sur la résistance à l'EPO(55)(69)(62).

Traitement par tocilizumab (70)

Le RoActemra® contient du tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé anti récepteurs membranaire et soluble de l'interleukine 6 (IL 6). Il est actuellement indiqué en association au méthotrexate (MTX), pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et dans l'arthrite juvénile idiopathique systémique.

Au cours des études cliniques sur ce médicament, en plus des effets bénéfiques sur les marqueurs de l'inflammation, il a été observée des augmentations des concentrations en hémoglobine qui s'expliquent par le fait que tocilizumab diminue les effets induits par l'IL-6 sur la production d'hepcidine, et augmente ainsi la disponibilité du fer.

Thalassémie :

La surcharge en fer des thalassémies est principalement due aux transfusions, mais l'inhibition de la sécrétion d'hepcidine par l'anémie contribue, par l'augmentation de l'absorption, à la majorer. Le dosage de l'hepcidine permet de cibler les patients le plus à risque de développer cette surcharge (taux d'hepcidine les plus bas) et ainsi de pouvoir orienter la prise en charge vers les chélateurs de fer de façon plus précoce et prévenir plus rapidement les complications.

Augmentation de l'hepcidine	Diminution de l'hepcidine
➤ Surcharges en fer non génétiques ➤ Syndrome inflammatoire ➤ Hémochromatose de type 4	➤ Carence en fer ➤ Erythropoïèse accélérée ➤ Hypoxie ➤ IRC ➤ Hémochromatoses génétiques liées aux gènes HFE, TRF2, HAMP, HJV ➤ Traitement par tocilizumab

Tableau 17 : Variations des taux d'hepcidine en pathologie humaine.

4. Conclusion

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie est une technique en plein essor dans le domaine de l'analyse des peptides et protéines. En effet depuis plusieurs années de nouveaux bio-marqueurs et des bio-médicaments ont été découverts et contrairement aux tests immunologiques, ce couplage ne nécessite pas la production d'anticorps spécifiques, ce qui diminue le coût et réduit le temps de mise au point. De plus, cette association permet de doser plusieurs molécules en même temps en évitant les réactions croisées. Elle pourrait par exemple permettre de doser les trois isoformes (22, 20,25) de l'hepcidine lors d'un même passage tout en évitant des interférences entre ces molécules.

Malgré ces avantages, il reste toutefois des points à maîtriser avant une utilisation plus répandue, comme la préparation des échantillons, l'adsorption non spécifique des peptides sur les matières plastiques. Il s'agit encore d'une méthode qui requiert des compétences techniques et un appareillage coûteux seulement accessibles dans peu de laboratoires d'analyses biomédicales.

Le dosage de l'hepcidine mis au point au laboratoire du CHU de Bordeaux s'est avéré répétable et reproductible. Mais la limite de quantification obtenue, trop élevée, ne permet

distinguer les valeurs normales basses des diminutions pathologiques. Plusieurs lignes d'amélioration sur la préparation de l'échantillon sont donc étudiées pour pouvoir optimiser la méthode mis en place.

La comparaison inter-laboratoire a mis en évidence une forte variabilité sur les valeurs absolues obtenues en particulier sur les valeurs pathologiques. Celle – ci peut être due à la différence des standards utilisés ou aux différents modes de préparation des échantillons. Cette variation était toujours présente, tout en étant amoindrie, après standardisation des résultats. Il est donc difficile de conclure sur la justesse des différents résultats.

Le taux sanguin d'hepcidine est soumis à de nombreux facteurs tels que le statut inflammatoire, l'érythropoïèse, le dysmétabolisme pour citer ceux connus. Il est donc difficile d'interpréter les taux obtenus par dosage car les patients pour lesquels il est prescrit ont souvent des comorbidités qui peuvent interférer sur la conclusion de cette analyse.

Par cette difficulté d'interprétation et la forte variabilité observée lors de la comparaison inter-laboratoire, l'intérêt du dosage de l'hepcidine semble donc rencontrer des obstacles pour pouvoir être mis en place comme analyse de routines par différents laboratoires et pourrait donc rester une analyse rare et dédiée à un ou quelques laboratoires de référence.

Bibliographie :

1. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):403–10.
2. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2670–7.
3. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999 Dec 23;341(26):1986–95.
4. Przybyszewska J, Zekanowska E. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Przegląd Gastroenterol*. 2014;9(4):208–13.
5. Andrews NC. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Oct;31(10):991–4.
6. Simovich M, Hainsworth LN, Fields PA, Umbreit JN, Conrad ME. Localization of the iron transport proteins Mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: the surprising role of mucin. *Am J Hematol*. 2003 Sep;74(1):32–45.
7. Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2004 Feb;32(1):131–8.
8. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*. 1999 Feb;21(2):195–9.
9. Canonne-Hergaux F, Zhang AS, Ponka P, Gros P. Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3823–30.
10. Lambe T, Simpson RJ, Dawson S, Bouriez-Jones T, Crockford TL, Lepherd M, et al. Identification of a Steap3 endosomal targeting motif essential for normal iron metabolism. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1805–8.
11. Saito H. METABOLISM OF IRON STORES. *Nagoya J Med Sci*. 2014 Aug;76(3-4):235–54.
12. Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:357–93.
13. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002 Jul;48(7):1066–76.
14. Lambe T, Simpson RJ, Dawson S, Bouriez-Jones T, Crockford TL, Lepherd M, et al. Identification of a Steap3 endosomal targeting motif essential for normal iron metabolism. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1805–8.

15. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1324–8.
16. Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem*. 1966 Jun 25;241(12):2746–51.
17. Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP, Eisenstein RS. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *RNA*. 2010 Jan;16(1):154–69.
18. Samaniego F, Chin J, Iwai K, Rouault TA, Klausner RD. Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9;269(49):30904–10.
19. Marro S, Chiabrando D, Messana E, Stolte J, Turco E, Tolosano E, et al. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position –7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica*. 2010 Aug;95(8):1261–8.
20. Theil EC. Ferritin: The Protein Nanocage and Iron Biomineral in Health and in Disease. *Inorg Chem* [Internet]. 2013 Nov 4 [cited 2015 May 26];52(21). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3882016/>
21. Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Klüver E, Maronde E, Conejo-García JR, et al. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 2003 Jan;12(1):143–52.
22. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8780–5.
23. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Apr 2;99(7):4596–601.
24. 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 Mar 16;276(11):7811–9.
25. 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 Feb;184(2):361–70.
26. Maisetta G, Petruzzelli R, Brancatisano FL, Esin S, Vitali A, Campa M, et al. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH. *Peptides*. 2010 Nov;31(11):1995–2002.
27. Laarakkers CMM, Wiegerinck ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AM, et al. Improved Mass Spectrometry Assay For Plasma Hepcidin: Detection and

Characterization of a Novel Hepcidin Isoform. PLoS ONE [Internet]. 2013 Oct 4 [cited 2015 May 27];8(10). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790851/>

28. Schwarz P, Kübler JAM, Strnad P, Müller K, Barth TFE, Gerloff A, et al. Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 2012 Feb;61(2):193–201.
29. Itkonen O, Stenman U-H, Parkkinen J, Soliymani R, Baumann M, Hämäläinen E. Binding of hepcidin to plasma proteins. *Clin Chem*. 2012 Jul;58(7):1158–60.
30. Wolff F, Deleers M, Melot C, Gulbis B, Cotton F. Hepcidin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2013 Aug 23;423:99–104.
31. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090–3.
32. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3979–84.
33. Kaplan J, Ward DM, De Domenico I. The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias. *Int J Hematol*. 2011 Jan;93(1):14–20.
34. Wang R-H, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005 Dec;2(6):399–409.
35. Lee P. Role of matriptase-2 (TMPRSS6) in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009;122(2-3):87–96.
36. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008 Dec;8(6):502–11.
37. Guillem F, Lawson S, Kannengiesser C, Westerman M, Beaumont C, Grandchamp B. Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):2089–91.
38. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):393–408, 408.e1–2.
39. 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 Oct;110(7):1037–44.
40. 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 Jul 12;120(2):431–9.

41. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):479–82.
42. Kautz L. [Erythroferrone, an erythroid regulator of iron metabolism]. *Médecine Sci MS*. 2014 Oct;30(10):834–6.
43. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2002 Aug;16(10):1151–62.
44. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1926–32.
45. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):393–408, 408.e1–2.
46. Bergamaschi G, Villani L. Serum hepcidin: a novel diagnostic tool in disorders of iron metabolism. *Haematologica*. 2009 Dec;94(12):1631–3.
47. Brissot P, Troadec M-B, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Jouanolle A-M, Deugnier Y, et al. Current approach to hemochromatosis. *Blood Rev*. 2008 Jul;22(4):195–210.
48. Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo G, et al. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood*. 2001 May 1;97(9):2555–60.
49. Santos PCJ de L, Dinardo CL, Cançado RD, Schettert IT, Krieger JE, Pereira AC. Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2012;34(4):311–6.
50. Malekzadeh MM, Radmard AR, Nouroozi A, Akbari MR, Amini M, Navabakhsh B, et al. Juvenile Hemochromatosis, Genetic Study and Long-term Follow up after Therapy. *Middle East J Dig Dis*. 2014 Apr;6(2):87–92.
51. Bottomley SS, Fleming MD. Sideroblastic anemia: diagnosis and management. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Aug;28(4):653–70, v.
52. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet*. 2012 Jan 28;379(9813):373–83.
53. Nemeth E. Hepcidin in β -thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Aug;1202:31–5.
54. Arezes J, Nemeth E. Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *Int J Lab Hematol*. 2015 May;37 Suppl 1:92–8.
55. Zaritsky J, Young B, Wang H-J, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hepcidin--a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2009 Jun;4(6):1051–6.
56. Mogadam RA, Nemati A, Amani F, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Bashardoust B. Association between hepcidin, haemoglobin level and iron status in stage 4 chronic kidney disease patients with anaemia. *JPM J Pak Med Assoc*. 2015 Apr;65(4):354–7.

57. Lasocki S, Baron G, Driss F, Westerman M, Puy H, Boutron I, et al. Diagnostic accuracy of serum hepcidin for iron deficiency in critically ill patients with anemia. *Intensive Care Med.* 2010 Jun;36(6):1044–8.
58. Busbridge M, Griffiths C, Ashby D, Gale D, Jayantha A, Sanwaiya A, et al. Development of a novel immunoassay for the iron regulatory peptide hepcidin. *Br J Biomed Sci.* 2009;66(3):150–7.
59. Kroot JJC, Kemna EHJM, Bansal SS, Busbridge M, Campostrini N, Girelli D, et al. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica.* 2009 Dec;94(12):1748–52.
60. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4292–7.
61. Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, Kroot JJC, den Heijer M, Tjalsma H, Swinkels DW, et al. High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol.* 2009 Aug;146(3):317–25.
62. 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 Mar;25(3):848–53.
63. Li H, Rose MJ, Tran L, Zhang J, Miranda LP, James CA, et al. Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2009 Jun;59(3):171–80.
64. Delaby C, Vialaret J, Bros P, Gabelle A, Lefebvre T, Puy H, et al. Clinical measurement of Hepcidin-25 in human serum: Is quantitative mass spectrometry up to the job? [cited 2015 May 26]; Available from: <https://www.mysciencework.com/publication/show/8062330/clinical-measurement-of-hepcidin-25-in-human-serum-is-quantitative-mass-spectrometry-up-to-the-job>
65. Schaap CCM, Hendriks JCM, Kortman GAM, Klaver SM, Kroot JJC, Laarakkers CMM, et al. Diurnal rhythm rather than dietary iron mediates daily hepcidin variations. *Clin Chem.* 2013 Mar;59(3):527–35.
66. Itkonen O, Parkkinen J, Stenman U-H, Hämäläinen E. Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2012 Apr 11;413(7-8):696–701.
67. Kroot JJC, Hendriks JCM, Laarakkers CMM, Klaver SM, Kemna EHJM, Tjalsma H, et al. (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: implications for clinical studies. *Anal Biochem.* 2009 Jun 15;389(2):124–9.
68. Koenig MD, Tussing-Humphreys L, Day J, Cadwell B, Nemeth E. Hepcidin and Iron Homeostasis during Pregnancy. *Nutrients.* 2014 Aug 4;6(8):3062–83.

69. Van der Weerd NC, Grooteman MPC, Bots ML, van den Dorpel MA, den Hoedt CH, Mazairac AHA, et al. Hepcidin-25 in Chronic Hemodialysis Patients Is Related to Residual Kidney Function and Not to Treatment with Erythropoiesis Stimulating Agents. PLoS ONE [Internet]. 2012 Jul 13 [cited 2015 May 27];7(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396629/>
70. Song S-NJ, Iwahashi M, Tomosugi N, Uno K, Yamana J, Yamana S, et al. Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF- α inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Res Ther. 2013;15(5):R141.
71. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. J Hepatol. 2011 Jan;54(1):173–81.
72. Liquid Chromatography : Mass Spectrometry. W. M. A. Niessen. Chromatographic Science Series (79). 2ème éd. CRC, 1999.
73. Analyse chimique - Méthodes et techniques instrumentales modernes. F. Rouessac, A. Rouessac, D. Cruché. 6ème éd. Science Sup, Dunod, 2004.
74. The mass spectrometry: Its main applications in medical biology Doi : 10.1016/j.immbio.2012.01.008 J. Ingrand.
75. Briand G, Lemaire-Ewing S, Parente F, Garnotel R. [Mass spectrometry and inherited metabolic diseases diagnosis]. Ann Biol Clin (Paris). 2015 Feb;73(1):93–106.
76. Jemal M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. Biomed Chromatogr BMC. 2000 Oct;14(6):422–9.
77. Hopfgartner G, Varesio E, Tschäppät V, Grivet C, Bourgogne E, Leuthold LA. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. J Mass Spectrom JMS. 2004 Aug;39(8):845–55.
78. Laiko VV, Baldwin MA, Burlingame AL. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Anal Chem. 2000 Feb 15;72(4):652–7.
79. Lam H, Deutsch EW, Eddes JS, Eng JK, King N, Stein SE, et al. Development and validation of a spectral library searching method for peptide identification from MS/MS. Proteomics. 2007 Mar;7(5):655–67.
80. Craig R, Cortens JP, Beavis RC. The use of proteotypic peptide libraries for protein identification. Rapid Commun Mass Spectrom RCM. 2005;19(13):1844–50.

Annexe

Annexe 1 : estimation des valeurs normales

Hommes	
Age	Taux hepcidine en ng/mL
28	19,1
55	17,7
31	20,1
13	11,4
83	9,59
25	6,5
44	8,9
31	16,3
54	5,5
71	8,5
68	13,6
34	11,5
29	7,5

Femmes	
Age	Taux hepcidine en ng/mL
32	7,9
64	12,0
25	3,0
79	9,1
27	8,4
48	7,98
37	5,14
67	16,06
27	4,32
26	14,7
21	6,44
55	15,5
18	7,7
29	13,6
39	12,2
33	8,2
46	10,4

Caractéristique du test de Student

Méthode : Two Sample t-test; Alternative :two.sided

Statistique observée Qobs : 1.5178038124945

p-value : 0.1402748841311

Degrés de liberté : 28

Moyenne : Groupe 1: 12.014615384615 ; Groupe 2: 9.5670588235294

Annexe 2 : fidélité :

LOQ

2

moyenne
ecart type SD
CV %
Exactitude %

Répétabilité

J1 J2 J3

2,16 2,60 2,30
1,56 2,20 2,60
2,06 2,40 2,30
2,11 1,90 2,20
1,93 2,10 2,30

Reproductibilité

1,96 2,24 2,34 2,18
0,24 0,27 0,15 0,27
12,30 12,06 6,48 12,23
-1,80 12,00 17,00 9,07

LOQ

ANOVA

Répétabilité

SD (intra) : racine (SMintra) 0,23

CV% : SM (intra)/ moy (repro) 10,40

Reproductibilité

SM(inter)-SM(intra)/n 0,03

J9+SM(intra) 0,08

SD (inter) : racine (J10) 0,28

CV% : SD/moy (repro) 12,89

QC1

5

moyenne
ecart type SD
CV %
Exactitude %

Répétabilité

J1 J2 J3

5,4 4,7 4,6
4,9 5,1 4,9
4,4 5,6 5
5,2 4,9 4,9
4,9 4,7 4,9

Reproductibilité

4,96 5,00 4,86 4,94
0,38 0,37 0,15 0,30
7,62 7,48 3,12 6,11
-0,80 0,00 -2,80 -1,20

QC1

ANOVA

Répétabilité

SD (intra) : racine (SMintra) 0,32

CV% : SM (intra)/ moy (repro) 6,47

Reproductibilité

SM(inter)-SM(intra)/n -0,02

J23+SM(intra) 0,09

SD (inter) : racine (J10) 0,29

CV% : SD/moy (repro) 5,96

QC3

100

Répétabilité

	J1	J2	J3	
	102,96	104,6	103,7	
	101,23	100,3	97,1	
	102,81	101,5	101,3	
	99,39	100,9	98,6	
	98,16	99	102,3	Reproductibilité
moyenne	100,91	101,26	100,60	100,92
ecart type SD	2,11	2,08	2,70	2,16
CV %	2,09	2,06	2,69	2,14
Exactitude %	0,91	1,26	0,60	0,92

QC3

ANOVA

	Répétabilité
SD (intra) : racine (SM _{intra})	2,32
CV% : SM (intra)/ moy (repro)	2,30
	Reproductibilité
SM(inter)-SM(intra)/n	-0,96
J51+SM(intra)	4,40
SD (inter) : racine (J10)	2,10
CV% : SD/moy (repro)	2,08

QC2

30

Répétabilité

	J1	J2	J3	
	30,9	30,8	26,4	
	30,3	29,3	30,1	
	31,3	30,3	29,7	
	29,2	29,2	27,1	
	29	30,7	29,5	Reproductibilité
moyenne	30,14	30,06	28,56	29,59
ecart type SD	1,02	0,76	1,68	1,36
CV %	3,37	2,54	5,90	4,58
Exactitude %	0,47	0,20	-4,80	-1,38

QC2

ANOVA

	Répétabilité
SD (intra) : racine (SM _{intra})	1,22
CV% : SM (intra)/ moy (repro)	4,12
	Reproductibilité
SM(inter)-SM(intra)/n	0,50
J37+SM(intra)	1,98
SD (inter) : racine (J10)	1,41
CV% : SD/moy (repro)	4,76

Serment

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.

Résumé :

L'hépcidine, protéine découverte il y a seulement une dizaine d'année, est l'hormone de régulation du métabolisme du fer. Elle diminue le taux de fer sérique en dégradant la ferroportine.

Par la découverte de son mécanisme d'action ainsi que les voies de signalisation régulant son expression, les mécanismes physiopathologiques des surcharges et des carences en cet oligoélément ont pu ainsi être mieux compris et expliqués. Très vite de nombreuses équipes se sont intéressées à son dosage plasmatique et l'intérêt de celui-ci dans diverses pathologies allant des surcharges en fer aux anémies inflammatoires.

Une méthode de dosage de l'hépcidine par couplage de la spectrométrie de masse en tandem et de la chromatographie liquide a été mise en point au sein du laboratoire de biochimie du CHU de Bordeaux.

Cette méthode a été ensuite validée selon les critères du COFRAC et de l'EMA permettant ainsi la réalisation de ce dosage pour des échantillons d'un groupe de travail de la SFBC. Elle s'est avérée répétable et reproductible avec un intervalle de quantification possible entre 2 et 120 ng/ml.

Le groupe de travail sur « l'intérêt clinique du dosage de l'hépcidine » a pour objectifs de comparer les différents systèmes analytiques actuellement disponibles et de définir les recommandations d'utilisation.

Les résultats de la comparaison inter-laboratoire ont montré une importante variation des valeurs obtenues par les cinq laboratoires participants qui diminue après standardisation des résultats.

Par cette forte variabilité observée lors de la comparaison inter-laboratoire et par la difficulté d'interprétation due aux différents facteurs influençant l'expression de l'hépcidine, l'intérêt du dosage de l'hépcidine doit encore être évalué par d'autres études mais il semble déjà pouvoir permettre d'orienter le diagnostic de différentes pathologies.

Titre en anglais :

Development of an assay of hepcidin by coupling liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Participation in a inter-laboratory comparison.

Mots clé : Hepcidine, fer, spectrométrie de masse, dosage, comparaison interlaboratoire.