



HAL
open science

Rôle et intérêt du dosage de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer

Julien Miozzo

► **To cite this version:**

Julien Miozzo. Rôle et intérêt du dosage de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03761876

HAL Id: dumas-03761876

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03761876v1>

Submitted on 2 Nov 2022

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

RÔLE ET INTÉRÊT DU DOSAGE DE L'HEPCIDINE DANS L'HOMÉOSTASIE DU FER

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE MEDICALE

Par M. Julien MIOZZO

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le : 29/10/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

Mme le Professeur Sophie PARK

Membres :

M. le Professeur Pascal MOSSUZ

Mme le Docteur Laetitia VAN NOOLEN (directrice de thèse)

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2020-2021

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre-Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
PR Ass. Méd.	BOILLOT Bernard	
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH émérite	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH émérite	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur ; Addictologie
PU-PH émérite	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH émérite	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
MCF Ass.MG	CHAMBOREDON Benoît	Médecine Générale
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	CHAVET Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PR Ass. Méd.	DEFAYE Pascal	Cardiologie
PU-PH	DEGANO Bruno	Pneumologie ; addictologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH émérite	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH émérite	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH émérite	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH émérite	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH émérite	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
PR Ass. Méd.	LARAMAS Mathieu	Cancérologie ; radiothérapie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GOUELLEC LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDOUX Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH émérite	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
PR Ass. Méd.	MATHIEU Nicolas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie ; addictologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie ; radiothérapie
PU-PH émérite	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
PR Ass. Méd.	ORMEZZANO Olivier	Cardiologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	PERNOD Gilles	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes ; Addictologie
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PR Ass. Méd.	RECHE Fabian	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH émérite	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH émérite	ROMANET Jean Paul	Ophtalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
PU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
PR Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
PU-PH émérite	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH émérite	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	THEVENON Julien	Génétique
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VALMARY-DEGANO Séverine	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	VANZETTO Gérard	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH émérite	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers
 PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
 MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale
 PR Ass. Méd. : Professeur des Universités Associé de Médecine
 PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale
 MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

Remerciements

A Mme le Professeur Sophie PARK,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et de porter un intérêt à mon travail.

A Mr le Professeur Pascal MOSSUZ,

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger ce manuscrit. Soyez également remercié pour vos connaissances transmises lors des cours d'hématologie cellulaire pendant mon internat.

A Mme le Docteur Laetitia VAN NOOLEN,

Je te remercie sincèrement pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta bienveillance. Merci pour les connaissances que tu m'as apportées sur le sujet, pour ton encadrement et la lecture attentive de mon travail. Sois assurée de ma profonde reconnaissance et de l'honneur que tu me fais.

A ma famille,

Tout d'abord à vous, mes chers parents, je ne vous remercierai jamais assez de m'apporter tout votre amour et tout votre soutien, notamment pendant ces longues années d'études. Merci pour l'éducation que vous m'avez transmise qui m'a permis d'en arriver jusqu'ici. Merci pour votre

présence réconfortante, pour tous ces moments de joies et ces week-ends ensemble à la maison. Cela n'a pas de prix. A mes grands-parents également, et spécialement à ma Mamie qui a suivi mes études de près sans avoir pu en voir la fin. Merci pour ton amour inconditionnel.

A toi, Hélène, pour être tout simplement la meilleure des sœurs ! Tu as toujours été un modèle pour moi et je suis tellement fier de toi. Merci d'avoir été à mes côtés en toutes circonstances. Merci également à toi Fabien, et à mon adorable neveu, Jules.

A Samuel, merci de croire en moi et de m'encourager à me dépasser tous les jours. Merci pour ton écoute et ton soutien.

A mes amis,

Je vous remercie pour le bonheur que vous m'apportez. Merci de me soutenir depuis de nombreuses années dans mon parcours d'études médicales. Merci d'être présents dans ma vie. A Alexis particulièrement, mon frérot, toi qui as partagé ces longues années de médecine avec moi et qui es devenu un ami très cher. Tu m'as épaulé pendant tout ce temps, merci pour ton amitié, tes conseils et tous ces beaux voyages passés et à venir : « It's a beautiful day... » !!

A mes co-internes,

Quelle sacrée aventure passée à vos côtés ! Je suis si content de vous avoir rencontré et d'avoir évolué à vos côtés durant ces années. Je remercie mes deux Laura préférées, Joris (ce bon vieux Jojo), Edouard (mon brave Edou), Capucine et Dominik : les pioupious qui ont bien grandi depuis ! Mais aussi Julliane (la Queen au cœur de pierre mais tendre à la fois), Arthur (pour cette maison bleue adossée à la colline), Morgan (car on a quand même bien rigolé au R2) et tous les autres que je n'oublie pas !

Je reviens particulièrement vers toi Laura, ma Lauradorée. L'internat n'aurait pas eu la même saveur sans toi, alors sache que je te remercie mille fois d'avoir tout le temps été auprès de moi. Les amitiés comme la nôtre, soudée en si peu de temps, sont rares et je suis si heureux d'être ton Tic et toi ma Tac ! Merci de m'avoir fait autant rire, de m'avoir abreuvé de potins et pour ton aide si précieuse durant l'internat.

Merci également à tous les biologistes et techniciens que j'ai pu rencontrer durant mon internat

Sommaire

Listes des figures et tableaux	11
Liste des abréviations :	13
Introduction.....	14
I. Le métabolisme du fer :	16
1. Généralités (1) :	16
1.1. Absorption	18
1.2. Distribution.....	20
1.3. Stockage	22
1.4. Utilisation du fer dans l'érythropoïèse.....	23
1.5. L'érythrophagocytose : recyclage du fer par les macrophages.....	24
2. L'homéostasie du fer :	26
2.1. Régulation intracellulaire :	26
2.2. Régulation extracellulaire :	29
3. Découverte de l'hepcidine : principale hormone de régulation du fer.....	30
3.1. Rôle de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer :	30
3.2. Actions physiologiques de l'hepcidine et régulations:	31
3.2.1. Régulation par le fer :	33
3.2.2. Régulation par l'inflammation :	38
3.2.3. Régulation par l'érythropoïèse:.....	42
II. Hpcidine et situations physiopathologiques : Applications cliniques du dosage de l'hepcidine	48
1. Principales maladies génétiques de surcharge et carence en fer	49
1.1. Les Hémochromatoses héréditaires	49
1.1.1. Les hémochromatoses de forme classique :	50
1.1.2. Les hémochromatoses de forme juvénile :	52
1.1.3. La maladie de la ferroportine :	52
1.2. Anémie résistante au traitement par le fer oral (IRIDA : Iron Resistant Iron Deficiency Anemia)	53
2. Anémie par carence en fer absolue.....	55
3. Anémie de l'inflammation et maladies infectieuses	56
4. Anémie de l'insuffisant rénal.....	58

5.	Béta-thalassémie	59
6.	Syndromes myélodysplasiques	60
7.	Anémie du cancer.....	62
III.	Partie analytique : dosage de l'hepcidine et mise en place de la méthode au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes.....	64
1.	Contexte	64
2.	Techniques de dosage	65
2.1.	Dosages immunologiques	65
2.1.1.	ELISA	65
2.1.2.	RIA	66
2.1.3.	Dosage par spectrométrie de masse.....	66
3.	Spécificités préanalytiques et variabilité individuelle	69
3.1.	Rythme circadien.....	69
3.2.	Influence de l'alimentation	70
3.3.	Quel conditionnement et quelle matrice choisir?.....	71
3.4.	Température et durée de stockage.....	71
3.5.	Valeurs de référence dans la littérature	72
4.	Dosage par LC-MS/MS au CHUGA	74
4.1.	Description de la méthode	74
4.2.	Performances analytiques.....	75
4.2.1.	Domaine de mesure	75
4.2.2.	Répétabilité	76
4.2.3.	Fidélité intermédiaire.....	77
4.2.4.	Comparaison de méthode.....	78
4.2.5.	Valeurs de référence	80
IV.	Conclusion	81
	Références bibliographiques.....	83
	Article.....	89
	Serment d'Hippocrate.....	123

Listes des figures et tableaux

Liste des figures :

Figure 1 : Absorption duodénale du fer au niveau des entérocytes par l'intermédiaire de HCP1 pour le fer héminique et de DMT1 après réduction par le DcytB pour le fer non héminique.	20
Figure 2 : Phénomène d'érythrophagocytose avec relargage du fer héminique par le macrophage.	25
Figure 3: Régulation intracellulaire : Représentation schématique de la régulation post-transcriptionnelle par liaison IRP/IRE en cas de diminution du fer.....	28
Figure 4 : Régulation de l'expression de l'hepcidine inspirée de « Added value of hepcidin quantification for the diagnosis and follow-up of anemia-related diseases » de T.Lefebvre & al.	33
Figure 5 : Représentation schématique de l'interaction BMP/HJV membranaire et de BMP/HJV soluble ainsi que leur effet sur l'expression de l'hepcidine.	37
Figure 6 : Mécanismes de régulation de l'expression de l'hepcidine par le fer et l'inflammation d'après «Inherited disorders of Iron Overload» de K.Pantopoulos (30).....	41
Figure 7 : Mécanisme de régulation de la suppression de l'expression de l'hepcidine par l'érythropoïèse, inspiré de « Regulation of Heparin by Erythropoiesis : The story so far » par Pasricha & al.	45
Figure 8 : Variation de l'hepcidine en fonction du sexe et de l'âge selon l'article de O.Itkonen & al « Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method »	73

Figure 9 : Droite de corrélation des dosages d’hepcidine entre le laboratoire du CHU de Grenoble et celui de Louis Mourier 78

Figure 10 : : Diagramme des différences concernant la méthode de dosage de l’hepcidine effectuée au laboratoire du CHU de Grenoble et à celui de Louis Mourier..... 79

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Comparaison des 6 modèles d’hémochromatoses héréditaires..... 53

Tableau 2 : Résumé des variations d’hepcidine selon certaines pathologies..... 63

Tableau 3 : Valeurs de référence de l’hepcidine établies par technique LC-MS/MS retrouvées dans la littérature. 74

Tableau 4 : Résultats du test de la répétabilité pour le dosage de l’hepcidine..... 76

Tableau 5 : Résultats du test de la fidélité intermédiaire pour le dosage de l’hepcidine 77

Tableau 6 : Valeurs de référence du dosage de l’hepcidine sérique réalisées sur 35 échantillons (21 femmes et 14 hommes)..... 80

Liste des abréviations :

- ACO1	Aconitase 1
- BMP	Bone Morphogenic Protein
- BMP-RE	Bone morphogenic protein responsive element
- CV	Coefficient de variation
- DcytB	Cytochrome B Duodéal
- DMT1	Divalent Metal Transporter 1
- EDTA	Ethylène diamine tétra acétate
- ERFE	Erythroferrone
- EPO	Erythropoïétine
- FNLT	Fer non lié à la transferrine
- GDF-15	Growth and Differentiation Factor 15
- HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
- HCP1	Haem carrier protein 1
- HFE	Protéine de l'hémochromatose
- HJV	Hémojuvéline
- IL	Interleukine
- IRE	Iron Response Element
- IRP	Iron Response Protein
- LC	Chromatographie liquide
- LOQ	Limite de quantification
- MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
- MS	Spectrométrie de masse
- NTBI	Non transferrin Bound Iron
- RTf	Récepteur de la transferrine
- SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation
- SMAD	Small mothers against decapentaplegic
- SMD	Syndrome myélodysplasique
- SPE	Solid phase extraction
- STEAP	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
- STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
- TWSG1	Twisted gastrulation protein

Introduction

L'homéostasie du fer est un phénomène biologique important et indispensable au sein de l'organisme. Pour cela, ce dernier a développé de nombreux mécanismes complexes et efficaces pour maintenir l'équilibre physiologique de cet oligo-élément. La découverte en 2001 du rôle de l'hepcidine a complètement révolutionné les connaissances concernant le métabolisme du fer. Cette molécule est actuellement considérée comme la seule hormone régulatrice de l'homéostasie du fer, en agissant sur une cible bien connue désormais : la ferroportine. L'hormone a ainsi un effet hyposidérémiant en se fixant à la ferroportine située principalement à la surface des entérocytes et cellules macrophagiques.

La production de l'hepcidine est stimulée majoritairement par l'augmentation de la concentration en fer ainsi que par l'inflammation. A l'inverse, la production de l'hepcidine est diminuée lorsqu'il y a, par exemple, une activation de la production de globules rouges (érythropoïèse). Certaines situations pathologiques peuvent donc altérer l'homéostasie du fer et l'hepcidine se révèle être un excellent marqueur biologique pour investiguer les anomalies en fer, que ce soit dans le cadre d'une surcharge ou d'une carence en fer.

Le dosage de l'hepcidine est ainsi utile dans l'exploration de l'homéostasie du fer et s'avère être un véritable challenge pour les laboratoires de biologie médicale voulant mettre en place l'analyse. L'absence d'harmonisation entre les techniques existantes en fait un dosage variable et difficilement standardisable. Une méthode de dosage à la fois fiable et robuste est nécessaire pour pouvoir établir l'analyse en routine hospitalière. Aussi, plusieurs études scientifiques démontrent que la technique de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse

réunie ces critères et cette méthode a donc été mise en place au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes.

Cette revue systématique de la littérature permet de rassembler sur plusieurs dizaines d'années les connaissances actuelles sur l'homéostasie du fer, sur l'hepcidine, ainsi que sur les nombreuses pathologies pour lesquelles le dosage de l'hepcidine s'avère approprié. Elle met également en avant la difficulté de mise en place du dosage et les nombreuses étapes préanalytiques à maîtriser. Enfin, nous présentons les points essentiels de la validation de méthode du dosage de l'hepcidine mis en place au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes.

I. Le métabolisme du fer :

1. Généralités (1) :

Le fer est un oligo-élément faisant parti des sels minéraux, essentiel à l'organisme. Ses propriétés d'oxydo-réduction le rendent indispensable au bon fonctionnement enzymatique du corps humain, au transfert d'électrons mais aussi à la synthèse d'ADN et au transport de l'oxygène en le fixant sur l'hémoglobine.

Le fer est présent dans l'organisme sous deux formes : le fer ferrique (Fe^{3+}), forme insoluble, et le fer ferreux (Fe^{2+}), quant à lui soluble.

Cette dernière forme peut réagir avec l'oxygène et est donc très réactive. Elle entraîne la production de radicaux libres par la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^-$) et peut être très toxique au niveau cellulaire.(2)

Notons que le fer ferreux est rarement retrouvé dans la circulation sanguine. La forme oxydée ou liée aux protéines est la plus fréquente.

Dans l'organisme, la quantité de fer est d'environ 4 grammes chez un adulte et se répartit en 3 compartiments principaux (3) :

- Compartiment fonctionnel :

70 % du fer total, ce fer est en majorité présent dans l'hémoglobine et représente environ 2,8g.

- Compartiment de réserve en fer tissulaire :

25 % du fer total, il est stocké principalement dans la ferritine au niveau du foie et représente environ 1g.

- Compartiment de transport (fer plasmatique) :

0.1 % du fer total, lié principalement à la transferrine et représente seulement 4mg.

La grande majorité du fer dans l'organisme n'est pas fournie par l'alimentation mais par les macrophages qui recyclent le fer présent dans les hématies sénescents. Une des particularités concernant le métabolisme du fer est l'absence de véritable voie d'élimination. Seul 1 mg de fer est excrété en 24 heures, principalement par la sueur, les ménorragies, et la desquamation intestinale et de la peau. La régulation fine et complexe du fer se porte donc essentiellement sur son entrée dans l'organisme, au niveau des entérocytes situés dans l'intestin, et sur son relargage ou sa rétention par les macrophages et les hépatocytes. L'absorption intestinale sert donc à compenser les pertes physiologiques du fer. Elle augmente lorsque les pertes deviennent excessives ou en cas de pathologies du métabolisme du fer.

Afin d'équilibrer les quantités de fer dans l'organisme, de nombreux flux intra et extra cellulaires sont donc mis en jeu. Une concentration trop élevée dans le plasma, ou trop faible aboutit à un état pathologique.

En effet, une hyposidérémie entraîne par exemple une anémie du fait d'une restriction en fer au niveau des précurseurs érythroïtiques, limitant ainsi la synthèse de l'hémoglobine.

Le déficit en fer entraîne également de forts dysfonctionnements cellulaires qui se manifestent cliniquement par de nombreux signes comme une atteinte des cellules épithéliales au niveau unguéal, lingual ou œsophagien, ou encore par une diminution de la force musculaire et une asthénie.

A l'opposé, une trop forte concentration en fer dans le plasma entraîne une saturation de la capacité de fixation en fer de la transferrine, aboutissant alors à la formation de complexes via la fixation de l'excès de fer à d'autres protéines plasmatiques. Ces complexes sont appelés NTBI pour Non Transferrin Bound Iron ou FLNT pour Fer non lié à la transferrine.

Ces NTBI sont avidement captés par les hépatocytes, ce qui entraîne une accumulation toxique et des dommages tissulaires importants, notamment par la fabrication de radicaux libres. D'autres cellules captent également les NTBI mais les mécanismes utilisés sont encore peu

connus et complexes. Dans certaines pathologies de surcharge en fer que nous verrons plus loin, d'autres organes que le foie sont également sensibles à cette accumulation toxique comme le cœur ou les glandes endocrines.

1.1. Absorption

Les produits carnés (viande, abats), le chocolat, les lentilles, les épinards, ou encore certaines céréales sont des aliments riches en fer. Aussi, un régime alimentaire européen couvre de loin les besoins physiologiques. Une alimentation équilibrée amène entre 10 et 20 mg de fer par jour mais seulement 1 à 2 mg seront absorbés, en raison de sa faible biodisponibilité.

L'absorption digestive du fer est un mécanisme actif qui a lieu principalement dans le duodénum au niveau des entérocytes présents au sommet des villosités intestinales. (4)

La diminution de l'absorption du fer est une première étape de régulation pour éviter les surcharges en fer, car aucun moyen efficace ne permet d'éliminer l'excès de fer dans l'organisme.

L'absorption intestinale (figure 1) se fait à partir de deux formes de fer différentes. Le fer héminique ou organique, est d'origine animale et intègre la structure de l'hème. Il entre dans la composition de l'hémoglobine et la myoglobine et se trouve sous forme ferreux (Fe^{2+}). Tandis que le fer non héminique ou inorganique, est d'origine végétale et se trouve principalement sous forme de fer ferrique (Fe^{3+}).

- **Fer héminique** : absorption directe du fer Fe^{2+} associé à l'hème via un transporteur membranaire spécifique à la surface des entérocytes : HCP1 (Haem Carrier Protein 1), puis dégradation intracellulaire de l'hème via l'hème oxydase et libération du fer Fe^{2+} dans le cytosol. Environ 20% du fer héminique présent dans la lumière intestinale est absorbé.
- **Fer non héminique** : l'absorption s'effectue après réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} via le cytochrome B réductase duodénal (DcytB), puis il y a absorption de Fe^{2+} à travers la membrane apicale de l'entérocyte via le transporteur Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). Seulement 5% du fer non héminique est absorbé dans l'organisme par cette voie-là.

Une fois dans l'entérocyte, le fer peut être soit utilisé comme co-facteur, soit stocké par la ferritine, ou bien exporté dans la circulation sanguine par l'intermédiaire de la ferroportine, une protéine transmembranaire codée par le gène *SLC40A1* et exprimée au pôle basal de l'entérocyte. Ce fer subira ensuite une oxydation par la ferroxidase héphaestine, l'enzyme ancrée sur la membrane basale de l'entérocyte, ou par une céruloplasmine soluble, avant de se fixer à la transferrine qui distribuera le fer dans l'organisme. (4)

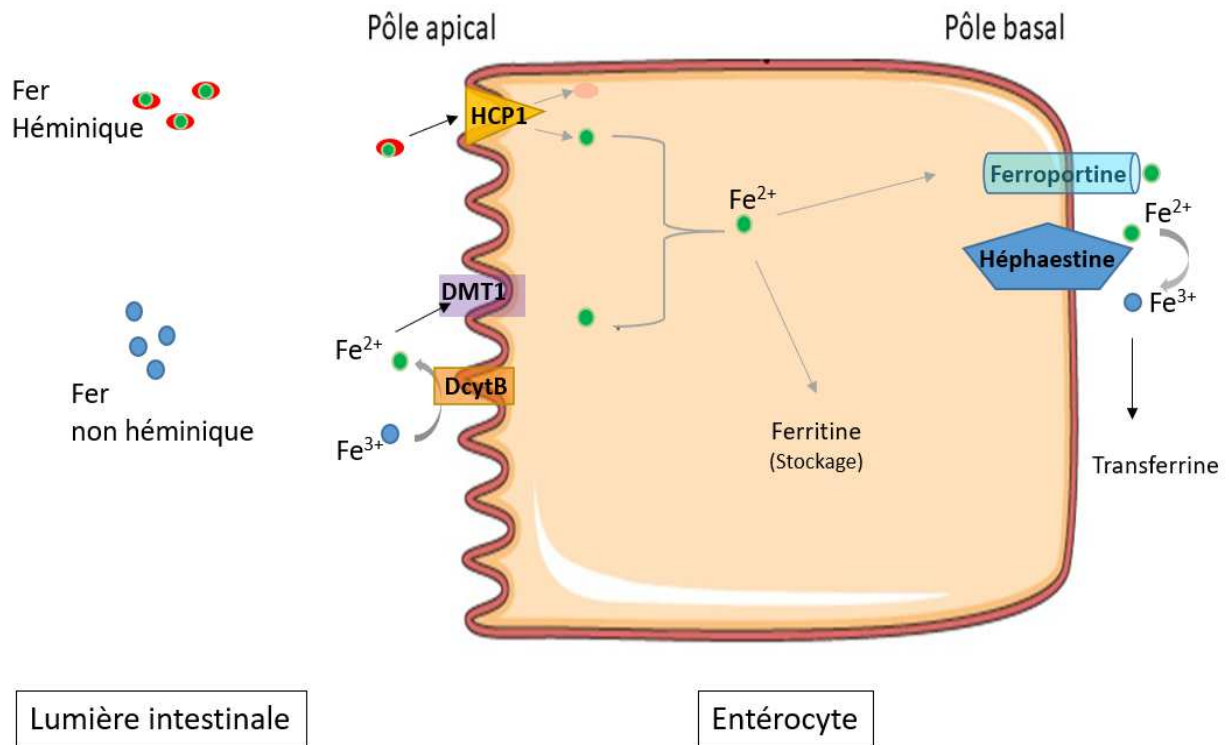


Figure 1 : Absorption duodénale du fer au niveau des entérocytes par l'intermédiaire de HCP1 pour le fer héminique et de DMT1 après réduction par le DcytB pour le fer non héminique.
 DcytB = cytochrome B duodénal ; DMT1 = Divalent metal transporter 1 ; HCP1 = Haem carrier protein 1

1.2. Distribution

Dans le sang, le fer est en faible quantité. Il correspond au compartiment de transport et ne représente que 0,1% du fer total, soit 4 mg. (5) Nous le retrouvons essentiellement lié à la transferrine. Cette dernière, également appelée sidérophiline, est une protéine synthétisée par les hépatocytes qui a la capacité de fixer deux atomes de fer sous forme ferrique (Fe^{3+}). Son rôle est primordial car elle permet d'acheminer le fer jusqu'à la moelle osseuse, étape nécessaire pour l'érythropoïèse, en prenant en charge l'excrétion du fer intracellulaire dans le plasma (fixation du fer à la sortie des macrophages, des entérocytes, des cellules de Kupffer ou encore après la destruction des globules rouges par hémolyse).

Chez un sujet sain, la capacité de transport du fer par la transferrine est loin d'être utilisée en totalité et le pourcentage de saturation est compris entre 25 et 35%. La transferrine ayant capté deux atomes de fer, va ensuite se lier à son récepteur de type 1 (RTf1) de haute affinité, exprimé à la surface de la plupart des cellules consommatrices de fer, comme par exemple les érythroblastes.

Ce récepteur va lui-même interagir avec d'autres protéines de surface comme le complexe HFE - Beta2-microglobuline qui favorise la captation du fer dans la cellule en internalisant RTf1 lié à la transferrine.

Le fer est ensuite disponible pour être incorporé aux protéines, comme par exemple dans l'hème pour la synthèse de l'hémoglobine, ou stocké majoritairement dans les hépatocytes grâce à la ferritine. (3)

Quand le taux de saturation de la transferrine augmente, la transferrine di-ferrique va se fixer également sur un récepteur de type 2 de moindre affinité (RTf2), exprimé quant à lui principalement au niveau des hépatocytes. (6) Le fer sera donc accumulé dans le foie en se liant à la ferritine pour empêcher la circulation d'une trop grande quantité de fer libre.

Ce fer lié à la ferritine est facilement mobilisable et les réserves hépatiques sont utilisées en cas de carence en fer.

Enfin, au niveau hépatique, la liaison de la transferrine à ses récepteurs RTf1 et RTf2 en interaction avec la protéine de surface de l'hémochromatose (HFE), va indirectement diminuer l'absorption intestinale de fer par induction de la production d'une hormone hyposidérémiant, l'hepcidine.

1.3. Stockage

Le fer est majoritairement stocké en se liant à la ferritine, protéine ubiquitaire mais essentiellement localisée au niveau des macrophages présents dans la moelle osseuse et la rate, ainsi que dans le foie au niveau des hépatocytes et des cellules de Kupffer. C'est une forme de stockage rapidement mobilisable en cas de besoin en fer.

La ferritine est une macromolécule constituée d'un noyau ferrique pouvant contenir 4000 atomes de fer au sein de son anfractuosité centrale. Sa synthèse est régulée grâce à des complexes « senseurs » de fer, que nous verrons par la suite, qui vont détecter les variations de concentration de fer disponible dans l'organisme.

Bien qu'étant une protéine principalement intracellulaire, le dosage de la ferritine peut se faire dans le sérum car une partie de celle-ci se retrouve dans le compartiment sanguin à des concentrations comprises entre 20-200 µg/l. Ce dosage permet donc de statuer sur une carence en fer en cas de valeur inférieure à 20 µg/l, alors qu'une augmentation des concentrations peut survenir dans des causes diverses comme les pathologies de surcharge en fer, mais aussi dans un syndrome inflammatoire, une cytolysse hépatique ou encore dans l'alcoolisme chronique.

Le fer est également stocké de façon minoritaire en se liant à l'hémosidérine, forme dégradée de la ferritine, constituant une forme de stockage insoluble, de mobilisation plus lente.

1.4. Utilisation du fer dans l'érythropoïèse

Les hématies ont une durée de vie d'environ 120 jours. Les macrophages ont pour rôle de phagocyter les globules rouges sénescents afin de permettre un renouvellement érythropoïétique. Ce renouvellement s'appelle l'érythropoïèse et a lieu au sein de la moelle osseuse. Cette dernière produit environ 200 milliards de globules rouges par jour pour compenser la destruction des vieilles hématies, ce qui en fait l'organe le plus consommateur de fer avec un besoin par jour d'environ 20 mg.

La captation du fer par les précurseurs érythroïdes, comme les érythroblastes, s'effectue grâce à la liaison du complexe fer-transferrine aux récepteurs de surface de la transferrine (RTf). Ces récepteurs sont des dimères composés de deux sous-unités identiques, liées entre elles par deux ponts disulfures. Il existe deux types de récepteurs de la transferrine, RTf1 et RTf2, qui ne sont pas codés par les mêmes gènes. RTf1, situé à la surface de la plupart des cellules, sert à l'acquisition du fer. RTf2, quant à lui, est exprimé principalement dans le foie et ne joue pas de rôle direct dans la captation du fer mais plutôt dans la signalisation cellulaire suite à l'augmentation de la saturation de la transferrine. La liaison de la transferrine à son récepteur entraîne une endocytose du complexe formé « transferrine-fer-récepteur », puis la libération du fer dans le cytosol de la cellule grâce à l'acidification progressive de l'endosome néoformé. La transferrine est ensuite recyclée vers le plasma et le récepteur Rtf à la surface de l'érythroblaste. Le fer, sous forme ferrique, est ensuite réduit par une ferriréductase (Steap3) puis sera utilisé pour la formation de l'hème. Cette étape a lieu dans la mitochondrie lors de la maturation de la cellule érythroblastique en globule rouge. (3,4)

1.5. L'érythrophagocytose : recyclage du fer par les macrophages

Pour que l'organisme réutilise le fer contenu dans les hématies, les macrophages du système réticulo-endothélial phagocytent les hématies sénescents et libèrent ensuite le fer dans le sang. Ce mécanisme, appelé érythrophagocytose, fonctionne en circuit fermé et permet le recyclage d'environ 25 à 30 mg de fer par jour, avec un renouvellement du fer toutes les deux heures environ. Ceci garantit ainsi les besoins journaliers de l'érythropoïèse. (7)

Au cours du cycle de vieillissement des hématies, celles-ci acquièrent des modifications biochimiques au niveau membranaire qui leur permettront d'être reconnues par les macrophages de la rate et de la moelle osseuse principalement.

Ces changements consistent en (1,8):

- la présence à la surface cellulaire de phosphatidylsérine : un phospholipide constituant la membrane plasmique des globules rouges,
- une moindre déformabilité de l'hématie,
- une diminution des composés intervenant dans la constitution des glycoprotéines et glycolipides de la membrane cellulaire (résidus sialiques), associée à une peroxydation des lipoprotéines et une augmentation de marqueurs antigéniques de sénescence.

Après endocytose de l'hématie, il y a dégradation de l'hème par les enzymes contenues dans le lysosome néoformé : NADPH-cytochrome c réductase, hème-oxygénase-1 et biliverdine réductase. Cette dégradation va permettre de libérer le fer présent dans l'hémoglobine. Le fer est ensuite stocké dans la ferritine et/ou exporté dans la circulation par la ferroportine où il peut

de nouveau se fixer à la transferrine après oxydation par la céruléoplasmine, une ferroxidase plasmatisque synthétisée dans le foie (figure 2).

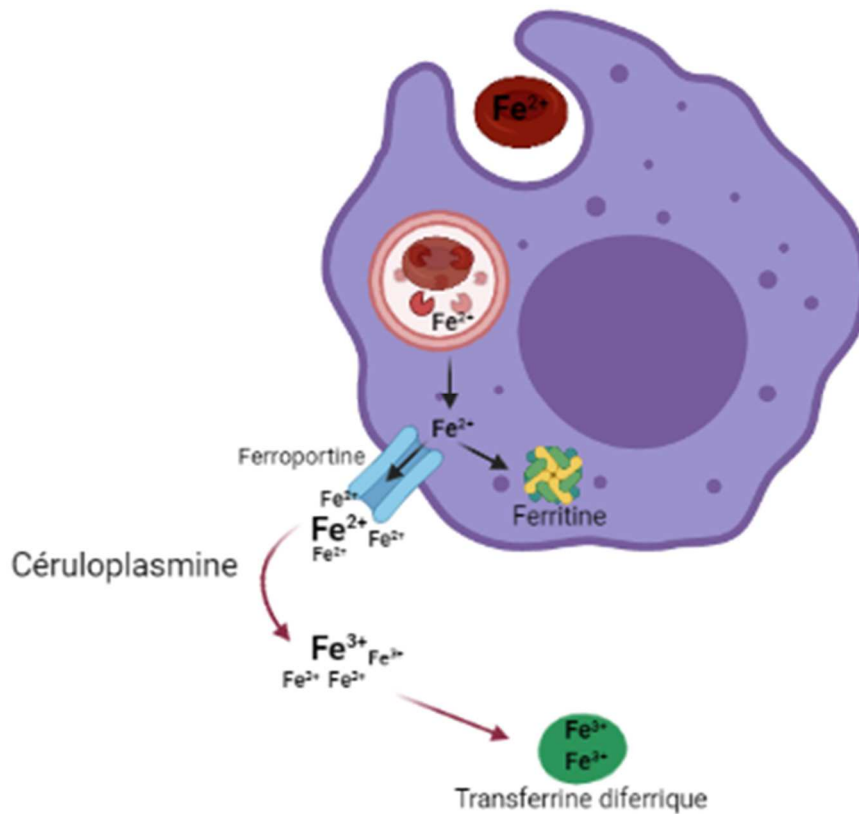


Figure 2 : Phénomène d'érythrophagocytose avec relargage du fer héminique par le macrophage.

(Image créée avec BioRender)

Cette érythrophagocytose a lieu essentiellement dans la rate. On estime que 80 à 90% des globules rouges sont éliminés par les cellules macrophagiques. Le reste des hématies est détruit par hémolyse intravasculaire, relarguant ainsi directement l'hémoglobine dans la circulation sanguine. (8)

2. L'homéostasie du fer :

De nombreuses protéines telles que la ferritine, la transferrine, la ferroportine et l'hepcidine ont un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du fer.

Cette homéostasie systémique implique divers processus physiologiques. La régulation du fer est effectuée au niveau intracellulaire grâce au système IRE/IRP alors que la régulation extracellulaire est principalement sous dépendance de l'hepcidine, une hormone hyposidérémiante.

2.1. Régulation intracellulaire :

Au niveau intracellulaire, un procédé permet de contrôler l'expression des gènes qui codent certaines protéines impliquées dans le métabolisme du fer.

Cette régulation, essentiellement post-transcriptionnelle, s'effectue en fonction des concentrations de fer intracellulaire et repose sur l'interaction entre une protéine IRP 1 ou 2 (Iron Regulatory Protein) et un motif IRE (Iron Responsive Element).(1,9)

Les IRP (Iron Regulatory Protein) sont des protéines cytoplasmiques ayant la capacité de se fixer sur les IRE en absence de fer et jouent un rôle de senseur du fer. Les IRE sont des segments d'ARN constitués d'une dizaine de nucléotides. Très conservés entre les espèces, ces motifs possèdent une structure en tige-boucle spécifique et sont situés dans les régions 5' ou 3' non traduites (5' ou 3'-UTR) des ARNm codant pour les protéines :

- du métabolisme (aconitase mitochondriale, 5-aminolevulinate synthase),
- du transport (RTf1, DMT1, ferroportine),
- ou du stockage du fer (ferritine).

L'interaction entre une IRP et un IRE a lieu lorsque la concentration de fer intracellulaire diminue. Pour la ferritine et la ferroportine, l'interaction des IRP - IRE se situe en 5'UTR, ce qui bloque la traduction de l'ARNm. A l'inverse, concernant la transferrine et la DMT1, l'interaction se situe en 3' UTR, ce qui stabilise l'ARNm (figure 3).

IRP1 est une forme moléculaire différente de IRP2 et est également appelée aconitase cytosolique 1 (ACO1). Quand le fer est élevé dans la cellule, il y a formation d'un complexe Fer-Soufre (Fe-S) au sein de IRP1 qui peut alors remplir ses fonctions d'aconitase cytosolique 1. Sous cette forme, elle ne peut se lier aux IRE. En revanche, quand les concentrations intracellulaires en fer sont basses, le complexe Fe-S est déstabilisé, la protéine récupère sa fonction d'IRP et peut de nouveau se fixer aux IRE (en 3' pour RTf1 et DMT-1, en 5' pour la ferritine et la ferroportine).(3,9)

IRP2 quant à elle, ne possède pas d'activité aconitase ni de complexe Fe-S. En présence de fer ou d'hème, IRP2 s'oxyde puis est dégradée par le protéasome et ne se lie donc pas aux IRE. De ce fait, grâce aux IRP senseurs du fer, l'accumulation toxique du fer sous forme soluble dans la cellule, est anticipée par l'augmentation du stockage du fer dans la ferritine (absence de liaison de IRE en 5') et la diminution des entrées de fer intracellulaire avec la baisse de RTf1 (absence de liaison de IRE en 3').

Au contraire, quand la cellule a besoin de fer, l'expression de la ferritine et de la ferroportine sont diminuées par blocage de la traduction de leur ARNm. Les stocks sont donc libérés et l'absorption intracellulaire du fer est accrue grâce à l'augmentation des récepteurs de la transferrine et de DMT1.

La relation entre le milieu intracellulaire et extracellulaire est donc primordiale car les échanges de fer permettent de maintenir un équilibre entre ces deux compartiments. Et c'est grâce à la

modulation des flux du fer par l'action du complexe IRP/IRE que l'homéostasie dans la cellule est conservée.

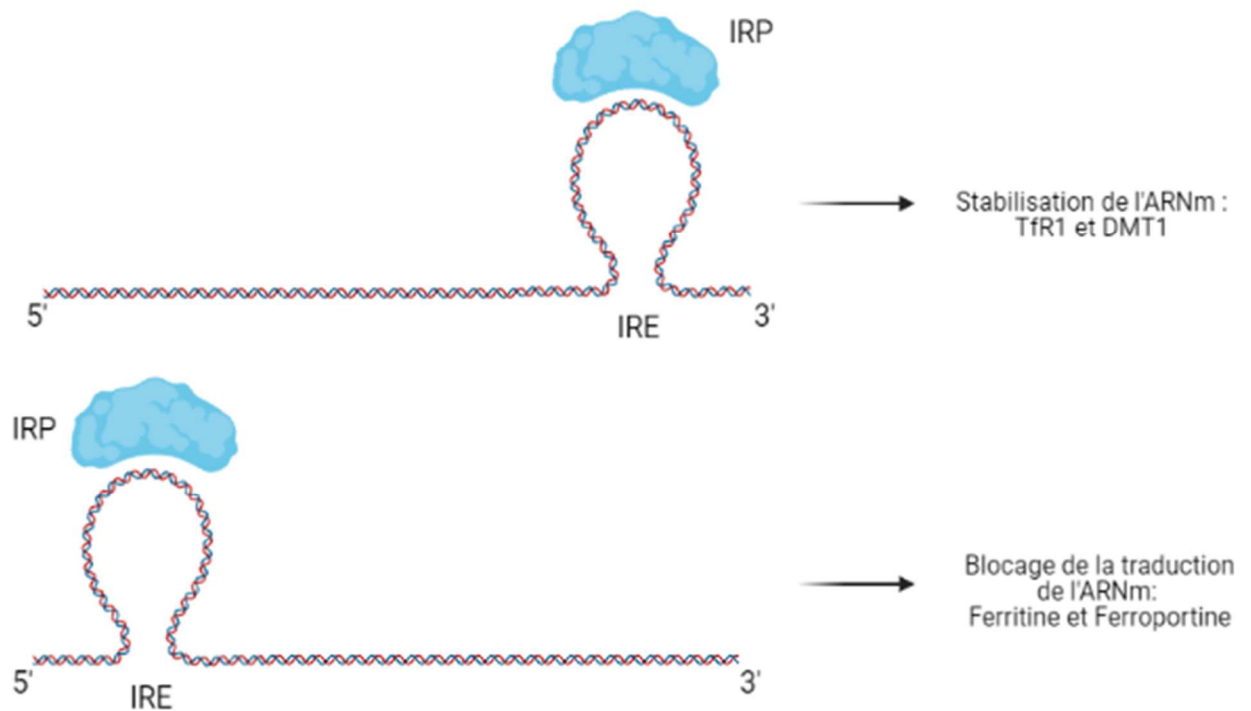


Figure 3: Régulation intracellulaire : Représentation schématique de la régulation post-transcriptionnelle par liaison IRP/IRE en cas de diminution du fer.

IRP = Iron regulatory protein ; IRE = Iron responsive element

(Image créée avec Biorender)

2.2. Régulation extracellulaire :

La régulation systémique du fer extracellulaire s'effectue grâce à l'hepcidine, une molécule dont nous verrons les propriétés en détail dans le prochain chapitre. Il existe principalement 3 étapes majeures sur lesquelles l'hepcidine peut avoir une action. (7)

- la libération du fer par les macrophages ayant recyclés les globules rouges lors de l'érythrophagocytose,
- la libération du fer stocké dans les hépatocytes,
- et la libération du fer par les entérocytes après absorption duodénale.

Concernant le relargage du fer dans le milieu extracellulaire, il se fait à travers une protéine transmembranaire : la ferroportine.

La ferroportine est une protéine codée par le gène *SCL40A1*, se situant à la surface des macrophages, des hépatocytes et au pôle basal des entérocytes. Elle est la cible de l'hepcidine. Cette protéine exporte le fer du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, contribuant ainsi à l'augmentation de la sidérémie. (1)

La ferroportine est le seul exporteur de fer connu à ce jour chez l'homme et est régulée par l'hepcidine. Cette hormone peptidique circulante a pour effet d'internaliser la ferroportine qui sera ensuite dégradée dans la cellule. Le flux du fer en direction du plasma est donc bloqué, aboutissant à une rétention du fer intracellulaire et une diminution du fer dans le milieu extracellulaire.

Ainsi, en présence d'hepcidine, il y a diminution de la ferroportine à la surface des cellules cibles, ce qui aboutit à :

- une diminution du relargage du fer par les macrophages et les hépatocytes,
- une diminution de l'absorption duodénale par blocage du transfert de fer de l'entérocyte au système sanguin.

3. Découverte de l'hepcidine : principale hormone de régulation du fer

3.1. Rôle de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer

L'hepcidine est un peptide d'une vingtaine d'acides aminés, préalablement décrite comme ayant des propriétés antimicrobiennes. Ce n'est qu'en 2001 que son implication dans l'homéostasie du fer a été mise en évidence (10,11). De nombreuses études ont découvert que sa synthèse est induite par l'augmentation du fer dans le sang et l'inflammation, et que son rôle principal est de diminuer la concentration de fer dans le sang (12). Actuellement, cette molécule est considérée comme la principale hormone de régulation de l'homéostasie du fer, en contrôlant son absorption intestinale et sa libération dans l'organisme, aboutissant ainsi à un effet hyposidérémiant.

L'hepcidine existe sous la forme de 20, 22 ou 25 résidus d'acides aminés, elle est synthétisée principalement par le foie puis est sécrétée dans le sang. Elle est produite après clivages successifs de son précurseur, la préprohepcidine (84 acides aminés). Ce dernier est codé par le gène *HAMP* (Hepcidin antimicrobial peptid) situé sur le chromosome 19.

La forme bioactive quant au métabolisme du fer correspond à l'hepcidine-25 : hautement conservée au sein des espèces de vertébrés, elle contient huit cystéines formant quatre ponts disulfures qui favorisent la stabilité de la molécule et lui confère une faible immunogénicité.

(13)

Ce peptide est détectable dans différents milieux biologiques, à savoir le sang, les urines et le liquide céphalo-rachidien. Les urines contiennent également les formes mineures de 20 et 22 acides aminés, tronquées au niveau de leur extrémité N-terminal et qui correspondraient aux produits de dégradation de l'hepcidine-25. (14) De plus, d'autres sites de sécrétion ont été mis en évidence comme le cerveau, le cœur, l'estomac, le pancréas et le rein, bien que leur rôle au sein de l'homéostasie du fer reste à déterminer et que celui-ci aurait surtout une action au niveau local.

Dans le plasma, l'hormone circule principalement sous forme libre mais peut également être liée, soit à l'albumine soit à l'alpha2-macroglobuline ; une faible partie est ensuite filtrée par le rein au niveau de la barrière glomérulaire et la fraction d'excrétion rénale est estimée entre 0.1% et 16% chez une personne en bonne santé. (15)

3.2. Actions physiologiques de l'hepcidine et régulations

La synthèse de l'hepcidine est contrôlée par plusieurs stimuli. Celle-ci est augmentée par exemple suite à l'accumulation du fer dans l'organisme et l'inflammation, alors qu'elle sera réprimée par la carence martiale, la demande érythropoïétique et l'hypoxie (7) (figure 4).

Les hépatocytes vont sécréter de l'hepcidine qui va aller se fixer sur la ferroportine, le seul transporteur membranaire connu chez les vertébrés à ce jour, qui assure la sortie du fer de la

cellule en particulier au niveau des entérocytes, des macrophages, des cellules de Kupffer et, en moindre mesure, au niveau des hépatocytes. (1)

Cette fixation va entraîner l'internalisation et la dégradation lysosomale du complexe moléculaire formé « hepcidine-ferroportine » et une réduction des flux du fer. Il en résulte un abaissement de la sidérémie par diminution de l'absorption intestinale du fer et une augmentation des réserves en fer par rétention intra-macrophagique et hépatocytaire. Cette hyposidérémie aura pour conséquence de limiter la disponibilité du fer pour les pathogènes, de réduire les apports en fer au niveau de la moelle osseuse et donc de diminuer l'érythropoïèse. Certaines études ont rapporté que l'augmentation du fer dans les entérocytes, suite à une concentration en hepcidine élevée, a pour conséquence de diminuer l'expression de DcytB et DMT1 et que ce dernier serait également dégradé via le protéasome. Ceci aboutit à un effet synergique avec la dégradation concomitante de la ferroportine. (16)

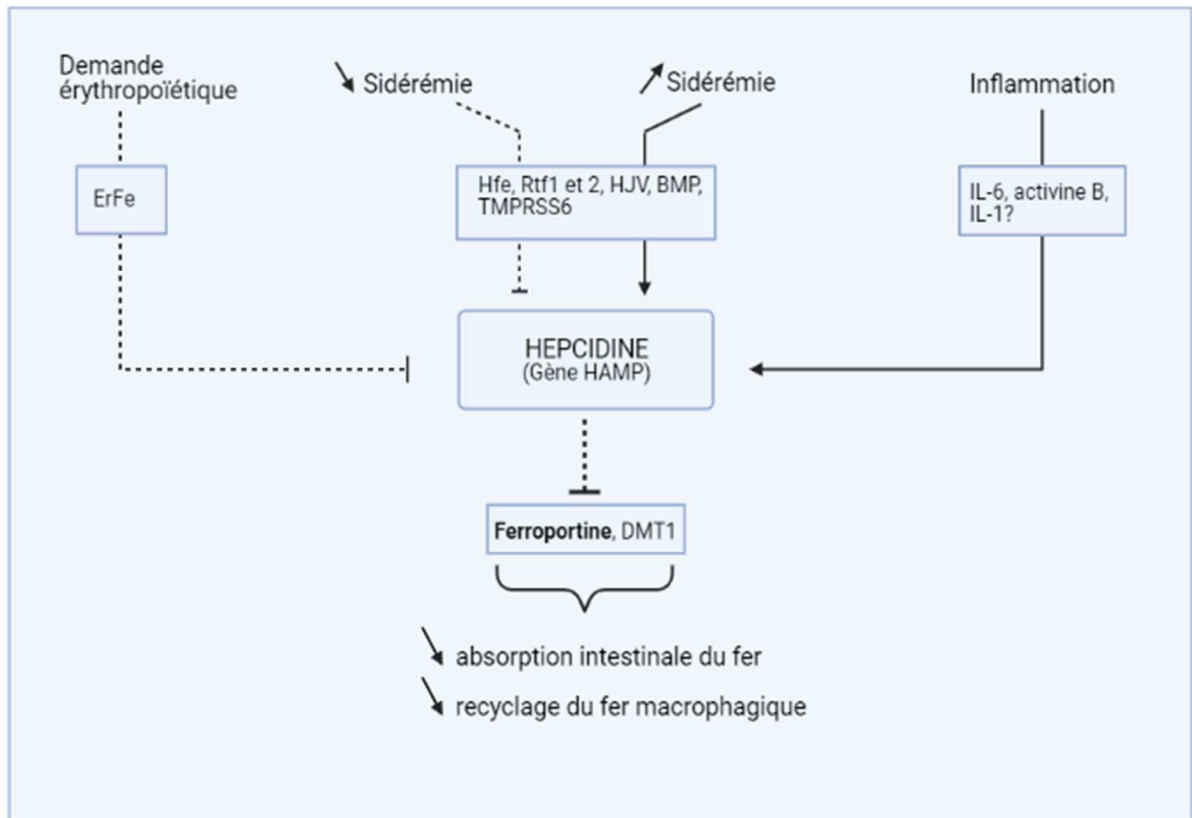


Figure 4 : Régulation de l'expression de l'hepcidine inspirée de « Added value of hepcidin quantification for the diagnosis and follow-up of anemia-related diseases », Ann Biol Clin (Paris). janv 2017;75(1):9-18, de T.Lefebvre & al. (12)

BMP = Bone morphogenetic protein ; DMT1 = Divalent metal transporter 1 ; ErFe = érythroferrone ; Hfe = protéine de l'hémochromatose ; IL = interleukine ; Rtf = Récepteur de la transferrine ; Tmprss6 = gène codant la sérine protéase matriptase-2 ; crée avec Biorender.com

3.2.1. Régulation par le fer

Comme toute hormone, une boucle de rétroaction régule finement la concentration de l'hepcidine et du fer. Ce dernier, par des mécanismes complexes, augmente la quantité d'hepcidine qui, en retour, diminue le fer dans la circulation sanguine.

Nous savons que la détection d'une variation de fer au niveau cellulaire entraîne une cascade de signalisation dans le but de produire ou d'inhiber la synthèse des protéines ayant un rôle dans l'homéostasie du fer (ferritine, ferroportine, DMT1...). Cependant, il n'est pas certain que les IRP (Iron Regulatory Proteins), protéines régulatrices du fer intracellulaire et sensibles à la variation de la sidéremie, soient présentes au niveau des hépatocytes. Or nous savons que le foie est l'organe qui produit en majorité l'hepcidine.

L'absence de tige-boucles spécifiques (IRE) permettant la fixation des IRP au niveau de l'ARN messager de l'hepcidine suggère que d'autres processus entrent en jeu.

En effet, il a été démontré que l'expression du gène *HAMP* qui code la synthèse de l'hepcidine, est modulée par de nombreux signaux, eux même reliés à la présence de fer.

Aussi, en cas d'augmentation de l'holotransferrine (transferrine liée à deux atomes de fer Fe^{3+}), celle-ci va aller se fixer sur ses récepteurs membranaires RTf1 et RTf2. Initialement, RTf1, qui a une plus grande affinité que RTf2, est complexé à la protéine HFE (protéine de l'hémochromatose) et forme un complexe membranaire « senseur » de la variation de la saturation de la transferrine. Cette protéine HFE entre en compétition avec la transferrine. Donc lorsque les concentrations de cette dernière augmente, HFE va se décrocher de son site de fixation sur RTf1 pour aller interagir avec RTf2. (17) (figure 6)

La présence de transferrine induit également une augmentation de la stabilité de RTf2.

Le complexe ainsi formé « Holotransferrine/RTf2/HFE » va ensuite stimuler l'expression de l'hepcidine par des mécanismes moléculaires subtils, en interagissant avec les récepteurs aux BMP (Bone Morphogenetic Protein) et la protéine membranaire hémojuvéline (HJV).

Dans la littérature, de nombreuses preuves scientifiques soulignent l'influence de la protéine HFE, de la protéine HJV et de RTf2 sur l'expression de l'hepcidine.

En effet, des mutations touchant l'un des trois gènes codant pour ces protéines sont associées à l'hémochromatose héréditaire, une maladie de surcharge en fer caractérisée par une augmentation de l'absorption intestinale en fer, une accumulation du fer dans les tissus et une sidérémie élevée.

Cette pathologie est la conséquence d'un déficit total ou partiel en hepcidine. De ce fait, une mutation touchant le gène même de cette hormone (gène *HAMP*) ou un gène impliqué dans la synthèse d'une protéine jouant un rôle sur l'expression de l'hepcidine (HFE, HJV, RTf2, ferroportine...) peut être responsable de cette maladie. (14,18–20)

Les hémochromatoses génétiques restent rares, et la mutation C282Y codant la protéine HFE est la plus connue. Ce type d'hémochromatose de l'adulte, dont la fréquence de l'état homozygote est estimée à 0.38 % (soit 1 individu sur 260) (1), se transmet selon un mode autosomique récessif et a une pénétrance clinique et biologique faible. Il se différencie des formes juvéniles causées, quant à elles, par des mutations touchant les gènes codant la protéine hémojuvéline ou l'hepcidine. Ces formes d'hémochromatoses se caractérisent, si le traitement n'est pas mis en place, par une défaillance multi-organes précoce, conséquence d'une accumulation de fer dans l'organisme et de la formation de radicaux libres. Cliniquement, les patients présentent selon l'atteinte, une cirrhose, une cardiomyopathie, un diabète voire un hypogonadisme hypogonadotrophique avant l'âge de 30 ans.

Pour ce qui est de la protéine HJV, la voie de transduction du signal qui active l'expression de l'hepcidine est à présent mieux connue dans le monde scientifique.

HJV agit comme co-récepteur des protéines BMP. En cas de surcharge en fer, il y a induction de l'expression de ces protéines BMP et notamment de BMP6 qui augmente de façon proportionnelle à la concentration de fer plasmatique (21). BMP6 va ensuite aller se lier à ses

récepteurs membranaires (BMP-R de type I et II) et entraîner l'activation d'un signal médié par les protéines Smad. (20,22)

Les BMP font parties des ligands de la superfamille des Transforming Growth Factors-beta. Ils induisent la phosphorylation des protéines cytoplasmiques SMAD 1, 5 et 8 (small mothers against decapentaplegic) en se fixant aux récepteurs kinase sérine thréonine de type 1 et 2 (BMP-R 1 et 2). Les protéines SMAD 1, 5 et 8 vont ensuite interagir avec SMAD 4 et former un complexe protéique. La translocation nucléaire de ce complexe permettra par la suite de réguler directement la transcription génique de l'hépcidine par fixation aux BMP-REs (BMP-responsive elements). Ceux-ci sont situés au niveau du promoteur du gène *HAMP* et leur fixation au complexe SMAD 4 / SMAD 1, 5, 8 aboutira à l'augmentation de l'hépcidine (figure 6).

En outre, en cas de déficit en fer, une protéase transmembranaire appelée sérine protéase matriptase-2 et encodée par le gène *TMPRSS6*, peut cliver l'HJV membranaire qui devient soluble.

A l'inverse de la protéine membranaire HJV qui participe à la stimulation de la production de l'hépcidine, cette forme soluble présente dans le sang diminue quant à elle l'expression de l'hépcidine par antagonisme sur la voie d'activation des BMP (figure 5). En se liant et séquestrant les BMP, ces derniers ne peuvent plus interagir avec leurs récepteurs membranaires, la voie d'activation BMP/HJV est donc inhibée. (1,20)

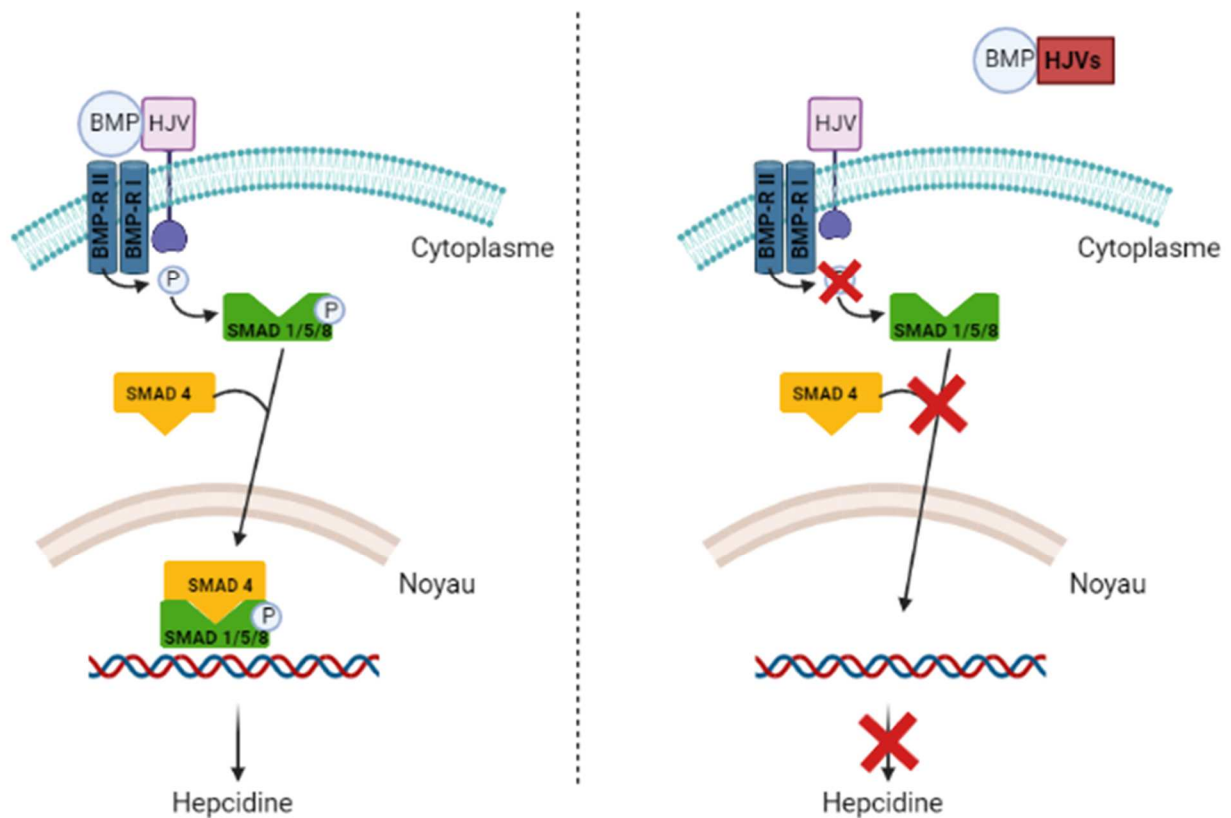


Figure 5 : Représentation schématique de l'interaction BMP/HJV membranaire et de BMP/HJV soluble ainsi que leur effet sur l'expression de l'hepcidine.

A droite, HJV s'empêche l'activation de la voie BMP/HJV en se liant aux protéines BMP, ce qui diminue la production d'hepcidine. BMP = Bone morphogenetic protein, BMP-R = Bone morphogenetic protein receptor, HJV = protéine membranaire hémajuveline, HJVs = protéine hémajuveline soluble, SMAD = protéines smad
(Image créée avec Biorender)

D'autres mécanismes, tel que la voie d'activation MAPK/ERK (Mitogen-activated Protein Kinases ; Extracellular signal-Regulated Kinases), ont également démontré leur intérêt dans la stimulation de l'hepcidine suite à la fixation de l'holotransferrine sur ses récepteurs RTf au niveau des hépatocytes. Mais cette voie-là reste encore à ce jour peu explorée. (22,23)

3.2.2. Régulation par l'inflammation

Il est reconnu que la diminution en fer plasmatique est la réponse de l'organisme à une infection ou une pathologie inflammatoire, dans le but de ne pas favoriser la croissance bactérienne.

En effet, le fer est un élément indispensable à la survie de la plupart des agents pathogènes. Pour capter le fer de leurs hôtes et le détourner à leur profit, les microorganismes ont dû développer des méthodes diversifiées. De ce fait, notre organisme a lui aussi développé une série de mécanismes pour rendre le fer indisponible aux pathogènes, tout en permettant son utilisation pour son propre besoin.

Ainsi, chez l'homme, le fer est compartimenté en plusieurs secteurs et fortement lié à certaines protéines comme la ferritine, la lactoferrine ou la transferrine qui le rendent non utilisable pour les microorganismes (les concentrations de fer libre sont très faibles).

Il est clairement établi que l'inflammation fait partie des facteurs principaux de régulation de l'hepcidine : son expression augmente en cas de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques, d'infections ou encore de maladies néoplasiques.

Classiquement, une hyposidérémie est retrouvée chez ces patients avec une transferrine diminuée et une capacité de saturation de transferrine abaissée. La ferritine, quant à elle, est souvent normale voire élevée dans un contexte de syndrome inflammatoire biologique.

La découverte de l'hepcidine a permis de mieux comprendre ce bilan martial perturbé.

Chez ces patients atteints de pathologies inflammatoires, l'excrétion urinaire d'hepcidine est augmentée. Plusieurs études ont donc essayé d'analyser le lien entre inflammation et hepcidine.

Aussi, il a été démontré qu'une injection d'interleukine 6 (IL6) chez l'homme induit une augmentation rapide de l'hepcidine urinaire (24) (25).

In vitro, la stimulation de cellules hépatocytaires humaines par un panel de cytokines pro-inflammatoires a montré une forte induction de l'hepcidine par IL-6 mais pas avec TNF-alpha ou IL-1. (26)

Cet effet est conforté par de nombreuses autres études qui indiquent que l'hepcidine est stimulée principalement par IL-6, une cytokine pro-inflammatoire nécessaire et suffisante pour contrôler la production d'hepcidine. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré une diminution de l'hepcidine après injection d'anticorps anti-IL-6 qui bloquent l'action de cette cytokine. Ceci montre l'importance de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dans la voie d'activation de l'hepcidine.

D'autres observations montrent toutefois qu'IL-1 augmente l'expression de l'hepcidine des hépatocytes murins et humains. De nombreuses recherches nécessitent donc de clarifier ces mécanismes très complexes.

La voie d'activation de la production d'hepcidine par l'inflammation a été largement documentée dans la littérature. Ainsi, lors d'un stimulus inflammatoire, la production d'IL-6 est augmentée et celle-ci va aller se fixer sur son récepteur transmembranaire. Cette liaison va activer les enzymes de la voie JAKs (Janus Kinases) et ces dernières vont ensuite phosphoryler les facteurs de transcription STAT (Signal transducer and activator of transcription) et notamment STAT3. La translocation de STAT3 dans le noyau et sa fixation au niveau du promoteur du gène de l'hepcidine permettra ainsi de réguler l'expression génique pour in fine produire l'hepcidine. (figure 6)

Un autre rôle de l'hepcidine concernant la réponse inflammatoire a été rapportée. Les lipopolysaccharides (LPS) sont connus pour être des activateurs macrophagiques et sont responsables de la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires.

Lorsque l'hepcidine se fixe au niveau du macrophage, elle entraîne une activation des enzymes JAK2 et la phosphorylation de STAT3 qui vont moduler la réponse aux LPS du macrophage. Cette liaison s'accompagne d'un effet anti-inflammatoire avec diminution de la sécrétion d'IL-6 et de TNF-alpha avec pour conséquences de réduire la toxicité induite par l'inflammation aiguë consécutive aux LPS. (27).

Enfin, plusieurs articles montrent une induction de l'hepcidine via la sécrétion d'activine B.

L'activine est une hormone connue principalement pour son influence sur la sécrétion de FSH (hormone folliculo-stimulante) et appartient à la superfamille des TGF- β . Elle comporte deux sous-unités β A et β B. Son rôle et le mécanisme concernant l'activation transcriptionnelle de l'hepcidine ne sont pas encore complètement élucidés, mais il est démontré que l'activine B est sécrétée en réponse à l'inflammation au niveau du foie et augmente l'expression de l'hepcidine. (28,29)

Cette stimulation de l'hepcidine passe par la voie des BMP. Après fixation à ses récepteurs (Activin receptor like kinase 2), l'activine B entraîne la phosphorylation et l'activation de protéines Smad 1, 5 et 8 qui conduiront à l'activation de la transcription d'hepcidine au niveau des cellules du foie, mais aussi au niveau des adipocytes, des macrophages et des cellules musculaires. (28)

La synergie d'action entre les voies d'activation JAK-STAT3 et BMP-SMAD en lien avec la réponse inflammatoire aboutira donc à l'augmentation importante de l'expression d'hepcidine.

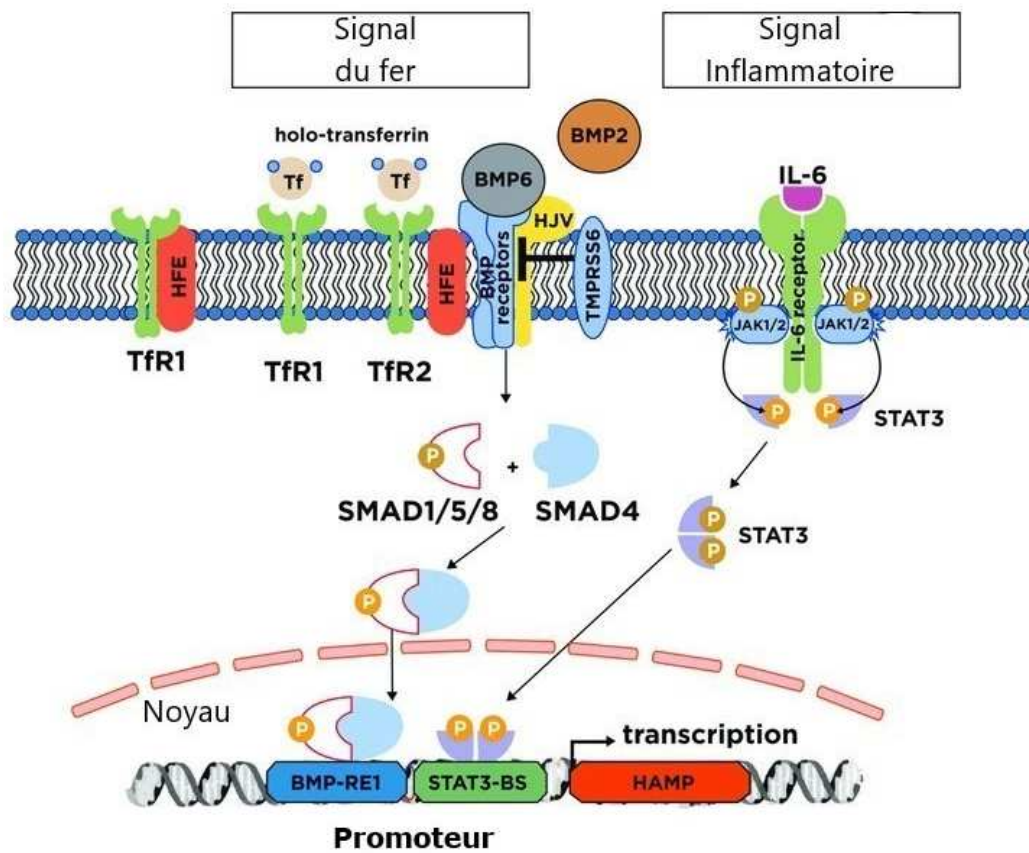


Figure 6 : Mécanismes de régulation de l'expression de l'hepcidine par le fer et l'inflammation d'après «Inherited disorders of Iron Overload» de K.Pantopoulos (30)

3.2.3. Régulation par l'érythropoïèse

La production d'hémoglobine nécessite une importante consommation de fer, ce qui fait de la moelle osseuse l'organe le plus demandeur en fer. Aussi, il est établi que l'hepcidine est réprimée par le système érythropoïétique et par tout stimulus augmentant les besoins en fer : saignement, administration d'érythropoïétine (EPO), hypoxie, hémolyse...

Une diminution de la quantité d'hepcidine est en effet mesurée après stimulation de l'érythropoïèse dans plusieurs études. Chez l'homme, une diminution drastique des concentrations apparaît environ 24 heures après injection d'EPO (31) et aux alentours de 15 heures après une phlébotomie ou un traitement par EPO chez la souris. (32)

Une élévation de l'absorption digestive du fer et du recyclage macrophagique s'ensuivra afin d'approvisionner la moelle osseuse en fer.

Un dialogue entre le site principal de production de l'hepcidine, à savoir le foie, et la moelle osseuse est donc nécessaire.

Certaines études montrent qu'en présence d'hypoxie, la fixation des facteurs de transcription HIF (hypoxia inducible factors) au niveau du promoteur du gène *HAMP* supprime la production d'hepcidine (33).

Des chercheurs ont suggéré un mécanisme alternatif par lequel l'hypoxie entraîne une suppression de l'hepcidine. Ils relèvent le fait que le facteur de croissance PDGF-BB (Platelet derived-growth factor) est élevé dans le plasma d'individus exposés à l'hypoxie de façon proportionnelle à la diminution de l'hepcidine. In vivo les expérimentations sur les souris et in vitro sur les cellules de foie, montrent que l'administration de PDGF-BB supprime l'hepcidine via la modulation de l'expression de CREB et CREB-H (cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein H), deux facteurs de transcriptions hautement exprimés au

niveau du foie et de l'intestin grêle, et connus pour leur rôle dans le métabolisme des triglycérides. (34)

Plus localement, des expériences sur la souris montrent que l'hypoxie intestinale, par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription HIF2- α , aurait pour effet d'amplifier l'expression des transporteurs de fer au niveau de l'entérocyte. DMT1, DcytB et la ferroportine seraient ainsi augmentés pour maximiser l'absorption intestinale du fer. (35–37)

D'autres études par ailleurs, démontrent que la présence d'EPO est une condition nécessaire à l'hypoxie pour inhiber l'expression de l'hepcidine (38)(39).

En fait, ce n'est pas l'hypoxie ou encore l'anémie qui suppriment directement la transcription de l'hepcidine mais leur présence entraîne la sécrétion d'érythropoïétine qui va activer l'érythropoïèse. Cette activation conduit ensuite, par l'intermédiaire de médiateurs secondaires, à la suppression de l'hepcidine (figure 7). (34)

Plusieurs facteurs de régulation de l'activité érythroïde ont donc été proposés comme médiateurs sécrétés par la moelle osseuse et exerçant un effet inhibiteur sur la libération d'hepcidine par les hépatocytes.

Parmi les principaux candidats, GDF-15 (Growth differentiation Factor-15, facteur de croissance appartenant à la famille des TGF- β) et TWSG1 (Twisted Gastrulation protein, également membre de la famille des TGF- β) ont été proposés comme inhibiteurs de l'hepcidine, notamment grâce aux analyses effectuées chez les patients thalassémiques, connus comme ayant une hepcidine basse.(40)(41)

En effet, cette pathologie est caractérisée par une anémie congénitale due à des mutations qui suppriment partiellement ou totalement l'expression du gène de la β -globine (ou α -globine

selon le type de la thalassémie), aboutissant ainsi à une dysérythropoïèse. Cette maladie est associée à des concentrations basses en hepcidine et une accumulation de fer dans l'organisme. En parallèle, de fortes concentrations en GDF-15 ont été mesurées chez ces patients et il a été découvert que son expression était prédominante au niveau des érythroblastes. TWSG1 a été identifié comme second régulateur érythroïde et agirait avec GDF-15 pour inhiber de façon inappropriée l'expression de l'hepcidine. (41)

Cette molécule TWSG1, détectée à un stade précoce de la différenciation des érythroblastes (à la différence de GDF-15 exprimée à un stade plus tardif), supprimerait l'hepcidine par le biais de la voie des BMP, plus particulièrement en inhibant le signal médié par les protéines Smad. Cependant, l'absence d'augmentation statistiquement significative de GDF15 et TWSG1 chez les souris Th3+ ayant un phénotype identique aux patients thalassémiques (42) remet en question le rôle exact de ces protéines dans l'homéostasie du fer. D'autant plus que d'autres études semblent aller à l'encontre de leur contribution essentielle à supprimer l'expression de l'hepcidine, après avoir démontré une absence d'augmentation de GDF-15 et TWSG1 en réponse à une hémorragie.(32)(43)

La découverte de l'érythroferrone (ERFE) comme nouveau régulateur érythroïde a permis d'explorer de nouvelles pistes concernant la suppression de l'hepcidine lors de l'activation de l'érythropoïèse et de caractériser les effets de cette molécule.

L'érythroferrone était précédemment connue sous le nom de myonectine (CTRP15), une protéine appartenant à la famille apparentée aux protéines C1q/TNF et encodée par le gène *Erfe*, anciennement appelé gène *FAM132b*.

Cette hormone a un rôle prédominant sur les autres stimuli concernant la régulation de l'hepcidine, comme le montre la diminution de l'hepcidine chez les patients ayant une

stimulation de l'érythropoïèse ou une dysérythropoïèse avec une accumulation en fer ou une inflammation concomitante.(34)(44)(45)

L'érythroferrone est stimulée par l'augmentation en érythropoïétine qui est produite par le rein en réponse à une diminution de l'hémoglobine ou l'hypoxie. Elle est codée par le gène *Erfe* et sécrétée par les érythroblastes au niveau de la moelle osseuse.

Une fois dans le sang, ERFE semble avoir une action directe sur les hépatocytes mais les mécanismes moléculaires restent, pour le moment, incertains.

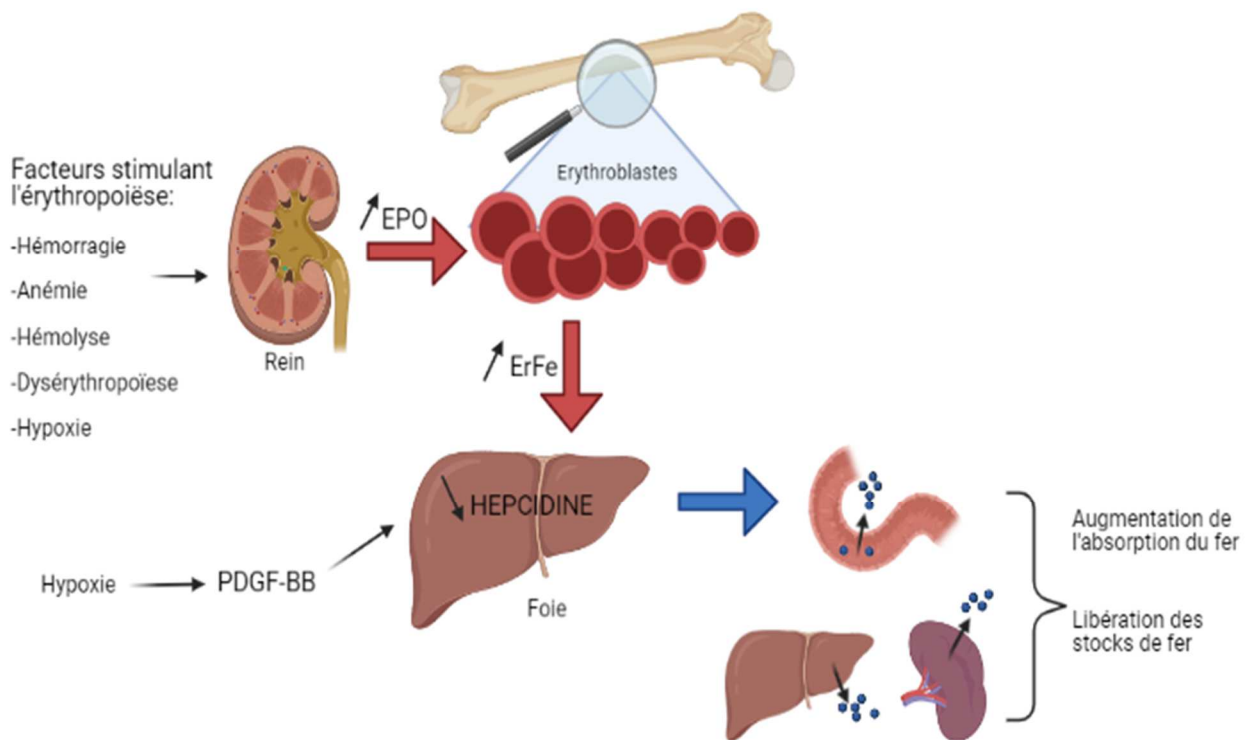


Figure 7 : Mécanisme de régulation de la suppression de l'expression de l'hepcidine par l'érythropoïèse, inspiré de « Regulation of Hepcidin by Erythropoiesis : The story so far », Annu Rev Nutr. 17 juill 2016;36 (1):417-34, de Pasricha & al (34)

Notons que c'est l'anémie induite par la dysérythropoïèse qui stimule la production d'EPO par le rein. EPO = érythropoïétine ; ErFe = erythroferrone ; PDGF-BB = Platelet-derived growth factor BB ; crée avec Biorender

Une induction de l'expression du gène *Erfe* est observée chez la souris, dans la rate et la moelle osseuse, après traitement par EPO. La moelle osseuse devient l'organe exprimant le plus l'ARN messager du gène *Erfe*, plus particulièrement au niveau des érythroblastes basophiles et polychromatophiles. (32)

La littérature scientifique (32,34) expose le fait que chez la souris « knockout » ayant une délétion du gène *Erfe*, la suppression en hepcidine attendue après une injection d'Erythropoïétine (EPO) ou une phlébotomie n'a pas lieu. Les souris ayant un génotype hétérozygote expriment, quant à elles, un degré intermédiaire de suppression entre les souris knockout homozygotes et les souris sauvages qui expriment normalement le gène *Erfe*.

De plus, la mise en place d'une technique ELISA a permis de détecter l'érythroferrone dans le plasma qui augmente, comme prévu, chez les souris après administration d'EPO. Enfin, il est rapporté que les modèles de souris atteints de béta-thalassémie ont une concentration en ERFE très élevée dans le sang et que cette concentration diminue après transfusion sanguine.

La fixation de l'EPO à son récepteur active la voie JAK2-STAT5. Cette cascade moléculaire est nécessaire pour l'activation de l'érythropoïèse (46).

Pour explorer l'implication de la voie de signalisation JAK2-STAT5 dans la production de l'érythroferrone, l'équipe de Kautz & al. (32) a mesuré par qRT-PCR la quantité d'ARNm du gène *Erfe* au sein des cellules de moelle osseuse de souris, incubées pendant 15 heures avec de l'érythropoïétine, puis traitées avec un inhibiteur de STAT5 (pimozide ou N'-((4-oxo-4H-chromen-3-yl)méthylène)nicotinohydrazide). Il a été mis en évidence que l'expression de l'ARNm *Erfe* était inhibée malgré la stimulation par EPO. Ainsi, cette dernière semble réguler l'expression de ERFE par l'intermédiaire de la voie d'activation JAK2-STAT5 après fixation à son récepteur à la surface des érythroblastes.

Pour aller plus loin, ces mêmes scientifiques ont essayé de savoir si la voie d'activation BMP/SMAD, très importante dans la régulation de la transcription d'hepcidine, était inhibée en cas d'augmentation de l'érythropoïèse. Pour cela, ils ont également mesuré le taux de phosphorylation de Smad5 dans le foie de souris après injection d'EPO ou de phlébotomie. Leurs données suggèrent que la diminution de l'hepcidine n'est, dans ce cas, pas liée à l'inactivation de la voie BMP/SMAD ; la phosphorylation de Smad5 ne diminuant pas de manière statistiquement significative au sein des deux groupes de souris.

Des articles plus récents ont également investigué les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'hepcidine par l'érythroferrone. Ils présentent quant à eux, des résultats contraires à l'étude ci-dessus concernant l'inactivation de la voie BMP/SMAD en cas de stimulation de l'érythropoïèse. Ils démontrent chez la souris, que ERFE diminue l'expression de l'hormone en se fixant aux protéines BMP et plus précisément à BMP6, ce qui bloque la voie d'activation BMP/SMAD. (47) In vitro, la phosphorylation des protéines Smad 1 et 5 est également diminuée dans les cellules traitées par ERFE, par rapport aux cellules contrôles. (48) Ces données démontrent que ERFE possède bien une action inhibitrice sur la voie impliquant les protéines Smad 1 et 5. A ce jour, ERFE est reconnu unanimement comme facteur érythroïde inhibiteur de l'expression de l'hepcidine.

II. Hepcidine et situations physiopathologiques :

Applications cliniques du dosage de l'hepcidine

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la régulation de l'hepcidine est un phénomène complexe dont la finalité est d'activer ou d'inhiber l'expression du gène *HAMP*. Les cascades moléculaires utilisées dans ce but sont régies par des gènes pouvant être la cible de plusieurs mutations. Ces mutations ont pour conséquence de perturber la production d'hepcidine et l'homéostasie du fer.

En effet, une carence en hepcidine induit une hyperabsorption intestinale ainsi qu'une fuite macrophagique du fer qui s'accumule de façon excessive dans les organes, notamment au niveau du foie. A l'inverse, un excès d'hepcidine bloque l'absorption intestinale du fer ainsi que l'excrétion du fer recyclé par les macrophages, entraînant une anémie par carence en fer. Nous verrons dans ce chapitre les principales maladies touchant le métabolisme du fer et leur effet sur les concentrations en hepcidine dans l'organisme, afin de démontrer l'intérêt du dosage dans ces situations (tableau 2).

1. Principales maladies génétiques de surcharge et carence en fer

1.1. Les Hémochromatoses héréditaires

Les hémochromatoses héréditaires (HH) sont le fait d'un déficit relatif ou absolu en hepcidine par mutation, soit du gène de l'hormone (gène *HAMP*), soit d'un des gènes impliqués dans les mécanismes de production de l'hepcidine (protéine HFE, RTf2, HJV). Notons toutefois que pour l'hémochromatose de type 4 (tableau 1), ce n'est pas la synthèse de l'hepcidine qui est abolie mais il existe un défaut de sensibilité de la ferroportine à l'hormone (gain ou perte de fonction de la protéine). Dans l'HH de type 4B, la mutation du gène de la ferroportine aboutissant à une résistance d'action (gain de fonction), explique que les concentrations sanguines en hepcidine soient normales voire élevées.

Le manque en hepcidine engendre une élévation du fer plasmatique ($>30\mu\text{mol/L}$) et une saturation des capacités de fixation du fer de la transferrine. En l'absence de compensation de l'excès de fer chez l'Homme, cette saturation en général supérieure à 45%, conduit à l'accumulation toxique du fer dans l'organisme sous forme de FNLT (fer non lié à la transferrine, ou NTBI). La surcharge parenchymateuse, dite dans ce cas primaire, est principalement hépatique, cardiaque et endocrine compte tenu de l'avidité de ces tissus envers cette forme de FNLT. (1,4,49)

1.1.1. Les hémochromatoses de forme classique

a/ Hémochromatose de type 1 :

Le type hémochromatosique de loin le plus fréquent est celui avec mutation du gène *HFE* (hémochromatose de type 1). Cette maladie, transmise de façon autosomique récessive, nécessite que les deux gènes *HFE* soient mutés pour devenir cliniquement parlante. La mutation en cause dans la majorité des hémochromatose-maladies est l'homozygotie C282Y (remplacement d'une cystéine par une tyrosine en position 282 qui perturbe le repliement de la protéine HFE et empêche son interaction avec la β -2 microglobuline).

Cette mutation est assez répandue, en particulier en Europe du Nord, mais reste nettement supérieure à la fréquence de patients atteints cliniquement d'hémochromatose. Ceci s'explique par une pénétrance biologique et clinique insuffisante de l'homozygotie C282Y. L'existence de facteurs de risque acquis ou génétiques (syndrome métabolique, polymorphisme génétique, alcool...) sont susceptibles de moduler l'expression clinique de la pathologie qui reste malgré tout plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. (1,19)

La gravité de la maladie est indirectement liée à la concentration d'hepcidine résiduelle, puisque la diminution drastique de l'hepcidine chez ces patients, entraîne une hyperabsorption intestinale et une libération du fer intracellulaire (macrophages, hépatocytes) incontrôlable. Son dosage a donc toute sa place pour le pronostic et le suivi thérapeutique.

b/ Hémochromatose de type 3 :

Beaucoup moins fréquente, l'hémochromatose de type 3 est la conséquence de mutations du gène du récepteur de la transferrine de type 2 (50). Cette mutation de transmission autosomique récessive, aboutie à la synthèse d'une protéine RTf2 tronquée. Ce récepteur,

localisé principalement au niveau hépatique, régule l'homéostasie du fer et active la transcription de l'hepcidine. Or dans l'hémochromatose de type 3, la dysfonction du récepteur de la transferrine 2 aboutira à une forte diminution de l'expression de l'hepcidine avec un tableau clinique similaire à celui de l'hémochromatose de type 1.

c/ Hémochromatose de type 4B :

Cette maladie est due à des mutations du gène *SLC40A1* codant pour la ferroportine. L'hémochromatose de type 4 (avec ses sous types 4A et 4B) est la seule forme de surcharge en fer génétique ayant une transmission dominante.

Le sous type 4B est comparable cliniquement aux formes d'hémochromatose de type 1 et 3 avec une augmentation de la ferritinémie, de la saturation en fer de la transferrine et une accumulation du fer principalement au niveau des tissus parenchymateux. La différence majeure est la concentration élevée d'hepcidine, expliquée par la physiopathologie de cette maladie. Dans ce cas, les mutations aboutissent à un gain de fonction de la protéine par insensibilité à l'action de l'hepcidine. La ferroportine se voit donc exprimée en permanence au niveau intestinal, hépatique et macrophagique : son activité n'est pas inhibée par l'hormone. Ces conditions aboutissent à une surcharge en fer plasmatique et donc une apparition de FNLT, ainsi qu'une accumulation toxique en premier lieu au niveau hépatique. En réponse à cette hypersidérémie, il y a donc production d'hepcidine. (1,49)

1.1.2. Les hémochromatoses de forme juvénile

Elles regroupent les hémochromatoses de type 2A et 2B et se transmettent sur un mode autosomique récessif. Assez rares, elles se caractérisent par une atteinte du sujet jeune avec une symptomatologie sévère notamment au niveau cardiaque, hépatique et endocrine associée à des concentrations d'hepcidine indétectables.

Elles se distinguent entre elles par une atteinte génétique différente : l'hémochromatose de type 2A est la conséquence d'une mutation du gène de l'hémojuvéline (*HJV*) responsable d'une protéine HJV non fonctionnelle, alors que le type 2B est lié à l'atteinte du gène de l'hepcidine (*HAMP*) à l'origine d'un défaut d'expression de l'hepcidine (50). La mortalité est élevée si le patient n'est pas soigné mais un traitement intense par phlébotomie et chélation améliore significativement le pronostic.

1.1.3. La maladie de la ferroportine

Cette pathologie aussi appelée hémochromatose de type 4A fait suite à des mutations du gène *SLC40A1* de la ferroportine, aboutissant à une perte de fonction de la protéine (50). Dans ce cas, le fer est retenu au niveau intracellulaire, particulièrement au niveau des macrophages, dont les cellules de Kupffer, ce qui conduit à une concentration en fer diminuée dans le sang et donc un faible coefficient de saturation de la transferrine. La tolérance aux phlébotomies est médiocre du fait de la difficulté à approvisionner la moelle osseuse en fer pour l'érythropoïèse car celui-ci est retenu dans les macrophages. Les patients présentent donc un risque important d'anémie. Cette anémie par carence en fer est responsable d'une diminution de l'hepcidine.

Le tableau ci-après résume les différents tableaux d'hémochromatoses héréditaires :

Tableau 1 : Comparaison des 6 modèles d'hémochromatoses héréditaires

Type d'hémochromatose	Gène muté	Hérédité	Concentration en hepcidine	Signes cliniques
Type 1 (forme de l'adulte)	HFE	Récessive	Bas	Arthropathie Cirrhose Cancer du foie
Type 2A (forme juvénile)	HJV	Récessive	Indétectable	Cœur* Cirrhose Diabète Hypogonadisme
Type 2B (forme juvénile)	HAMP (hepcidine)	Récessive	Indétectable	Cœur* Cirrhose Diabète Hypogonadisme
Type 3 (forme de l'adulte)	RTf2	Récessive	Bas	Cirrhose Cancer du foie
Type 4A Maladie de la ferroportine (perte de fonction)	SLC40A1 (ferroportine)	Dominante	Bas	Surcharge cellules de Kupffer (sans risque de cirrhose)
Type 4B (gain de fonction)	SLC40A1 (ferroportine)	Dominante	Elevé	Cirrhose

* : atteinte cardiaque de type trouble du rythme ou insuffisance cardiaque congestive

1.2. Anémie résistante au traitement par le fer oral (IRIDA : Iron Resistant Iron Deficiency Anemia)

Beaucoup plus rare, l'anémie de type IRIDA (pour Iron resistant iron deficiency anemia) est une anémie microcytaire hypochrome d'origine génétique, associée à une concentration anormalement élevée en hepcidine. Plusieurs mutations sont responsables de cette forme d'anémie et touchent le gène *TMPSSR6* qui code pour la matriptase-2, principalement exprimée

au niveau hépatique. Comme nous l'avons vu, cette sérine protéase de type 2 inhibe l'expression de l'hepcidine en clivant la protéine HJV membranaire, corécepteur de BMP6. L'HJV soluble ainsi formée entre en compétition avec l'HJV membranaire et bloque le signal d'activation de la voie BMP/HJV. En cas de mutation *TMPSSR6*, la répression de l'hepcidine est levée, son élévation entraîne donc un défaut important d'absorption intestinale et de mobilisation du fer. Ces patients sont donc anémiés en raison d'un fer sérique très bas, en général inférieur à 5 $\mu\text{mol/l}$ et non améliorés par la prise de fer oral. (51)

On parle donc d'anémie résistante au traitement par le fer oral, ou d'IRIDA. Le dosage sanguin ou urinaire de l'hepcidine montre dans ce contexte une augmentation très importante de l'hormone, malgré la présence de l'anémie.

Plusieurs études ont montré l'intérêt d'une administration à forte dose de fer intra-veineux pour corriger l'hyposidérémie et améliorer l'érythropoïèse à long terme. Celui-ci est capté par les macrophages puis lentement relargué dans le plasma permettant ainsi de corriger l'anémie. D'autres part, l'association à un traitement par EPO permettrait en même temps de remobiliser les réserves en fer au niveau du foie afin d'apporter la quantité de fer suffisante à la moelle osseuse pour l'érythropoïèse et de réprimer l'expression de l'hepcidine. (52)

Cette pathologie met en évidence le rôle central de l'hepcidine et l'intérêt primordial de son dosage pour la prise en charge thérapeutique de ces patients.

2. Anémie par carence en fer absolue

L'anémie la plus fréquente est de loin l'anémie ferriprive. Le déficit en fer dans l'organisme et l'érythropoïèse stimulée par l'anémie, entraînent une diminution de l'hepcidine pour maximiser l'absorption de l'oligoélément et son recyclage macrophagique. Le but étant d'assurer un apport suffisant de fer pour l'érythropoïèse.

Selon l'OMS, l'anémie affecte près de 25 % de la population mondiale dont la moitié des cas sont attribuables à une carence en fer. Les conséquences de cette anémie microcytaire sont entre autre, une augmentation du risque de mortalité infantile et maternelle, des troubles du développement psychomoteur, une réduction des performances physiques et un déclin cognitif chez le sujet âgé. Cette carence peut être causée par un apport alimentaire pauvre en fer ou bien une absorption intestinale insuffisante par rapport aux besoins de l'organisme : par exemple chez la femme enceinte, lors des menstruations ou d'une poussée de croissance rapide chez l'enfant. Il peut s'agir également d'une malabsorption (maladie cœliaque, résection intestinale...), de pertes sanguines digestives, ou bien une maladie chronique (insuffisance rénale chronique, cancer...)(4,53).

Les principaux paramètres du bilan martial sont très utiles au diagnostic d'anémie par carence en fer absolue. Chez ces patients, la diminution de la ferritine est le reflet d'un manque de stockage du fer. Cela est associé à un fer sérique et un coefficient de saturation de la transferrine diminués. A l'inverse, la transferrine est augmentée, ainsi que sa capacité de fixation afin de maximiser la distribution du fer dans l'organisme, en particulier au niveau de la moelle osseuse.

D'autres paramètres biologiques, comme le dosage de l'hepcidine, peuvent présenter leur intérêt en cas de difficulté diagnostique. La situation d'anémie par carence martiale absolue par exemple, doit se différencier de l'anémie par carence en fer fonctionnelle où les stocks ferriques

sont normaux, mais où la mobilisation du fer est diminuée en raison d'une augmentation de l'hépcidine. Ce sont donc deux situations de carences martiales différentes sur le plan physiopathologique où le dosage de l'hépcidine peut s'avérer utile pour les distinguer.

3. Anémie de l'inflammation et maladies infectieuses

La croissance et la pathogénicité de nombreux microorganismes requièrent la présence de fer. La diminution de la sidérémie est un mécanisme de défense qui a évolué au cours du temps afin de lutter contre les infections. Pour cela, l'augmentation de l'hépcidine est nécessaire. Elle permettra de diminuer la concentration du fer dans le sang en dégradant la ferroportine qui ne pourra plus exporter l'ion dans le milieu extracellulaire. Les patients se retrouvent en carence martiale fonctionnelle, la majorité du fer étant séquestré dans les macrophages.

Lors d'une pathologie inflammatoire, d'une infection mais aussi de cancers, la synthèse de l'hépcidine va être stimulée, comme nous l'avons vu plus haut, par la voie JAK2/STAT3. Cette voie est médiée par des cytokines pro-inflammatoires, principalement par IL-6. L'hyposidérémie engendrée et la séquestration du fer par des protéines telles que la ferritine, la transferrine ou encore la lactoferrine vont limiter la disponibilité du fer aux pathogènes ainsi que la multiplication de ces derniers.(1,54,55) La structure en épingle à cheveux de l'hépcidine, commune à la famille des défensines, accroît sa capacité à perforer la paroi des bactéries et renforce davantage l'effet antimicrobien de l'hormone.

Il est démontré dans la littérature scientifique que les pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, un myélome multiple ou encore une infection chronique sont associés à une élévation de l'hépcidine. L'obésité,

considérée comme un état inflammatoire chronique est également responsable d'une diminution du fer sanguin. (56) Ainsi, dans ce contexte inflammatoire, l'érythropoïèse est réprimée. Pas seulement par manque d'approvisionnement en fer mais également par apoptose des cellules souches de la moelle osseuse induite par les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant. Cette mort cellulaire intervient à des stades plus ou moins avancés dans la différenciation des progéniteurs médullaires. In fine, la production de globules rouges est donc diminuée, avec en parallèle une diminution de la synthèse d'EPO, qui est elle aussi inhibée au niveau rénal par des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-alpha, IL-1 et IL-6. (54)

Les anémies dites inflammatoires retrouvées chez les patients atteints de maladies chroniques, sont classées parmi les deuxièmes causes d'anémie dans le monde après la carence martiale. Le taux d'hémoglobine est rarement en deçà de 80 g/l et on retrouve classiquement une anémie normocytaire, normochrome et peu régénérative.

Le profil classique du bilan martial de ces patients associe un fer sérique bas avec une transferrine abaissée et un coefficient de saturation diminué. La ferritine est normale voire élevée et l'hepcidine est augmentée. Le fait que la ferritine soit élevée ne signe pas une augmentation des réserves tissulaire en fer mais la stimulation directe de la synthèse de ferritine par certaines cytokines comme TNF- α et IL-1 (1,57).

Dans certaines situations cliniques, comme chez le sujet âgé polypathologique, la carence martiale absolue est fréquemment associée à un syndrome inflammatoire, ce qui rend difficile l'interprétation des marqueurs de l'homéostasie du fer. Le dosage de l'hepcidine est ici pertinent pour mieux appréhender ces conditions complexes où co-existent anémie ferriprive et anémie de l'inflammation. Cette analyse a donc toute sa place dans la démarche diagnostique et thérapeutique.

4. Anémie de l'insuffisant rénal

L'anémie du sujet en insuffisance rénale est une anémie d'origine complexe et multifactorielle. Chez ces patients, on s'attend à ce que la concentration en hepcidine soit augmentée. En effet, nous pouvons envisager que la diminution de l'EPO lève l'inhibition des facteurs érythropoïétiques sur l'hepcidine. Cependant, des dosages d'érythropoïétine chez l'insuffisant rénal anémié ne montrent pas forcément de diminution d'EPO, mais cette concentration serait tout de même inappropriée par rapport à la sévérité de l'anémie (19). En outre, l'état inflammatoire chronique de ces patients et la diminution de la clairance de l'hepcidine sont également une cause d'augmentation de l'hormone dans la circulation sanguine. L'hepcidine exerce donc en excès son action hyposidérémiant en diminuant l'absorption du fer et en retenant le fer dans les cellules, notamment dans les macrophages. Cette diminution des flux de fer entraîne une carence en fer restrictive dite fonctionnelle, responsable de l'anémie.

Par ailleurs, dans l'article de Mercadel & al (58), il est rapporté que la concentration en hepcidine est effondrée chez les patients atteints de maladie rénale chronique avec carence en fer absolue, par rapport à ceux ayant un profil en fer normal. Le signal de la carence en fer est prédominant dans ce contexte, ce qui diminue la production en hepcidine. Ceci est un moyen de lutter contre l'anémie et assure un apport en fer minimum pour l'érythropoïèse. Notons que le traitement par EPO associé à la supplémentation en fer a considérablement amélioré l'anémie des patients insuffisants rénaux, permettant ainsi de maintenir dans des bornes acceptables leur taux d'hémoglobine.

5. Béta-thalassémie

L'hémoglobine est une protéine constituée de quatre sous-unités identiques deux à deux : 2 chaînes α et 2 chaînes β . Chez les patients β -thalassémiques, le défaut de production de chaînes β au niveau des précurseurs érythroblastiques entraîne un excès et une précipitation des chaînes α et in fine, une apoptose de ces précurseurs durant leur maturation dans la moelle osseuse. L'anémie qui s'en suit, entraîne une activation des médiateurs érythropoïétiques (EPO, ERFE) et donc une répression de l'hepcidine, qui conduira ainsi à une hyperabsorption et une surcharge tissulaire en fer importante (7,59).

Cette accumulation de fer toxique est responsable de la morbidité et mortalité de cette pathologie. L'hyperabsorption et les transfusions requises dans certains cas (β -thalassémie majeure) en sont les causes principales. Cependant, ces transfusions sont nécessaires pour restaurer un taux d'hémoglobine normal. Un traitement par chélation est souvent indispensable mais les effets indésirables sont nombreux.

La diminution de l'hepcidine observée chez les patients thalassémiques confirme bien la prédominance de l'effet du facteur érythroïde sur l'hepcidine par rapport à celui induit par la surcharge en fer et son dosage permettrait de détecter les patients les plus exposés à une surcharge en fer. Aussi, au vu des connaissances sur les effets de l'hepcidine, une éventuelle piste thérapeutique serait de donner directement cette hormone aux patients pour freiner l'absorption digestive et induire une redistribution du fer accumulé dans l'organisme. Des études sont nécessaires pour approfondir cette hypothèse. Notons toutefois l'augmentation transitoire de l'hepcidine qui ralentit momentanément l'érythropoïèse chez les patients en post-transfusion. (60)

6. Syndromes myélodysplasiques

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) regroupent plusieurs hémopathies liées à une atteinte clonale des cellules souches hématopoïétiques médullaires. Ces dernières ont acquis des mutations génétiques et des altérations cytogénétiques qui engendrent des anomalies cellulaires qualitatives et morphologiques, appelées dysmyélopoïèse. Ces cellules dysplasiques sont à l'origine d'une hématopoïèse inefficace avec apoptose excessive des cellules précurseurs de la moelle osseuse, et des cytopénies en périphérie. La plus fréquente des cytopénies concerne la lignée érythroïde et les signes révélateurs sont, dans la majorité des cas, ceux d'une anémie. L'évolution est assez lente, souvent indolente et consiste en une aggravation progressive des cytopénies. Elle sera dans 30% des cas plus agressive, avec un risque de transformation en leucémie aigüe myéloïde (état pré-leucémique).

Les syndromes myélodysplasiques sont des situations complexes où l'hepcidine est soumise à des facteurs d'activation et d'inhibition concomitants. En effet, les patients atteints de dysmyélopoïèse sont à risque de surcharge en fer par notamment destruction excessive des globules rouges (érythropoïèse inefficace) mais aussi par les transfusions itératives à visée thérapeutique. (61) En situation physiologique, cette augmentation de fer dans l'organisme active la production d'hepcidine afin de diminuer la surcharge toxique en fer.

Cependant dans ce contexte, cet effet entre en compétition avec le signal érythropoïétique envoyé par l'anémie chez ces patients. A ce stade, nous pouvons supposer que le signal de l'érythropoïèse prenne le dessus sur celui du fer, avec au final une concentration diminuée de l'hepcidine chez ces personnes. Cependant, les études sont nombreuses à se contredire sur les variations de concentration de l'hormone au cours d'un syndrome myélodysplasique et son rôle dans la surcharge en fer chez ces patients est encore actuellement étudié.

Les valeurs d'hepcidine les plus basses sont retrouvées dans les anémies réfractaires sidéroblastiques, tandis que les valeurs les plus hautes caractérisent les anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB) et les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC).

Récemment, l'hepcidine a été évaluée, parmi d'autres paramètres du bilan martial, comme nouveau biomarqueur capable de prédire la réponse au traitement par érythropoïétine, chez les patients atteints de syndromes myélodysplasiques à faible risque (62). L'étude démontre qu'un ratio hepcidine/ferritine bas (<9), c'est-à-dire chez les patients avec une surcharge en fer sévère, reflétée par l'augmentation importante de la ferritine, est prédictif d'une mauvaise réponse au traitement par EPO ou d'une durée de l'effet thérapeutique raccourcie.

Parmi les différents sous-types de SMD, un ratio hepcidine/ferritine bas est surtout retrouvé dans les anémies réfractaires sidéroblastiques, alors que chez les patients atteints de LMMC ou AREB, le ratio est élevé (de l'ordre de 35 et 17 respectivement). (61) L'anémie réfractaire sidéroblastique est une myélodysplasie caractérisée par l'accumulation de fer dans les mitochondries qui se visualise par la coloration de Perls. Cette coloration met en valeur le dépôt de fer périnucléaire dans les érythroblastes. L'anémie sidéroblastique est microcytaire, très peu régénérative et les patients nécessitent des transfusions sanguines fréquentes. Cette surcharge en fer avec hepcidine diminuée et ferritine augmentée, explique le fait que le ratio hepcidine/ferritine soit particulièrement bas dans ce syndrome myélodysplasique.

La corrélation entre signes cliniques et biomarqueurs du bilan martial étant établie, il est donc nécessaire de pouvoir correctement interpréter ces analyses pour une bonne prise en charge du patient. Ainsi, le dosage de l'hepcidine a toute sa place dans le cadre du suivi thérapeutique des SMD, notamment comme marqueur pronostic de réponse au traitement.

7. Anémie du cancer

De par son pouvoir pathogène ou par les traitements qu'il engendre (cytotoxicité des chimiothérapies, radiothérapies...), le cancer cause souvent une anémie chez le malade.

De principe, il convient de rechercher une anémie par carence martiale mais le cancer est une situation très complexe qui associe différents facteurs pouvant être à l'origine de l'anémie (saignements occultes, hémolyse, envahissement de la moelle osseuse, inflammation..).(12)

Chez ces patients, l'inflammation constante libère des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α qui agiront à plusieurs niveaux pour diminuer la sidérémie et l'érythropoïèse. La stimulation de l'hepcidine permettra d'inhiber la ferroportine, ce qui limitera l'absorption du fer mais aussi perturbera le flux de fer dans l'organisme en le séquestrant notamment au niveau macrophagique. En conséquence, l'augmentation du fer intra-cellulaire qui s'en suit stimulera la synthèse de la ferritine dont la concentration augmente en cas de syndrome inflammatoire.
(7)

Comme nous l'avons vu plus haut, l'anémie inflammatoire est une anémie microcytaire, associée à une diminution du fer sérique mais une ferritine normale voire augmentée. Elle s'oppose à l'anémie de la carence martiale qui a une ferritine diminuée. Dans le cas complexe de l'anémie du patient cancéreux, l'hepcidine serait donc un outil diagnostique approprié qui permettrait de distinguer plus facilement le type d'anémie et ainsi d'améliorer la prise en charge thérapeutique.

Tableau 2 : Résumé des variations d'hepcidine selon certaines pathologies

Maladies	Physiopathologie	Concentration en hepcidine
Hémochromatoses héréditaires	Déficit en hepcidine (cause génétique)	Basse voire indétectable selon le type d'HH.
Syndrome IRIDA	Surproduction génétique (cause génétique)	Elevée
Carence en fer absolue	Malnutrition, perte sanguine	Basse / indétectable
Pathologies inflammatoires et infectieuses, cancers	Inflammation	Elevée
Insuffisance rénale	Inflammation variable, diminution de la clairance de l'hepcidine variable	Elevée ou basse si carence en fer absolue associée
β-thalassémie (patients rarement transfusés)	Erythropoïèse inefficace et fortement active	Basse
β-thalassémie (patients fréquemment transfusés)	Erythropoïèse inefficace avec activité modérée, surcharge en fer secondaire	Basse ou moyennement basse selon transfusion
Syndromes myélodysplasiques	Dysérythropoïèse	Diminution variable selon le type de SMD et la fréquence transfusionnelle
Surcharge en fer secondaire	Transfusion, prise médicamenteuse de fer	Elevée

III. Partie analytique : dosage de l'hepcidine et mise en place de la méthode au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes

En France, le dosage de l'hepcidine est réalisé dans peu de laboratoires ; comme vu précédemment, les indications en pratique clinique sont principalement :

- pour le diagnostic des différents types d'anémie et orienter l'étude génétique si besoin
- la prise en charge de l'anémie (supplémentation martiale nécessaire ?) et le suivi thérapeutique (hémochromatose héréditaire, syndrome myélodysplasique, insuffisance rénale..)

1. Contexte

Depuis de nombreuses années, plusieurs groupes scientifiques ont essayé de mettre en place une méthode de quantification de l'hepcidine fiable et reproductible. Le dosage de la forme bioactive de l'hepcidine reste un véritable challenge. Sa petite taille, sa structure très repliée comprenant 4 ponts disulfures et l'existence de plusieurs isoformes rendent la mise en place du dosage difficile. Ses propriétés d'adhérence sur différentes surfaces nécessitent par exemple l'utilisation de tubes « low binding » afin de minimiser l'agrégation de la molécule sur les parois du tube.

Malgré tout, cette hormone est reconnue comme étant un marqueur prometteur fournissant de nombreux renseignements sur l'état de l'homéostasie du fer chez l'homme. Il serait donc

judicieux d'instaurer une méthode de dosage précise et standardisée dans le cadre du diagnostic, du pronostic et du suivi des maladies de surcharge ou de carence en fer.

Ainsi à ce jour, plusieurs techniques immunochimiques et de spectrométrie de masse ont été développées dans le but de quantifier l'hepcidine dans le plasma et les urines.

2. Techniques de dosage

2.1. Dosages immunologiques

Ils reposent sur l'aptitude d'anticorps spécifiques à reconnaître l'hepcidine. Afin d'éviter les réactions croisées, ces tests se doivent d'être le plus spécifique possible et doivent reconnaître exclusivement l'isoforme à 25 acides aminés de l'hepcidine (forme bioactive).

Les limites principales des méthodes immunologiques sont la difficulté de production des anticorps et les réactions croisées avec les différents isoformes de l'hepcidine (rencontrés dans certaines pathologies).

2.1.1. ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de mettre en évidence, grâce à une réaction colorée, un complexe formé d'un anticorps spécifique préalablement fixé à une enzyme, et d'un antigène ou d'une protéine présents dans un milieu biologique.

2.1.2. RIA

Concernant les dosages radio-immunologiques (RIA), ils utilisent les propriétés de liaison « anticorps-antigène » entre des molécules d'hepcidine radio-marquées et des anticorps anti-hepcidine. Cette interaction va aboutir à la mesure d'un signal radioactif. Lorsque l'on ajoute l'hepcidine non marquée du patient, celle-ci entre en compétition avec l'hepcidine marquée et entraîne son déplacement en dehors des sites de fixation de l'anticorps afin de lier les molécules d'hepcidine non marquées. La radioactivité de l'hepcidine marquée liée à l'anticorps diminue, permettant d'établir une quantification en fonction de la diminution du signal radioactif.

Les potentiels risques ionisants dû à l'utilisation de radio-éléments en font des techniques de dosage contraignantes, nécessitant une réglementation stricte et sont de ce fait, très peu utilisées.

2.1.3. Dosage par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse représente une alternative aux méthodes d'immunoanalyse classiques. C'est une technique analytique permettant de détecter et d'identifier un composé d'intérêt. Elle associe une méthode séparative physique de molécules par chromatographie en phase gazeuse ou liquide, et permet d'identifier et quantifier des molécules en fonction de leur rapport masse/charge. C'est une méthode de dosage très sensible et très spécifique, en constante amélioration.

Différents types de spectrométries ont été développés, comme le MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight mass spectrometry), le SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation) ou encore la chromatographie liquide couplée avec de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Concernant le dosage spécifique de l'hepcidine, sa principale limite est essentiellement due à l'absence de technique de référence ainsi que de matériel standard de référence. A ce jour, les techniques LC-MS/MS sont de loin les plus utilisées en raison de leur robustesse. Elles sont prometteuses dans le cadre d'une utilisation diagnostique de routine et utilisent comme standard interne de l'hepcidine isotopiquement marquée. Les méthodes d'extraction des composés analysables par cette technique sont diverses (précipitation par acide trifluoroacétique, microbilles magnétiques, ultrafiltration...) et nécessitent d'être harmonisées entre les différents laboratoires car elles peuvent être source de variabilité dans les rendus de résultats.

La plupart des études dans la littérature utilisent la technique LC-MS/MS pour le dosage de l'hepcidine, comme par exemple celle de Lefebvre & al (63) qui consiste à démontrer l'intérêt du dosage de la forme bioactive de l'hepcidine dans différentes situations physiopathologiques chez plus de 200 individus. Ils utilisent donc la méthode LC-MS/MS qui a pour avantage d'être robuste, hautement sélective et spécifique, grâce à la séparation au préalable de l'échantillon par une étape en chromatographie liquide et de la fragmentation des ions précurseurs en ions fils caractéristiques.

La corrélation des résultats entre la méthode LC-MS/MS réalisée par l'équipe de T.Lefebvre (63) et la technique ELISA réalisée par l'équipe de Ganz (64) est excellente bien que les valeurs de cette dernière soient 7 fois plus hautes que par spectrométrie de masse. Les hypothèses émises pour expliquer une telle différence suggèrent la possible détection croisée des isoformes hepcidine-20 et 22 par la méthode ELISA, les propriétés d'agrégation de l'hepcidine aux protéines plasmatiques, ou encore le type de standard interne et de calibrateur utilisé.

Nous voyons déjà à travers ces deux derniers articles, la difficulté de réaliser un dosage d'hepcidine qui soit robuste et reproductible. De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour assurer un résultat correct.

Un état des lieux a également été effectué dans l'étude internationale « Round Robin » de Kroot Joyce & al. (65) dans le but de confronter les résultats des différentes techniques disponibles et d'harmoniser les étapes de dosage de l'hepcidine chez l'homme.

Dans cette étude, le dosage a été effectué au niveau sérique et urinaire par différentes méthodes (ELISA, RIA, LC-MS/MS, MALDI-TOF MS, SELDI-TOF MS). Les résultats ont été comparés entre eux, montrant une grande variabilité de concentration pour un même échantillon entre les techniques immunologiques type ELISA et celles de spectrométrie de masse. Il existe également une différence des seuils de quantification et de détection. La variabilité analytique au sein d'une même technique quant à elle, est relativement faible avec un coefficient de variation inférieur à 5 %.

Ces discordances observées quant aux valeurs moyennes d'hepcidine mesurées par ces méthodes, sont attribuées selon l'article à divers facteurs comme les solutions de calibration qui sont différentes entre les techniques, le potentiel d'agrégation de l'hepcidine aux protéines plasmatiques ou encore l'impossibilité de différencier les 3 isoformes de l'hepcidine (20, 22 et 25 acides aminés).

Une autre étude datant de 2016 de Van der Vorm & al (66), a elle aussi évalué l'impact d'une harmonisation de l'étape analytique du dosage d'hepcidine sur les valeurs rendues par les principales techniques de référence, à savoir les méthodes de spectrométrie de masse et d'immunochimie.

L'article conclut que l'harmonisation des différentes méthodes de dosage ayant une bonne performance analytique en terme de reproductibilité, linéarité et corrélation est techniquement possible ; qu'un plasma lyophilisé avec ajout d'un cryolyoprotecteur peut être utilisé comme calibrant de référence car il présente une bonne stabilité dans le temps ; et que la calibration des

dosages avec ce calibrant standardisé peut conduire à une réduction du coefficient de variation (CV) entre les différentes techniques d'analyse de 28.6 % à 7.7 %.

Il ressort donc de ces analyses la nécessité d'harmoniser les étapes pré-analytiques et les solutions de calibration, mais aussi d'utiliser un même standard interne pour les techniques de spectrométrie de masse afin d'obtenir des résultats robustes et reproductibles d'une méthode à l'autre.

La majorité de ces techniques est actuellement réservée à des fins de recherche, mais les laboratoires hospitaliers sont de plus en plus nombreux à vouloir réaliser l'analyse dans le cadre d'examen de routine et c'est pour cela qu'une méthode analytique de dosage de l'hepcidine a été mise au point au sein du laboratoire du CHU de Grenoble par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

3. Spécificités pré-analytiques et variabilité individuelle

La maîtrise du pré-analytique (types de tube, conditions et heure de prélèvement...) et la connaissance d'un potentiel facteur de confusion intra ou inter-individuel (sexe, âge...) ayant un impact sur le dosage de l'hepcidine sont des étapes essentielles avant toute analyse. Ceci dans le but de limiter la variabilité des résultats du dosage et de pouvoir interpréter correctement les valeurs obtenues.

3.1. Rythme circadien

Tout d'abord, intéressons-nous à la variation intra-individuelle de la concentration d'hepcidine au sein d'une même journée. L'étude de Kroot & al (67) consistait à doser certains

marqueurs du fer (ferritine, transferrine, coefficient de saturation de la transferrine) ainsi que l'hepcidine dans le sérum et les urines à différents moments de la journée. La population étudiée était composée d'hommes et femmes adultes en bonne santé. Ils ont pu démontrer que l'hepcidine suit un rythme circadien avec une augmentation de l'hormone dans le sérum au cours de la journée. Les valeurs moyennes sont plus élevées en fin d'après-midi qu'en début de matinée. Les autres marqueurs dosés suivent la même variation de concentration, excepté pour le coefficient de saturation de la transferrine qui est plus bas en fin d'après-midi. Ils observent également une corrélation faible mais toutefois significative entre les concentrations d'hepcidine dans le sérum et dans les urines. Afin d'uniformiser les conditions de prélèvements, il convient donc de prélever les patients le matin pour s'affranchir de l'augmentation physiologique de l'hormone au cours de la journée.

3.2. Influence de l'alimentation

D'autres articles ont voulu savoir si la concentration sanguine en hepcidine est sous l'influence de la prise alimentaire et si cette augmentation peut être expliquée par la prise de fer via l'alimentation. Pour cela, une première étude (68) a mesuré le taux d'hepcidine chez des volontaires sains en début de matinée avant et après le repas, tandis qu'une seconde étude s'est concentrée sur l'effet d'une alimentation riche en fer par rapport à une alimentation pauvre en fer chez 32 volontaires. (69)

Toutes deux concluent à l'absence d'impact de l'alimentation sur les concentrations d'hepcidine de façon statistiquement significative. L'augmentation au cours de la journée est indépendante de la quantité de fer ingérée dans la nourriture.

Cette sécrétion d'hepcidine diurne obéit à un rythme circadien qui serait attribué à l'expression de deux facteurs de transcription régulateurs de l'expression de l'hormone : USF1 et USF2

(Upstream stimulatory factor 1 et 2). (70) Mais encore trop peu d'études sont disponibles pour expliquer avec précision l'origine des variations physiologiques de l'hepcidine.

3.3. Quel conditionnement et quelle matrice choisir ?

Concernant les conditions de prélèvement, l'équipe de Itkonen (68) démontre l'absence de différence statistiquement significative sur les concentrations d'hepcidine mesurées dans le sérum de 14 volontaires sains, prélevés sur tubes en verre, tubes en plastique avec activateur de coagulation, avec gel ou avec héparine de lithium. De même, il n'y a pas de différence de concentration dans le plasma ou le sérum. L'analyse de Laarakkers et son équipe, présente quant à elle, une légère augmentation des concentrations dans le plasma sur des tubes éthylène diamine tétra acétate (EDTA) par rapport au plasma avec héparine ou citrate (71). Plusieurs possibilités semblent donc convenir pour le choix du tube et il serait préférable de prélever les patients sur des tubes identiques entre les différents laboratoires afin d'harmoniser les conditions pré-analytiques et de rendre le dosage de l'hepcidine plus pertinent. Cependant, aucun consensus n'est établi sur le conditionnement à utiliser actuellement.

3.4. Température et durée de stockage

Pour analyser l'impact des températures de stockage, 12 échantillons fraîchement prélevés ont été stockés à température ambiante, +4°C, -20°C ou -80°C avec des durées de conservation allant de 10 jours maximum pour les sérums stockés à température ambiante et à +4°C, et jusqu'à plusieurs semaines voire plusieurs mois pour ceux conservés à -20°C ou -80°C. (68)

L'analyse des concentrations en hepcidine montre que les échantillons sont stables (avec une variation de moins de 15%) 1 jour à température ambiante, 6 jours à +4°C et au moins 42 jours à -20°C après 5 cycles de congélation-décongélation. Les échantillons peuvent également être stockés à -80°C pendant au moins 22 semaines.

Notons toutefois que les concentrations d'hepcidine dans l'urine sont plus sensibles aux multiples cycles de congélation/décongélation et aux conditions de stockage que les concentrations dans le sérum, mais moins influencées par le rythme circadien (72).

3.5. Valeurs de référence dans la littérature

Comme pour de nombreux paramètres biologiques, la littérature scientifique rapporte une variation significative de l'hepcidine en fonction de l'âge et du sexe de l'individu, mais les concentrations sont similaires au sein d'une population de même âge et même sexe. Ainsi, nous observons que l'hepcidine est plus basse chez les femmes que chez les hommes. En outre, l'hormone en question est plus basse chez les sujets jeunes et ce, de façon significative chez les hommes de moins de 30 ans et les femmes non ménopausées de moins de 50 ans, ce qui peut être mis en lien avec la perte de fer au cours des menstruations de la femme jeune (figure 8). (68)

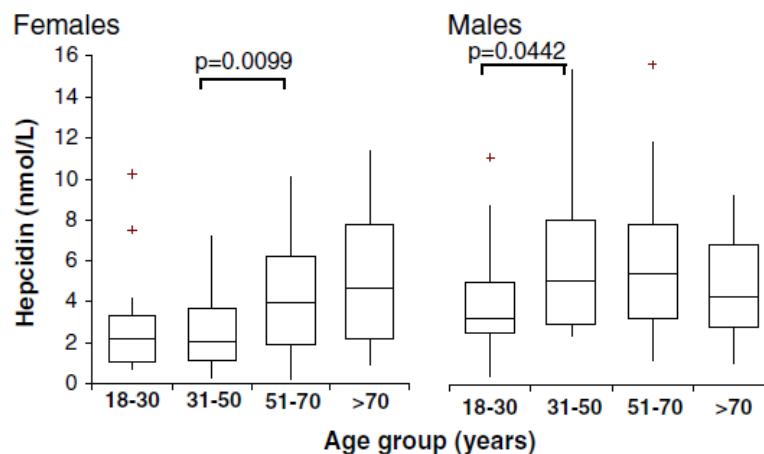


Figure 8 : Variation de l'hepcidine en fonction du sexe et de l'âge selon l'article de O.Itkonen & al « Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method », Clin Chim Acta. Avr 2012;413(7-8):696-701. (68)

Enfin, chez les femmes enceintes, les concentrations en hepcidine sont plus basses qu'en dehors d'un contexte de grossesse afin de subvenir à l'augmentation des besoins en fer. L'hormone diminue de façon progressive au cours des trimestres de grossesse, ce qui permet une augmentation de l'absorption intestinale du fer pour maintenir une érythropoïèse efficace (73).

Pour pallier à l'absence de valeurs de référence selon l'âge et le sexe, plusieurs articles (15,67,68) ont proposé leur propre intervalle de mesure de concentration en hepcidine (tableau 3) :

Tableau 3 : Valeurs de référence de l’hepcidine établies par technique LC-MS/MS retrouvées dans la littérature.

Littératures	Population	Intervalle de référence (en ng/ml)
Itkonen, 2012 (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, 2009 (LC-MS/MS)	Femmes	1,4 à 20,1
	Hommes	3,9 à 30,1
Wolff, 2013 (LC-MS/MS)	Femmes et Hommes	3,35 à 42,13

4. Dosage par LC-MS/MS au CHUGA

4.1. Description de la méthode

Le dosage de l’hepcidine par technique de spectrométrie de masse a été mis en place au CHU de Grenoble en 2019, sur un spectromètre type 5500 Q-Trap (Sciex), utilisant une source électrospray en mode positif et couplé à un système de chromatographie liquide de type HPLC (Neixera 20AD). L’extraction au préalable de nos échantillons s’effectue sur des cartouches d’extraction en phase solide (SPE).

Lors de l’étape d’élution, l’hepcidine est récupérée dans des microplaques 96 puits « low binding », toujours dans le but de conserver au maximum notre molécule qui a tendance à adhérer aux parois des tubes. En effet, la réalisation de tests de répétabilité et reproductibilité a

montré une plus grande variabilité de nos résultats aux faibles concentrations lorsqu'une plaque classique était utilisée.

Concernant notre séparation chromatographique, celle-ci s'effectue avec une colonne Poroshell 120 SB-C18 4.6*100 mm 2.7 µm en utilisant deux phases en gradient (100% H₂O + 0.1 % acide formique et 100 % acétonitrile + 0.1 % acide formique). La quantification de la molécule est réalisée par le mode MRM (multiple reaction monitoring) qui permet de sélectionner et de quantifier un ion précurseur donné ainsi que son/ses ions fils après fragmentation. Ceci augmente la spécificité de l'analyse de façon considérable et diminue le bruit de fond. Le couple m/z obtenu avec l'ion précurseur et l'ion fils se nomme une transition. Ici, nos transitions utilisées pour l'hepcidine et pour l'étalon interne marqué de l'hepcidine (¹³C et ¹⁵N) sont respectivement : 698,1 / 1040,0 et 703,3 / 1045,5.

4.2. Performances analytiques

Dans un souci d'accréditation de l'analyse selon la norme ISO 15189 à laquelle le laboratoire doit répondre (74), les performances analytiques du dosage de l'hepcidine ont été évaluées au sein du laboratoire.

Nous présentons ci-dessous quelques critères que nous avons évalués afin de prouver la fiabilité et la robustesse de nos résultats.

4.2.1. Domaine de mesure

La limite de quantification ou LOQ représente la plus petite concentration d'un composé, quantifiée par l'automate avec une précision de mesure suffisante pour rendre un résultat fiable.

Avec notre méthode, la LOQ correspond à notre premier point de gamme à 2 ng/ml car celui-ci permet de conserver un rapport signal/bruit >10, tout en correspondant à une concentration suffisamment basse en hepcidine. Elle correspond à notre point de gamme le plus bas. Toute mesure en deçà de ce point est rendue « inférieur à la LOQ » et la détermination de la limite de détection dans ce contexte ne nous a pas semblée pertinente. Quant à notre limite de quantification haute, celle-ci correspond à notre point de gamme le plus haut, soit 200 ng/ml.

4.2.2. Répétabilité

Tester la répétabilité d'une analyse consiste à effectuer plusieurs fois le dosage de l'analyte d'un même échantillon, dans des conditions similaires (opérateur, système de mesure, procédure...). Pour cela, 3 sérums de quantité connue en hepcidine ont été mesurés à plusieurs reprises. L'objectif étant d'obtenir des valeurs similaires entre elles pour garantir une fiabilité dans le rendu de nos résultats, ce qui permet également d'évaluer le bon fonctionnement de notre automate. Les concentrations analysées sont celles de nos contrôles internes de qualité (CIQ), à savoir 5, 60 et 150 ng/ml (tableau 4).

Les moyennes obtenues sont de 4,8 ng/ml, 51,2 ng/ml et 149,2 ng/ml respectivement, avec un coefficient de variation (CV) entre 6 et 8 %.

Tableau 4 : Résultats du test de la répétabilité pour le dosage de l'hepcidine

N= 6	CIQ 5 ng/ml	CIQ 60 ng/ml	CIQ 150 ng/ml
Moyenne	4,79	51,2	149,2
Ecart-type	0,39	3,54	10,5
Coefficient de variation	8,12	6,91	7,01

La répétabilité présente des CV inférieurs à 10% sur les trois niveaux de mesure : ces résultats sont conformes par rapport à nos attentes (CV<15% selon les recommandations de la Food and Drug Administration (FDA)) (75).

4.2.3. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (ou reproductibilité) s'évalue en mesurant plusieurs fois un même échantillon, en modifiant certains facteurs pouvant faire varier le résultat : le temps, l'opérateur, certains lots de réactifs...

Ce paramètre permet d'évaluer la variabilité analytique et se quantifie grâce à l'usage de contrôle interne de qualité.

Ainsi, nous avons également analysé trois niveaux de CIQ de concentration connue sur une période d'un an (tableau 5).

Tableau 5 : Résultats du test de la fidélité intermédiaire pour le dosage de l'hepcidine

N= 13	CIQ 5 ng/ml	CIQ 60 ng/ml	CIQ 150 ng/ml
Moyenne	6,4	64,4	163,4
Ecart-type	0,9	4,6	16,8
Coefficient de variation	13,7	7,2	10,3

Nos résultats de fidélité intermédiaire présentent des coefficients de variation inférieurs à 15%. Ainsi, nous démontrons que nos valeurs sont reproductibles dans le temps et conformes par rapport à nos attentes (CV<15% selon les recommandations de la Food and Drug Administration (FDA)) (75).

4.2.4. Comparaison de méthode

En l'absence de standardisation du dosage de l'hepcidine et de valeurs de référence, nous avons comparé les valeurs de plusieurs échantillons avec l'équipe de T.Lefebvre, du laboratoire de biochimie de l'hôpital Louis Mourier à Paris (figure 9).

Nos concentrations en hepcidine, comparées à celles de l'hôpital Louis Mourier qui utilise la même technique analytique (LC-MS/MS), montrent une excellente corrélation ($r^2 = 0,98$), que ce soit pour les valeurs faibles mais également pour celles plus élevées. Une seule valeur a montré une différence de concentration plus significative (Grenoble : 93,1 ng/ml ; Paris : 58,9 ng/ml)

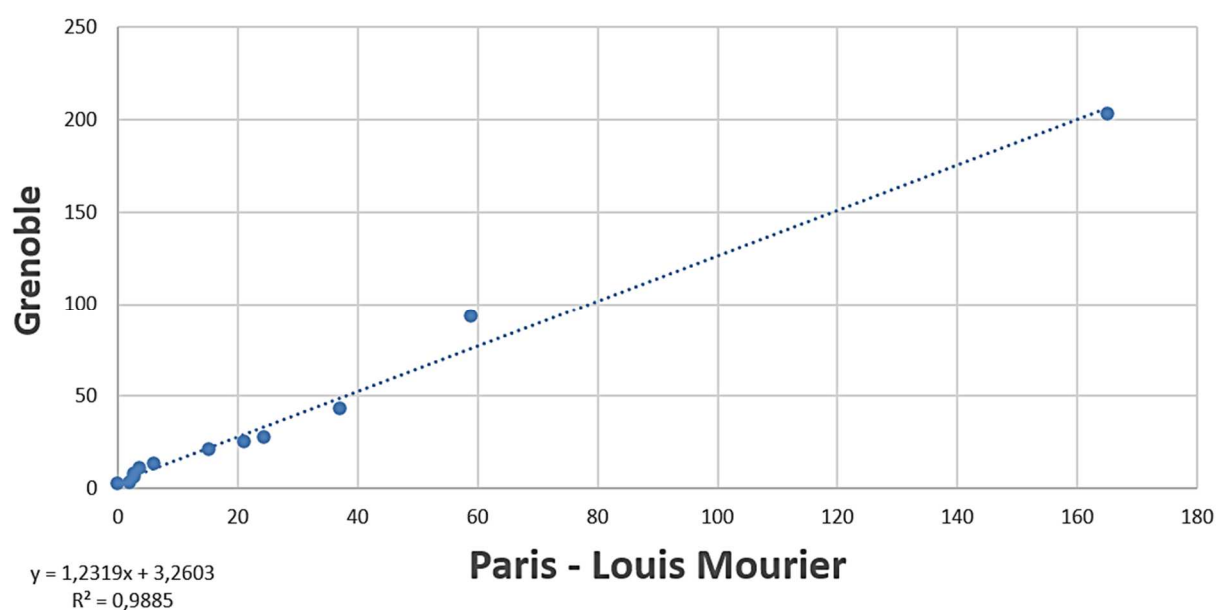


Figure 9 : Droite de corrélation des dosages d'hepcidine entre le laboratoire du CHU de Grenoble et celui de Louis Mourier

Les résultats de la comparaison de méthode ont été rapportés sur le diagramme des différences (figure 10), en considérant que la fidélité intermédiaire (FI) de Paris est similaire à la FI de Grenoble.

4.2.5. Valeurs de référence

Pour établir nos propres valeurs de référence, nous avons effectué le dosage d'hepcidine sur des échantillons biologiques issus du soin de 21 femmes et 14 hommes sains. (tableau 6).

Les valeurs de référence ont été obtenues après :

- a) avoir retiré les résultats d'hepcidine associés à un bilan martial ou inflammatoire perturbé (pour s'affranchir des facteurs influençant les variations de l'hormone)
- b) avoir écarté les valeurs supérieures à « moyenne + 2 fois l'écart-type » et inférieures à « moyenne – 2 fois l'écart-type » (recommandations COFRAC, SH GTA 014). (74)

Tableau 6 : Valeurs de référence du dosage de l'hepcidine sérique réalisées sur 35 échantillons (21 femmes et 14 hommes)

	Moyenne (ng/ml)	Ecart-type	Valeurs de référence (ng/ml)
HOMMES	14,63	7,83	< 30,3
FEMMES	9,83	6,31	< 22,5

Bien entendu, nos dosages méritent d'être effectués sur plus d'échantillons afin d'élargir notre population et d'affiner nos valeurs. Cependant, celles-ci sont concordantes avec celles effectuées par d'autres équipes scientifiques (tableau 3). Nous retrouvons bien une concentration plus élevée chez les hommes que chez les femmes, bien qu'aucun test statistique n'ait été réalisé pour démontrer une différence statistiquement significative de nos moyennes chez les deux sexes.

Au final, l'évaluation des performances analytiques de notre méthode a été satisfaisante en termes de robustesse et de fiabilité des résultats obtenus, ce qui nous permet aujourd'hui de proposer ce dosage en routine hospitalière.

IV. Conclusion

Nous avons exposé dans cette revue systématique de la littérature les connaissances et nouveautés concernant l'hepcidine, afin de démontrer son rôle et l'intérêt de son dosage dans l'homéostasie du fer. Cette protéine, constituée de 25 acides aminés, entraîne l'internalisation et la dégradation de la ferroportine, seule protéine membranaire connue à ce jour pour exporter le fer de la cellule vers le milieu extracellulaire. L'hepcidine est ainsi l'hormone principale de régulation du fer et permet de diminuer la sidérémie. Elle est principalement augmentée par l'élévation du fer et l'inflammation tandis que l'activation de l'érythropoïèse l'inhibe. La compréhension de son rôle et de sa régulation nous permet de mieux appréhender certaines pathologies liées au fer. Aussi, l'intérêt clinique du dosage de l'hepcidine est clairement établi. En association à d'autres marqueurs du bilan martial, il permet d'évaluer la sévérité de l'atteinte de certaines pathologies telles que les hémochromatoses héréditaires, les anémies ou bien les syndromes myélodysplasiques, sur l'homéostasie du fer et leurs conséquences au niveau biologique et clinique. Le dosage de l'hepcidine par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem est aujourd'hui considéré comme la méthode de référence. En effet, les techniques LC-MS/MS sont de loin les plus utilisées à ce jour en raison de leur fiabilité et robustesse. De plus, le respect des conditions préanalytiques et analytiques du dosage permet de limiter la variabilité des résultats, d'interpréter correctement les valeurs obtenues et contribue à l'harmonisation du dosage entre les laboratoires. Cette méthode a donc été mise en

place au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes et possède des performances analytiques qui répondent aux exigences fixées par le laboratoire.

Enfin, au vu des connaissances présentées dans cette thèse, l'axe hepcidine-ferroportine pourrait être à l'avenir une cible thérapeutique spécifique dans le traitement de diverses pathologies touchant l'homéostasie du fer. Ainsi, l'administration d'agonistes pourrait par exemple être effectuée en cas de surcharge en fer, comme dans l'hémochromatose héréditaire, ou à l'inverse, celle d'antagonistes pourrait être envisagée dans le traitement de l'anémie chronique inflammatoire. Ces hypothèses nécessitent cependant d'être explorées pour évaluer l'impact d'une telle modulation sur l'homéostasie du fer, et il est certain que le dosage de l'hepcidine aura toute sa place dans l'exploration de ces pistes thérapeutiques.

Références bibliographiques

1. Grandchamp Desraux B. Métabolisme du fer: physiologie et pathologie. Paris: Bioforma; 2011.
2. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* déc 1995;82-83:969-74.
3. Rucheton B. 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. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, Sept 2015; :203.
4. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease: Iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int.* avr 2017;21:S6-20.
5. Andrews NC. Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med.* 1999;10.
6. Louiset E. L'hepcidine, l'hormone du fer – Heparin, the iron hormone. *La lettre de l'hépatogastroentérologue.* 2010. Vol XIII, n°2 :6.
7. Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* sept 2012;1823(9):1434-43.
8. Viatte L. Mode d'action de l'hepcidine, nouvelle hormone du métabolisme du fer, et son implication dans l'hémochromatose. Thèse de doctorat, Université Paris 7, Fev 2006; :190.
9. Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP, Eisenstein RS. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *RNA.* 1 janv 2010;16(1):154-69.
10. 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 Heparin, Is Overexpressed during Iron Overload. *J Biol Chem.* mars 2001;276(11):7811-9.
11. 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.* 17 juill 2001;98(15):8780-5.
12. Lefebvre T, Lasocki S, Fénéant-Thibault M, Lamy P-J, Cunat S, Ropert-Bouchet M, et al. Added value of hepcidin quantification for the diagnosis and follow-up of anemia-related diseases. *Ann Biol Clin (Paris).* janv 2017;75(1):9-18.
13. Wolff F, de Verneuil H, Rucheton B, Lefebvre T, Vialaret J, Ropert-Bouchet M, et al. Heparin: immunoanalytic characteristics. *Ann Biol Clin (Paris).* nov 2018;76(6):705-15.
14. Nemeth E, Ganz T. Regulation of Iron Metabolism by Heparin. *Annu Rev Nutr.* août 2006;26(1):323-42.

15. Wolff F, Deleers M, Melot C, Gulbis B, Cotton F. Heparin-25: Measurement by LC–MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Clin Chim Acta*. août 2013;423:99-104.
16. Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C. Intestinal DMT1 Cotransporter Is Down-regulated by Heparin via Proteasome Internalization and Degradation. *Gastroenterology*. avr 2011;140(4):1261-1271.e1.
17. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The Transferrin Receptor Modulates Hfe-Dependent Regulation of Heparin Expression. *Cell Metab*. mars 2008;7(3):205-14.
18. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*. août 2010;139(2):393-408.e2.
19. Ganz T, Nemeth E. Heparin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu Rev Med*. 18 févr 2011;62(1):347-60.
20. Core AB, Canali S, Babitt JL. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol*. 13 Mai 2014. Vol 5.
21. Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang R-H, et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*. 15 août 2008;112(4):1503-9.
22. Ramey G, Deschemin J-C, Vaulont S. Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of heparin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica*. 1 juin 2009;94(6):765-72.
23. Poli M, Lusciati S, Gandini V, Maccarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, et al. Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent heparin regulation. *Haematologica*. 1 nov 2010;95(11):1832-40.
24. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone heparin. *J Clin Invest*. 1 mai 2004;113(9):1271-6.
25. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of heparin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*. 1 sept 2005;106(5):1864-6.
26. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 1 avr 2003;101(7):2461-3.
27. De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, et al. Heparin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest*. 1 juill 2010;120(7):2395-405.

28. Kanamori Y. Regulation of hepcidin expression by inflammation-induced activin B. *Sci Rep*. Dec 2016. Vol 6. :12.
29. 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*. 12 juill 2012;120(2):431-9.
30. Pantopoulos K. Inherited Disorders of Iron Overload. *Front Nutr*. 29 oct 2018;5:103.
31. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. 1 mars 2010;95(3):505-8.
32. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. IDENTIFICATION OF ERYTHROFERRONE AS AN ERYTHROID REGULATOR OF IRON METABOLISM. *Nature genetics*. 2015. ;28.
33. 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*. 2 juill 2007;117(7):1926-32.
34. Pasricha S-R, McHugh K, Drakesmith H. Regulation of Hepcidin by Erythropoiesis: The Story So Far. *Annu Rev Nutr*. 17 juill 2016;36(1):417-34.
35. Anderson ER, Taylor M, Xue X, Ramakrishnan SK, Martin A, Xie L, et al. Intestinal HIF2 promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia. *Proc Natl Acad Sci*. 10 déc 2013;110(50):E4922-30.
36. Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, Gonzalez FJ, et al. Hypoxia-Inducible Factor-2 α Mediates the Adaptive Increase of Intestinal Ferroportin During Iron Deficiency in Mice. *Gastroenterology*. juin 2011;140(7):2044-55.
37. Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C. HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest*. 1 mai 2009;119(5):1159-66.
38. Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest*. 3 déc 2012;122(12):4635-44.
39. Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JRR, Delga S, Mayeux P, Vaulont S, et al. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica*. 1 juin 2012;97(6):827-34.
40. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh S-H, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. sept 2007;13(9):1096-101.
41. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S-J, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*. Juillet 2009; vol114(1) :6.

42. Leon Kautz, Grace Jung, Xin Du, Victoria Gabayan, Justin Chapman, Marc Nasoff, Elizabeta Nemeth, and Tomas Ganz. Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood*. Oct 2015; vol126(17):2031-37
43. Casanovas G, Spasic MV, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, et al. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. 1 mars 2013;98(3):444-7.
44. Adamsky K, Weizer O, Amariglio N, Breda L, Harmelin A, Rivella S, et al. Decreased hepcidin mRNA expression in thalassemic mice: Correspondence. *Br J Haematol*. janv 2004;124(1):123-4.
45. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 15 mai 2005;105(10):4103-5.
46. Porpiglia E, Hidalgo D, Koulunis M, Tzafiriri AR, Socolovsky M. Stat5 Signaling Specifies Basal versus Stress Erythropoietic Responses through Distinct Binary and Graded Dynamic Modalities. *PLOS Biol*. 2012;10(8):19.
47. Arezes J, Foy N, McHugh K, Sawant A, Quinkert D, Terraube V, et al. Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood* Août 2018; vol132(14) :5.
48. Wang C-Y, Core AB, Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Ozer S, Umans L, et al. Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood* 2017;130(1):11.
49. Brissot P, Troadec M-B, Bardou-Jacquet E, Lan CL, Jouanolle A-M, Deugnier Y, et al. Current approach to hemochromatosis. *Blood Rev*. juill 2008;22(4):195-210.
50. Santos PCJ de L, Dinardo CL, Caçado RD, Schettert IT, Krieger JE, Pereira AC. Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2012;34(4):311-6.
51. Guillem F, Grandchamp B. TMPRSS6 mutations in IRIDA, and association of frequent variants with hematological parameters. *Hématologie*. sept 2011;17(5):357-64.
52. Ramsay AJ, Quesada V, Sanchez M, Garabaya C, Sardà MP, Baiget M, et al. Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms. *Hum Mol Genet*. 1 oct 2009;18(19):3673-83.
53. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *The Lancet*. févr 2016;387(10021):907-16.
54. Jurado RL. Iron, Infections, and Anemia of Inflammation. *Clin Infect Dis* 1997 Oct;25(4):888-95 :8.
55. Agarwal AK, Yee J. Hepcidin. *Adv Chronic Kidney Dis*. juill 2019;26(4):298-305.
56. Tussing-Humphreys LM, Liang H, Nemeth E, Freels S, Braunschweig CA. Excess Adiposity, Inflammation, and Iron-Deficiency in Female Adolescents. *J Am Diet Asso*. 2009 Feb;109(2):297-302 :6.

57. Kernan KF, Carcillo JA. Hyperferritinemia and inflammation. *International Immunology*, Volume 29, Issue 9, September 2017, Pages 401–409 :9.
58. Mercadel L, Metzger M, Haymann JP, Thervet E, Boffa J-J, Flamant M, et al. The Relation of Heparin to Iron Disorders, Inflammation and Hemoglobin in Chronic Kidney Disease. *Jones JA, éditeur. PLoS ONE*. 30 juin 2014;9(6):e99781.
59. Sangkhav V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Heparin. *Adv Nutr Int Rev J*. janv 2017;8(1):126-36.
60. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the heparin era. *Haematologica*. févr 2020;105(2):260-72.
61. Santini V, Girelli D, Sanna A, Martinelli N, Duca L, Campostrini N, et al. Heparin Levels and Their Determinants in Different Types of Myelodysplastic Syndromes. *Kaufman D, éditeur. PLoS ONE*. 19 août 2011;6(8):e23109.
62. Park S, Kosmider O, Maloisel F, Drenou B, Chapuis N, Lefebvre T, et al. Dyserythropoiesis evaluated by the RED score and heparin:ferritin ratio predicts response to erythropoietin in lower-risk myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. mars 2019;104(3):497-504.
63. Lefebvre T, Dessendier N, Houamel D, Ialy-Radio N, Kannengiesser C, Manceau H, et al. LC-MS/MS method for heparin-25 measurement in human and mouse serum: clinical and research implications in iron disorders. *Clin Chem Lab Med* 2015 Sep 1;53(10):1557-67.
64. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum heparin. *Blood*. 15 nov 2008;112(10):4292-7.
65. 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 heparin assays: need for standardization. *Haematologica*. 1 déc 2009;94(12):1748-52.
66. Van der Vorm LN, Hendriks JCM, Laarakkers CM, Klaver S, Armitage AE, Bamberg A, et al. Toward Worldwide Heparin Assay Harmonization: Identification of a Commutable Secondary Reference Material. *Clin Chem*. 1 juill 2016;62(7):993-1001.
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 heparin: Implications for clinical studies. *Anal Biochem*. juin 2009;389(2):124-9.
68. Itkonen O, Parkkinen J, Stenman U-H, Hämäläinen E. Preanalytical factors and reference intervals for serum heparin LC–MS/MS method. *Clin Chim Acta*. avr 2012;413(7-8):696-701.
69. Schaap CC, Hendriks JC, Kortman GA, Klaver SM, Kroot JJ, Laarakkers CM, et al. Diurnal Rhythm rather than Dietary Iron Mediates Daily Heparin Variations. *Clin Chem*. 1 mars 2013;59(3):527-35.

70. Bayele HK, McArdle H, Srai SKS. Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor. *Blood* 2006;108(13):9.
71. 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. *Randeva HS, éditeur. PLoS ONE*. 4 oct 2013;8(10):e75518.
72. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass Spectrometry–Based Hepcidin Measurements in Serum and Urine: Analytical Aspects and Clinical Implications. *Clin Chem*. 1 avr 2007;53(4):620-8.
73. 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.
74. SH GTA 04 rev 01. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, 1-191.
75. FDA. Guidance for industry, bioanalytical method validation, US. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Biopharmaceutics. FDA, May 2018

ARTICLE :

Rôle et intérêt du dosage de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer

Role and interest of hepcidin assay in iron homeostasis

Julien Miozzo, Laetitia Van Noolen

Unité de Biochimie Hormonale, Métabolique et Nutritionnelle, Service de Biochimie, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble, France

Résumé

Le fer est un élément essentiel au bon fonctionnement du corps humain et nécessite un maintien minutieux de son homéostasie. Ce maintien s'effectue principalement grâce à l'hepcidine, une hormone sécrétée par le foie qui contrôle les flux de fer au sein de l'organisme. Celle-ci possède une action hyposidéremiante en diminuant l'expression de la ferroportine, seule protéine transmembranaire connue à ce jour pour exporter le fer dans le milieu extracellulaire. Ceci a pour effet de diminuer l'absorption intestinale et d'augmenter la rétention intracellulaire, notamment dans les macrophages. L'hepcidine est principalement stimulée par l'élévation du fer et l'inflammation tandis que l'activation de l'érythropoïèse l'inhibe. Comprendre sa régulation permet ainsi de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques des maladies de surcharge et de carence en fer. Le dosage de l'hepcidine, devient donc intéressant dans l'exploration de l'homéostasie du fer. En association avec les autres paramètres du bilan martial, il permet d'adopter une meilleure prise en charge thérapeutique des pathologies du métabolisme du fer. Aussi, une technique de dosage par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem a été mise en place au CHU de Grenoble-Alpes et les performances analytiques de cette méthode répondent aux exigences du laboratoire en termes de fiabilité et de robustesse de l'analyse.

Mots clés : Fer, homéostasie, hepcidine, dosage, spectrométrie de masse

Abstract

Iron is an essential element to the well functioning of the organism and requires careful maintenance of its homeostasis. This is mainly due to hepcidin, a hormone secreted by the liver that controls the flow of iron within the body. It has a hyposideremic action by reducing the expression of ferroportin, the only protein known to this day, which can export iron into the extracellular environment. This has the effect of decreasing intestinal absorption and increasing intracellular retention, especially in macrophages. Hepcidin is stimulated by elevation of iron and inflammation while activation of erythropoiesis inhibits it. Understanding its regulation allows a better understanding of the pathophysiological mechanisms of overload diseases and iron deficiency. Therefore, the hepcidin analysis is interesting for the exploration of iron homeostasis. In combination with other biological parameters of iron status, it is possible to find better instructions for therapeutic managements of iron metabolism diseases. Thus, an assaying method by coupling liquid chromatography and tandem mass spectrometry has been implemented at Grenoble University Hospital and the analytical performances of this assay met the laboratory requirements in terms of reliability of the analysis.

Key words: iron, homeostasis, hepcidin, assay, mass spectrometry

Généralités

Le fer est un oligo-élément faisant parti des sels minéraux, essentiel à l'organisme. Ses propriétés d'oxydo-réduction le rendent indispensable au bon fonctionnement enzymatique du corps humain, au transfert d'électrons mais aussi à la synthèse d'ADN et au transport de l'oxygène en le fixant sur l'hémoglobine. Le fer est présent dans l'organisme sous deux formes : le fer ferrique (Fe^{3+}), forme insoluble, et le fer ferreux (Fe^{2+}), quant à lui soluble. Cette dernière forme peut réagir avec l'oxygène et est donc très réactive. (1) Elle entraîne la production de radicaux libres par la réaction de Fenton et peut être très toxique au niveau cellulaire. C'est pour cette raison que le fer ferreux est très peu retrouvé dans la circulation sanguine. Sa forme oxydée ou liée aux protéines est la plus fréquente.

La quantité de fer dans l'organisme est d'environ 4 grammes chez un adulte. La grande majorité du fer n'est pas fournie par l'alimentation mais par les macrophages qui recyclent le fer présent dans les hématies sénescents. En l'absence de véritable voie d'élimination (seul 1 mg de fer est excrété en 24 heures, principalement par la sueur, les ménorragies, et la desquamation intestinale et de la peau), la régulation du fer se porte donc essentiellement sur son entrée dans l'organisme au niveau des entérocytes situés dans l'intestin, et sur son relargage ou sa rétention par les macrophages et les hépatocytes. L'hepcidine est une protéine d'une vingtaine d'acides aminés pour laquelle son implication dans l'homéostasie du fer a été mise en évidence en 2001 (2). Actuellement, elle est considérée comme l'hormone principale de régulation du fer en contrôlant son absorption et sa libération dans l'organisme. L'hepcidine régule ainsi les flux de fer à travers des mécanismes d'action sur les cellules, notamment au niveau des entérocytes, macrophage et hépatocytes.

Métabolisme du fer

Absorption

Une alimentation équilibrée amène entre 10 et 20 mg de fer par jour mais seulement 1 à 2 mg seront absorbés, en raison de sa faible biodisponibilité. L'absorption digestive du fer est un mécanisme actif qui a lieu principalement dans le duodénum au niveau des entérocytes présents au sommet des villosités intestinales. (3)

L'absorption du fer commence au pôle apical de l'entérocyte (figure 1). Le fer héminique ou organique est d'origine animale, il correspond au fer fixé à l'hémoglobine. Il sera absorbé grâce à la protéine Haem carrier protein 1 (HCP1) puis libéré dans le cytosol sous forme ferreux (Fe^{2+}). 20% du fer héminique présent dans la lumière intestinale sera absorbé. Le fer non héminique quant à lui, est le fer inorganique d'origine végétale et se trouve sous forme ferrique (Fe^{3+}). 5% seulement de ce fer non héminique est absorbé dans l'organisme. Cela s'effectue après réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} via le cytochrome B réductase duodéal (DcytB), puis il y a absorption de Fe^{2+} à travers la membrane apicale de l'entérocyte via le transporteur Divalent Metal Transporter 1 (DMT1).

Dans l'entérocyte, le fer peut être soit utilisé comme co-facteur, soit stocké par la ferritine, ou bien exporté dans la circulation sanguine par l'intermédiaire de la ferroportine, une protéine transmembranaire codée par le gène *SCL40A1* et exprimée au pôle basal de l'entérocyte. Ce fer subira ensuite une oxydation par la ferroxidase héphaestine, l'enzyme ancrée sur la membrane basale de l'entérocyte, ou par une céruloplasmine soluble, avant de se fixer à la transferrine qui distribuera le fer dans l'organisme.

La diminution de l'absorption du fer est une première étape de régulation pour éviter les surcharges en fer, car aucun moyen efficace ne permet d'éliminer l'excès de fer dans l'organisme.

Distribution

Le fer présent dans la circulation sanguine correspond au compartiment de transport et ne représente que 0,1% du fer total, soit 4 mg. Celui-ci est principalement lié à la transferrine qui a la capacité de fixer deux atomes de fer sous forme ferrique (Fe^{3+}). Son rôle est primordial car elle permet d'acheminer le fer jusqu'à la moelle osseuse, étape nécessaire pour l'érythropoïèse, en prenant en charge l'excrétion du fer intracellulaire dans le plasma (fixation du fer à la sortie des macrophages, des entérocytes et des cellules de Kupffer ou encore après la destruction des globules rouges par hémolyse). Son pourcentage de saturation est compris entre 25 et 35%. Cette transferrine dite di-ferrique, va ensuite se lier à son récepteur de type 1 (RTf1) de haute affinité, exprimé à la surface de la plupart des cellules consommatrices de fer, comme par exemple les érythroblastes.

Ce récepteur va lui-même interagir avec d'autres protéines de surface comme le complexe HFE - β 2-microglobuline qui favorise la captation du fer dans la cellule en internalisant RTf1 lié à la transferrine. (4) Le fer est ensuite disponible pour être incorporé aux protéines ou stocké majoritairement dans les hépatocytes grâce à la ferritine.

Quand le taux de saturation de la transferrine augmente, cette dernière va également se fixer sur son récepteur de type 2, exprimé quant à lui principalement au niveau des hépatocytes. Le fer s'accumule ainsi dans le foie en se liant à la ferritine, ce qui empêche la circulation d'une trop grande quantité de fer libre. RTf2 ne joue pas de rôle direct dans la captation du fer mais plutôt dans la signalisation cellulaire. Sa liaison à la transferrine est en effet à la base d'un signal activateur de production de l'hepcidine.

Stockage

Le fer est majoritairement stocké en se liant à la ferritine, protéine ubiquitaire mais essentiellement localisée au niveau des macrophages de la moelle osseuse et de la rate, ainsi que dans le foie au niveau des hépatocytes et des cellules de Kupffer. C'est une forme de stockage rapidement mobilisable en cas de besoin en fer. La ferritine se retrouve dans la circulation sanguine à des concentrations comprises entre 20-200 µg/l. Des valeurs inférieures à 20 µg/l sont le signe d'une carence en fer, alors qu'une augmentation des concentrations peut survenir dans des pathologies de surcharge en fer, mais aussi dans un syndrome inflammatoire, une cytolysé hépatique ou encore dans l'alcoolisme chronique. (1) Le fer est également stocké de façon minoritaire en se liant à l'hémosidérine, forme dégradée de la ferritine, constituant une forme de stockage insoluble, de mobilisation plus lente.

Utilisation du fer dans l'érythropoïèse

Les hématies ont une durée de vie d'environ 120 jours. Les macrophages ont pour rôle de phagocyter les globules rouges sénescents afin de permettre un renouvellement érythropoïétique. Ce renouvellement s'appelle l'érythropoïèse et a lieu au sein de la moelle osseuse. Cette dernière produit environ 200 milliards de globules rouges par jour pour compenser la destruction des vieilles hématies, ce qui en fait l'organe le plus consommateur de fer avec un besoin journalier d'environ 20 mg. La captation du fer par les précurseurs érythroïdes s'effectue grâce à la liaison du complexe fer-transferrine aux récepteurs de surface de la transferrine. C'est RTf1, situé à la surface de la plupart des cellules, qui sert à l'acquisition du fer. La liaison de la transferrine à son récepteur entraîne une endocytose du complexe formé « transferrine-fer-récepteur », puis la libération du fer dans le cytosol de la cellule grâce à l'acidification progressive de l'endosome néoformé.

Le fer, sous forme ferrique, est ensuite réduit par une ferriréductase (Steap3) puis sera utilisé pour la formation de l'hème. Cette étape a lieu dans la mitochondrie lors de la maturation de la cellule érythroblastique en globule rouge. (3,4)

L'érythrophagocytose : recyclage du fer par les macrophages

Pour que l'organisme réutilise le fer contenu dans les hématies, les macrophages phagocytent les hématies sénescents et libèrent ensuite le fer dans le sang (figure 2). Ce mécanisme, appelé érythrophagocytose, fonctionne en circuit fermé. (1) Il a lieu dans la rate et permet le recyclage d'environ 25 à 30 mg de fer par jour, avec un renouvellement du fer toutes les deux heures environ. (5) Ceci garantit ainsi les besoins journaliers de l'érythropoïèse. Après reconnaissance de l'hématie âgée par le macrophage, il y a endocytose de l'hématie et dégradation de l'hème par les enzymes contenues dans le lysosome néoformé. Cette dégradation permet de libérer le fer présent dans l'hémoglobine. Celui-ci est ensuite stocké dans la ferritine et/ou exporté dans la circulation par la ferroportine où il peut de nouveau se fixer à la transferrine après oxydation par la céruléoplasmine, une ferroxidase plasmatique synthétisée dans le foie.

L'homéostasie du fer

Régulation intracellulaire

Le fer intracellulaire est régulé grâce à la modulation de l'expression génique de nombreuses protéines impliquées dans l'homéostasie du fer. Cette régulation, essentiellement post-transcriptionnelle, s'effectue en fonction des concentrations de fer dans la cellule et repose sur l'interaction entre une protéine IRP 1 ou 2 (Iron Regulatory Protein) et un motif IRE (Iron Responsive Element). (6) Les IRP sont des protéines cytoplasmiques ayant la capacité de se fixer sur les IRE en absence de fer et jouent un rôle de senseur du fer. Les IRE sont des segments d'ARN constitués d'une dizaine de nucléotides. Très conservés entre les espèces, ces motifs possèdent une structure en tige-boucle spécifique et sont situés dans les régions 5' ou 3' non traduites (5' ou 3'-UTR) des ARNm codant pour les protéines du métabolisme du fer. L'interaction entre une IRP et un IRE a donc lieu lorsque la concentration de fer intracellulaire diminue. Pour la ferritine et la ferroportine, l'interaction des IRP avec un IRE se situe en 5' UTR, ce qui bloque la traduction de l'ARNm. A l'inverse, concernant la transferrine et la DMT1, l'interaction se situe en 3' UTR, ce qui stabilise l'ARNm. En d'autres termes, lorsque le fer intracellulaire diminue, l'expression de la ferroportine et de la ferritine diminue alors que celle de DMT1, qui joue un rôle dans l'absorption intestinale, et du récepteur de la transferrine augmente. Ceci aura pour conséquence d'augmenter l'absorption du fer dans la cellule et d'empêcher ce dernier d'en sortir. Les échanges de fer à travers les cellules permettent de maintenir un équilibre entre le compartiment intra et extracellulaire. Et c'est grâce à la modulation des flux du fer par l'action du complexe IRP/IRE que l'homéostasie dans la cellule est conservée.

Régulation extracellulaire

La régulation extracellulaire est principalement sous dépendance de l'hepcidine, une hormone circulante hyposidérémiant. Il existe principalement 3 étapes majeures du métabolisme du fer sur lesquelles l'hepcidine peut avoir une action : la libération du fer par les macrophages ayant recyclés les globules rouges (érythrophagocytose), la libération du fer stocké dans les hépatocytes, et la libération du fer par les entérocytes après absorption duodénale. (5) Sa cible est la ferroportine, une protéine codée par le gène *SCL40A1*, se situant à la surface des macrophages, des hépatocytes et au pôle basal des entérocytes. Cette protéine est la seule connue à ce jour capable d'exporter le fer de la cellule vers le milieu extracellulaire. (7) La fixation de l'hepcidine à la ferroportine entraîne l'internalisation et la dégradation de cette dernière dans la cellule. Le flux du fer en direction du plasma est donc bloqué, aboutissant à une rétention du fer intracellulaire et une diminution du fer dans le milieu extracellulaire.

Ainsi, l'hepcidine a un effet hyposidérémiant en diminuant le relargage du fer par les macrophages et les hépatocytes, et en diminuant l'absorption duodénale par blocage du transfert du fer de l'entérocyte au système sanguin.

L'hepcidine : principale hormone de régulation du fer

Rôle de l'hepcidine

L'hepcidine est un peptide d'une vingtaine d'acides aminés, préalablement décrite comme ayant des propriétés antimicrobiennes. Ce n'est qu'en 2001 que son implication dans l'homéostasie du fer a été mise en évidence (2,8). De nombreuses études ont découvert que sa synthèse est induite par l'augmentation du fer dans le sang et l'inflammation, tandis que

l'érythropoïèse l'inhibe. Son rôle principal est maintenant clairement établi et consiste à diminuer la concentration de fer dans le sang.

L'hepcidine existe sous la forme de 20, 22 ou 25 résidus d'acides aminés, elle est synthétisée principalement par le foie et sécrétée dans le plasma. Elle est produite après clivages successifs de son précurseur, la préprohepcidine (84 acides aminés). Ce dernier est codé par le gène *HAMP* (Hepcidin antimicrobial peptid) situé sur le chromosome 19. La forme bioactive correspond à l'hepcidine-25 : hautement conservée au sein des espèces de vertébrés, elle contient huit cystéines formant quatre ponts disulfures qui favorisent la stabilité de la molécule et lui confère une faible immunogénicité. (9)

Ce peptide circulant est détectable dans d'autres milieux biologiques que le sang, comme les urines ou le liquide céphalo-rachidien. Il existe d'autres sites de sécrétion tel que le cerveau, le cœur, l'estomac, le pancréas et le rein mais leur rôle dans l'homéostasie du fer reste à déterminer.

Action physiologique de l'hepcidine

La synthèse de l'hepcidine est augmentée par l'accumulation du fer dans l'organisme et l'inflammation, alors qu'elle sera réprimée par la carence martiale, la demande érythropoïétique et l'hypoxie. (5)

Les hépatocytes vont sécréter de l'hepcidine qui va aller se fixer sur la ferroportine, le seul transporteur membranaire connu chez les vertébrés à ce jour, qui assure la sortie du fer de la cellule en particulier au niveau des entérocytes, des macrophages, des cellules de Kupffer et, en moindre mesure, au niveau des hépatocytes. (1,7)

Cette fixation va entraîner l'internalisation et la dégradation lysosomale du complexe moléculaire formé « hepcidine-ferroportine » et une réduction des flux du fer. Il en résulte un abaissement de la sidérémie par diminution de l'absorption intestinale du fer et une

augmentation des réserves en fer par rétention intra-macrophagique et hépatocytaire. Cette hyposidérémie aura pour conséquence de limiter la disponibilité du fer pour les pathogènes, de réduire les apports en fer au niveau de la moelle osseuse et donc de diminuer l'érythropoïèse.

Régulation par le fer

Une boucle de rétroaction régule finement la concentration de l'hepcidine et du fer. Ce dernier, par des mécanismes complexes, augmente la quantité d'hepcidine qui, en retour, diminue le fer dans la circulation sanguine. Au niveau des hépatocytes, l'expression du gène *HAMP* qui code la synthèse de l'hepcidine, est modulée par de nombreux signaux.

Ainsi, en présence de fer, la transferrine va se fixer sur RTf1 situé à la surface des hépatocytes. Cette liaison va décrocher la protéine HFE (protéine de l'hémochromatose), initialement fixé à RTf1, qui va aller interagir avec RTf2. Le complexe ainsi formé « RTf2/HFE » va stimuler l'expression de l'hepcidine par des mécanismes moléculaires subtils, en interagissant avec les récepteurs aux BMP (Bone Morphogenetic Protein) et la protéine membranaire hémoporphyrine (HJV). Cette voie de signalisation va ensuite activer la cascade moléculaire BMP/SMAD. Les BMP font partie des ligands de la superfamille des Transforming Growth Factors- β . Ils induisent la phosphorylation des protéines cytoplasmiques SMAD 1, 5 et 8 (small mothers against decapentaplegic) en se fixant à leurs récepteurs (BMP-R 1 et 2). Les protéines SMAD 1, 5 et 8 vont ensuite interagir avec SMAD 4 et former un complexe protéique. (9) La translocation nucléaire de ce complexe permettra par la suite de réguler directement la transcription génique de l'hepcidine par fixation aux BMP-REs (BMP-responsive elements) situés sur le promoteur du gène *HAMP*. (figure 3)

A l'inverse, la protéase matriptase-2 encodée par le gène *TMPRSS6*, peut cliver l'HJV membranaire. Ceci aura pour conséquence d'inhiber la voie BMP/SMAD et donc de diminuer la production de l'hepcidine.

Régulation par l'inflammation

Le fer est un élément indispensable à la survie de la plupart des agents pathogènes. De ce fait, notre organisme a développé une série de mécanismes pour rendre le fer indisponible aux pathogènes. Par exemple en cas de syndrome inflammatoire ou d'infection, la sécrétion d'hepcidine est augmentée pour diminuer la sidérémie. L'hepcidine est stimulée principalement par l'interleukine 6 (IL-6), une cytokine pro-inflammatoire ayant un rôle central dans la production d'hepcidine. En effet, il a été démontré qu'une injection d'IL-6 chez l'homme induit une augmentation rapide de l'hepcidine urinaire (10).

In vitro, la stimulation de cellules hépatocytaires humaines par un panel de cytokines pro-inflammatoires a montré une forte induction de l'hepcidine par IL-6. (11)

La fixation d'IL-6 sur son récepteur active les enzymes de la voie JAKs (Janus Kinases) et ces dernières vont ensuite phosphoryler les facteurs de transcription STAT (Signal transducer and activator of transcription) et notamment STAT3. La translocation de STAT3 dans le noyau et sa fixation au niveau du promoteur du gène de l'hepcidine permettra ainsi de réguler l'expression génique pour produire l'hepcidine. (figure 3)

De plus, l'activine B, une cytokine appartenant à la superfamille des TGF- β , est également sécrétée en réponse à l'inflammation au niveau du foie et augmente l'expression de l'hepcidine par le biais de la voie des BMP. La fixation de l'activine B à ses récepteurs entraîne la phosphorylation des protéines Smad 1, 5 et 8 qui stimulent ensuite la transcription d'hepcidine au niveau des cellules du foie (12).

En présence d'inflammation, il y a donc mise en jeu de deux voies d'activation de l'expression de l'hepcidine : BMP/SMAD et JAK/STAT3.

Régulation par l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un des facteurs de régulation le plus important dans l'homéostasie du fer. Un lien est clairement établi entre l'augmentation de la sécrétion d'érythropoïétine (EPO) et la diminution de l'hepcidine (13). Tout stimulus augmentant les besoins en fer, tel que le saignement, l'hypoxie, l'hémolyse ou bien l'anémie va entraîner la sécrétion d'EPO au niveau rénal. L'EPO va ensuite activer l'érythropoïèse dans la moelle osseuse, ce qui va par l'intermédiaire de médiateurs secondaires aboutir à la suppression de l'hepcidine (figure 4).

Plusieurs facteurs de régulation de l'activité érythroïde ont donc été proposés comme médiateurs sécrétés par la moelle osseuse. C'est le cas de GDF-15 (Growth differentiation Factor-15) et de TWSG1 (Twisted Gastrulation protein), membres de la famille des TGF- β , mais actuellement, l'érythroferrone est considéré unanimement comme le facteur érythroïde à la base de l'inhibition de l'hepcidine. L'érythroferrone (ERFE) est une hormone stimulée par l'augmentation de l'EPO. Elle est codée par le gène *Erfe* et est sécrétée par les érythroblastes dans la moelle osseuse. Une fois dans le sang, ERFE va interagir au niveau des hépatocytes par des mécanismes partiellement connus. Selon l'article d'Arezes & al (14), ERFE inhibe la voie BMP/SMAD en se liant aux protéines BMP et plus précisément à BMP6. S'en suit une diminution de phosphorylation des protéines Smad et une baisse d'expression de l'hepcidine.

Applications cliniques du dosage de l'hepcidine

Les hémochromatoses héréditaires avec mutation du gène HFE

Également appelées hémochromatoses héréditaires (HH) de type 1, elles sont de loin les formes les plus fréquentes d'HH et sont dues à la mutation homozygote C282Y dans le gène *HFE* (tableau 1). Ce gène code la protéine HFE qui ne peut plus interagir avec les récepteurs de la transferrine et de ce fait, empêche l'activation de la voie BMP/SMAD. La diminution drastique de l'hepcidine qui en découle entraîne donc une hyperabsorption intestinale du fer par les entérocytes et une libération du fer intracellulaire (macrophages et hépatocytes) incontrôlable. Il y a donc une concentration d'hepcidine effondrée en regard d'une concentration en fer très élevée. Son dosage a donc toute sa place pour le pronostic et le suivi thérapeutique. La mutation C282Y est assez répandue, en particulier en Europe du Nord, mais reste nettement supérieure à la fréquence de patients atteints cliniquement d'hémochromatose. Ceci s'explique par une pénétrance biologique et clinique insuffisante de l'homozygotie C282Y. L'existence de facteurs de risque acquis ou génétiques (syndrome métabolique, polymorphisme génétique, alcool...) sont susceptibles de moduler l'expression clinique de la pathologie qui reste malgré tout plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. (1,15)

Les autres types d'hémochromatoses héréditaires

Beaucoup moins fréquentes (<10% des HH), elles ne sont pas liées à l'atteinte du gène *HFE* (tableau 1). Les mutations de ces maladies touchent d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de production de l'hepcidine. (16) Elles regroupent les hémochromatoses juvéniles qui sont caractérisées par la mutation du gène de la protéine hémojuvéline (*HJV*) responsable d'une protéine HJV non fonctionnelle (HH de type 2A), ou par l'atteinte du gène de l'hepcidine

(*HAMP*) à l'origine d'un défaut d'expression de l'hepcidine (type 2B) . La surcharge en fer est précoce, massive et la mortalité est élevée si le patient n'est pas soigné, mais un traitement intense par phlébotomie et chélation améliore significativement le pronostic. L'HH de type 3 est quant à elle la conséquence d'une mutation du gène codant pour le récepteur de la transferrine de type 2 (RTf2). Notons toutefois que pour l'hémochromatose de type 4, ce n'est pas la synthèse de l'hepcidine qui est abolie mais il existe un défaut de sensibilité de la ferroportine à l'hormone (gain ou perte de fonction de la protéine). Ainsi, dans l'HH de sous-type 4A ou maladie de la ferroportine, la mutation du gène *SLC40A1* codant pour la ferroportine aboutie à une perte de fonction de la protéine. Ceci empêche la libération du fer intracellulaire, notamment des macrophages et cellules de Kupffer, vers le milieu sanguin. Les patients présentent un risque important d'anémie. Cette anémie par carence en fer est responsable d'une diminution de l'hepcidine.

Dans le sous-type 4B, la mutation du gène *SLC40A1* est à la base d'une résistance d'action (gain de fonction) de la ferroportine. Le relargage massif de fer dans le milieu extracellulaire, non régulé par l'hepcidine, explique que les concentrations sanguines de l'hormone soient normales voire élevées dans ce cas-là.

L'anémie par carence en fer absolue

L'anémie la plus fréquente est de loin l'anémie ferriprive. Le déficit en fer dans l'organisme et l'érythropoïèse stimulée par l'anémie, entraînent une diminution de l'hepcidine pour maximiser l'absorption de l'oligoélément et son recyclage macrophagique. Le but étant d'assurer un apport suffisant de fer pour l'érythropoïèse. Selon l'OMS, l'anémie affecte près de 25 % de la population mondiale dont la moitié des cas sont attribuables à une carence en fer. Chez ces patients, la diminution de la ferritine est le reflet d'un manque de stockage du fer. Cela est

associé à un fer sérique et un coefficient de saturation de la transferrine diminués. A l'inverse, la transferrine est augmentée, ainsi que sa capacité de fixation afin de maximiser la distribution du fer dans l'organisme, en particulier au niveau de la moelle osseuse. (1)

D'autres paramètres biologiques, comme le dosage de l'hepcidine, peuvent présenter leur intérêt en cas de difficulté diagnostique. La situation d'anémie par carence martiale absolue par exemple, doit se différencier de l'anémie par carence en fer fonctionnelle où les stocks ferriques sont normaux, mais où la mobilisation du fer est diminuée en raison d'une augmentation de l'hepcidine. Ce sont donc deux situations de carences martiales différentes sur le plan physiopathologique où le dosage de l'hepcidine peut s'avérer utile pour les distinguer.

L'anémie inflammatoire

La croissance et la pathogénicité de nombreux microorganismes requièrent la présence de fer. La diminution de la sidérémie est un mécanisme de défense qui a évolué au cours du temps afin de lutter contre les infections. Pour cela, l'augmentation de l'hepcidine est nécessaire. Elle permettra de diminuer la concentration du fer dans le sang en dégradant la ferroportine qui ne pourra plus exporter l'ion dans le milieu extracellulaire : les patients présentent ainsi une anémie de carence martiale fonctionnelle. Le fer est bloqué dans les macrophages et ne peut être utilisé pour l'érythropoïèse.

Lors d'une pathologie inflammatoire ou d'une infection, la synthèse de l'hepcidine va être stimulée par la voie JAK2/STAT3. Cette voie est médiée principalement par IL-6. L'hyposidérémie engendrée et la séquestration du fer par des protéines telles que la ferritine, la transferrine ou encore la lactoferrine vont limiter la disponibilité du fer aux pathogènes ainsi que la multiplication de ces derniers. (17) Dans certaines situations cliniques, comme chez le

sujet âgé polypathologique, la carence martiale absolue est fréquemment associée à un syndrome inflammatoire, ce qui rend difficile l'interprétation des marqueurs de l'homéostasie du fer. Le dosage de l'hepcidine est ici pertinent pour mieux appréhender ces conditions complexes où co-existent anémie ferriprive et anémie de l'inflammation (9). Cette analyse a donc toute sa place dans la démarche diagnostique et thérapeutique de l'anémie inflammatoire.

L'anémie résistante au traitement par le fer oral (IRIDA)

Beaucoup plus rare, l'anémie de type IRIDA (pour Iron resistant iron deficiency anemia) est une anémie microcytaire hypochrome d'origine génétique, associée à une concentration anormalement élevée en hepcidine. Plusieurs mutations sont responsables de cette forme d'anémie et touchent le gène *TMPSSR6* qui code pour la matriptase-2, principalement exprimée au niveau hépatique. Cette sérine protéase de type 2 inhibe l'expression de l'hepcidine en clivant la protéine HJV membranaire, corécepteur de BMP6. L'HJV soluble ainsi formée entre en compétition avec l'HJV membranaire et bloque le signal d'activation de la voie BMP/HJV. En cas de mutation du gène *TMPSSR6*, la répression de l'hepcidine est levée, ce qui entraîne un défaut important d'absorption intestinale et de mobilisation du fer par élévation de l'hepcidine. Ces patients sont donc anémiés en raison d'un fer sérique très bas, en général inférieur à 5 $\mu\text{mol/l}$ et non améliorés par la prise de fer oral. (18) On parle de carence martiale « fonctionnelle », la majorité du fer étant séquestré dans les macrophages.

L'anémie est résistante au traitement par le fer oral alors que l'injection intra veineuse de fer est efficace. Le dosage sanguin ou urinaire de l'hepcidine montre dans cette pathologie, une augmentation très importante de l'hormone, malgré la présence de l'anémie.

Au final, l'anémie de type IRIDA met en évidence le rôle central de l'hepcidine et l'intérêt primordial de son dosage pour la prise en charge thérapeutique de ces patients.

Les anémies dysérythropoïétiques avec surcharge en fer

La β -thalassémie et les syndromes myélodysplasiques illustrent bien ce type d'anémie. Chez les patients atteints de β -thalassémie, le défaut de production des chaînes β de l'hémoglobine dans les précurseurs érythroblastiques entraîne leur apoptose. L'anémie qui s'en suit, stimule la sécrétion de médiateurs érythropoïétiques (EPO, ERF) qui provoque la répression de l'hepcidine. Les concentrations en hepcidine sont donc très abaissées, ce qui conduit à une hyperabsorption et une surcharge tissulaire en fer importante. Malgré l'excès de fer toxique, l'absence d'augmentation de l'hepcidine est liée à la prédominance du facteur inhibiteur de l'érythropoïèse. La transfusion permet de corriger partiellement les concentrations en hepcidine. En effet, chez les patients transfusés, les concentrations de l'hormone sont en général plus élevées que les non transfusés (19). Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont aussi des situations complexes où l'hepcidine est soumise à des facteurs d'activation et d'inhibition concomitants. La concentration de l'hormone va dépendre du type de SMD : les valeurs les plus basses sont retrouvées dans les anémies réfractaires sidéroblastiques, tandis que les valeurs les plus hautes caractérisent les anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB) et les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) (20). L'interprétation du ratio hepcidine/ferritine semble être un indicateur pronostic prometteur. En effet, un ratio bas (<9) est prédictif d'une mauvaise réponse au traitement par EPO ou d'une durée de l'effet thérapeutique raccourcie (21). Le dosage de l'hepcidine est donc utile dans le suivi thérapeutique des SMD, notamment comme marqueur pronostic de réponse au traitement.

L'anémie de l'insuffisant rénal

L'anémie du sujet en insuffisance rénale est une anémie d'origine complexe et multifactorielle. Chez ces patients, on s'attend à ce que la concentration en hepcidine soit augmentée. En effet, nous pouvons envisager que la diminution de l'EPO lève l'inhibition des facteurs érythropoïétiques sur l'hepcidine. Cependant, des dosages d'EPO chez l'insuffisant rénal anémié ne montrent pas forcément de diminution de l'érythropoïétine, mais cette concentration serait tout de même inappropriée par rapport à la sévérité de l'anémie (15). En outre, l'état inflammatoire chronique de ces patients et la diminution de la clairance de l'hepcidine sont également une cause d'augmentation de l'hormone. L'hepcidine exerce donc en excès son action hyposidérémiant en diminuant l'absorption du fer et en retenant le fer dans les cellules, notamment dans les macrophages. Ceci entraîne une carence en fer restrictive dite fonctionnelle, responsable de l'anémie.

Par ailleurs, il est rapporté que la concentration en hepcidine est effondrée chez les patients atteints de maladie rénale chronique avec carence en fer absolue, par rapport à ceux ayant un profil en fer normal. (22) Le signal de la carence en fer est prédominant dans ce contexte, ce qui diminue la production en hepcidine. Ceci est un moyen de lutter contre l'anémie et assure un apport en fer minimum pour l'érythropoïèse.

L'anémie du cancer

De par son pouvoir pathogène ou par les traitements qu'il engendre (cytotoxicité des chimiothérapies, radiothérapies...), le cancer cause souvent une anémie chez le malade.

Le cancer est une situation très complexe qui associe différents facteurs pouvant être à l'origine de l'anémie (saignements occultes, hémolyse, envahissement de la moelle osseuse, inflammation...). Chez ces patients, l'inflammation constante libère des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α qui agiront à plusieurs niveaux pour diminuer la sidérémie et l'érythropoïèse. La stimulation de l'hepcidine permettra d'inhiber la ferroportine, ce qui limitera l'absorption du fer mais aussi perturbera le flux de fer dans l'organisme en le séquestrant notamment au niveau macrophagique. En conséquence, l'augmentation du fer intracellulaire qui s'en suit stimulera la synthèse de la ferritine dont la concentration augmente en cas de syndrome inflammatoire. (5)

L'anémie inflammatoire du patient cancéreux est une anémie microcytaire, associée à une diminution du fer sérique mais une ferritine normale voire augmentée. Elle s'oppose à l'anémie de la carence martiale qui a une ferritine diminuée. Dans le cas complexe de l'anémie du cancer, l'hepcidine serait donc un outil diagnostique approprié qui permettrait de distinguer plus facilement le type d'anémie et ainsi d'améliorer la prise en charge thérapeutique.

Dosage de l'hepcidine

Spectrométrie de masse : la méthode de référence

Le dosage de l'isoforme 25-hepcidine (forme bioactive) par techniques immunologiques présente certaines difficultés en raison de la petite structure de l'hepcidine et de sa faible immunogénicité. De plus, le risque de réactions croisées avec d'autres isoformes de l'hormone est non négligeable. La spectrométrie de masse représente une alternative aux méthodes classiques d'immunoanalyse. Elle associe une méthode séparative physique de molécules par chromatographie en phase gazeuse ou liquide, et permet d'identifier et quantifier des molécules

en fonction de leur rapport masse/charge. C'est une méthode de dosage très sensible et très spécifique, en constante amélioration. A ce jour, il n'y a pas de consensus quant à la méthode de référence pour le dosage de l'hepcidine, mais les techniques de chromatographie liquide couplées à de la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS) sont de loin les plus utilisées en raison de leur spécificité et robustesse. Toutefois, leurs conditions préanalytiques et analytiques nécessitent d'être harmonisées entre les différents laboratoires car elles peuvent être source de variabilité dans les rendus de résultats. (23,24) Les techniques de LC/MS-MS restent cependant prometteuses dans le cadre d'une utilisation diagnostique de routine et utilisent dans la majorité des cas un standard interne à base d'hepcidine isotopiquement marquée.

Conditions préanalytiques

La maîtrise du pré-analytique (types de tube, conditions et heure de prélèvement) et la connaissance d'un potentiel facteur de confusion intra ou inter-individuel (sexe, âge...) ayant un impact sur le dosage de l'hepcidine sont des étapes essentielles avant toute analyse. L'hepcidine suit un rythme circadien avec une augmentation dans le sérum au cours de la journée. Ainsi, les valeurs moyennes sont plus élevées en fin d'après-midi qu'en début de matinée. (25) De plus, l'élévation de la concentration en hepcidine au cours de la journée est indépendante de la quantité de fer ingérée dans la nourriture. Une alimentation riche ou pauvre en fer n'a donc aucun impact (26). En raison de ce cycle circadien et dans un souci d'harmonisation du dosage, il est donc préférable de prélever les patients en début de matinée afin de s'affranchir de cette variation de concentration.

Le type de tube de prélèvement et de matrice (plasma, sérum) ne semblent pas avoir d'effet sur les résultats du dosage de l'hormone. En revanche, des concentrations plus élevées ont été notifiées sur plasma dans les tubes éthylène diamine tétra acétate (EDTA) (27). Enfin, les

échantillons sont stables (avec une variation de moins de 15%) 1 jour à température ambiante, 6 jours à +4°C et au moins 42 jours à -20°C après 5 cycles de congélation-décongélation. Les échantillons peuvent également être stockés à -80°C pendant au moins 22 semaines (28).

Valeurs de référence dans la littérature

La littérature scientifique rapporte une variation significative de l'hepcidine en fonction de l'âge et du sexe de l'individu, mais les concentrations sont similaires au sein d'une population de même âge et même sexe. Ainsi, nous observons que l'hepcidine est plus basse chez les femmes que chez les hommes. De plus, l'hormone est plus basse chez les sujets jeunes et ce, de façon significative chez les hommes de moins de 30 ans et les femmes non ménopausées de moins de 50 ans, ce qui peut être mis en lien avec la perte de fer au cours des menstruations de la femme jeune (28). Le tableau 2 présente les concentrations en hepcidine dosées par LC/MSMS et retrouvées dans la littérature, en fonction du sexe et de l'âge chez la femme.

Dosage de l'hepcidine par LC/MSMS au CHU Grenoble-Alpes

Description de la méthode

Le dosage de l'hepcidine par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem a été mis en place au CHU de Grenoble. Nous utilisons un spectromètre type 5500 Q-Trap (Sciex) avec une source électrospray en mode positif et couplé à un système de chromatographie liquide de type HPLC (Neixera 20AD). L'extraction au préalable de nos échantillons s'effectue sur des cartouches d'extraction en phase solide (SPE). Lors de l'étape d'élution, l'hepcidine est récupérée dans des microplaques 96 puits « low binding ».

Notre séparation chromatographique s'effectue avec une colonne Poroshell 120 SB-C18 4.6*100 mm 2.7 µm en utilisant deux phases en gradient (100% H₂O + 0.1 % acide formique et 100 % acétonitrile + 0.1 % acide formique). La quantification de la molécule est réalisée par le mode MRM (multiple reaction monitoring). Ceci permet d'augmenter la spécificité de l'analyse de façon considérable et de diminuer le bruit de fond. Nos transitions utilisées pour l'hepcidine et pour l'étalon interne marqué de l'hepcidine (¹³C et ¹⁵N) sont respectivement : 698,1 / 1040,0 et 703 ,3 / 1045,5.

Les performances analytiques de notre technique

Nous avons établi notre domaine de mesure en prenant comme limite de quantification (LOQ) notre point de gamme le plus bas à 2 ng/ml car celui-ci permet de conserver un rapport signal/bruit >10, tout en correspondant à une concentration suffisamment basse en hepcidine. Pour notre limite de quantification haute, celle-ci correspond à notre point de gamme le plus haut, soit 200 ng/ml. La répétabilité de notre analyse présente des coefficients de variation (CV) inférieurs à 10 % sur trois niveaux de mesure (5, 60 et 150 ng/ml). Quant à notre fidélité intermédiaire, les CV sont inférieurs à 15 % sur ces trois niveaux. Nos résultats sont donc conformes par rapport à nos attentes et selon les recommandations de la Food and Drug Administration (CV<15 %). (29)

Valeurs de référence

L'absence de valeurs de référence clairement établies oblige chaque laboratoire à constituer ses propres valeurs. Nous l'avons réalisé au laboratoire et les résultats sont concordants avec la littérature scientifique (tableau 2).

Comparaison de méthode

En l'absence de standardisation du dosage de l'hepcidine et de valeurs de référence, nous avons comparé les valeurs de différentes concentrations en hepcidine avec le laboratoire de biochimie de l'hôpital Louis Mourier à Paris, qui utilise la même technique analytique (LC-MS/MS).

Cette comparaison montre une excellente corrélation ($r^2 = 0,98$), que ce soit pour les valeurs faibles mais également pour celles plus élevées.

Au total, l'évaluation des performances analytiques de notre méthode a été satisfaisante en termes de robustesse et de fiabilité des résultats obtenus, ce qui nous permet aujourd'hui de proposer ce dosage en routine hospitalière.

Conclusion

L'homéostasie du fer est un phénomène biologique très complexe dont les connaissances n'ont cessé d'évoluer au cours des dernières années. La compréhension des mécanismes de régulation a été révolutionnée par la découverte de l'hepcidine, considérée actuellement comme l'hormone principale de régulation du fer.

Cette protéine, constituée de 25 acides aminés, entraîne l'internalisation et la dégradation de la ferroportine, et permet ainsi de diminuer la sidérémie. Elle est principalement augmentée par l'élévation du fer et l'inflammation tandis que l'activation de l'érythropoïèse l'inhibe. Son dosage, en association avec d'autres paramètres biologiques du bilan martial, nous permet de mieux appréhender certaines pathologies liées au fer en évaluant la sévérité de leur atteinte sur l'homéostasie du fer et leurs conséquences clinico-biologiques.

Le dosage de cette hormone par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem, est aujourd'hui considéré comme la méthode de référence. Les performances de cette technique analytique mise en place au laboratoire du CHU Grenoble -Alpes, sont fiables, robustes et répondent aux exigences fixées par le laboratoire. Ce dosage est donc désormais disponible et vient compléter le panel des paramètres du bilan martial.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références bibliographiques

1. Grandchamp Desraux B. Métabolisme du fer: physiologie et pathologie. Paris: Bioforma; 2011.
2. 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. *Journal of Biological Chemistry*. mars 2001;276(11):7811-9.
3. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease: Iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*. avr 2017;21:S6-20.
4. Rucheton B. 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. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, Sept 2015; :203.
5. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. sept 2012;1823(9):1434-43.
6. Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP, Eisenstein RS. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *RNA*. 1 janv 2010;16(1):154-69.
7. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*. mars 2005;1(3):191-200.
8. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 17 juill 2001;98(15):8780-5.
9. Wolff F, de Verneuil H, Rucheton B, Lefebvre T, Vialaret J, Ropert-Bouchet M, et al. Hepcidin: immunoanalytic characteristics. *Annales de biologie clinique*. nov 2018;76(6):705-15.
10. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 1 mai 2004;113(9):1271-6.
11. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 1 avr 2003;101(7):2461-3.
12. 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*. 12 juill 2012;120(2):431-9.

13. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. 1 mars 2010;95(3):505-8.
14. Arezes J, Foy N, McHugh K, Sawant A, Quinkert D, Terraube V, et al. Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood* Août 2018; vol132(14) :5.
15. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu Rev Med*. 18 févr 2011;62(1):347-60.
16. Santos PCJ de L, Dinardo CL, Caçado RD, Schettert IT, Krieger JE, Pereira AC. Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2012;34(4):311–6.
17. Jurado RL. Iron, Infections, and Anemia of Inflammation. *Clin Infect Dis* 1997 Oct;25(4):888-95 :8.
18. Guillem F, Grandchamp B. Tmprss6 mutations in IRIDA, and association of frequent variants with hematological parameters. *Hématologie*. sept 2011;17(5):357-64.
19. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. févr 2020;105(2):260-72.
20. Santini V, Girelli D, Sanna A, Martinelli N, Duca L, Campostrini N, et al. Hepcidin Levels and Their Determinants in Different Types of Myelodysplastic Syndromes. Kaufman D, éditeur. *PLoS ONE*. 19 août 2011;6(8):e23109.
21. Park S, Kosmider O, Maloisel F, Drenou B, Chapuis N, Lefebvre T, et al. Dyserythropoiesis evaluated by the RED score and hepcidin:ferritin ratio predicts response to erythropoietin in lower-risk myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. mars 2019;104(3):497-504.
22. Mercadel L, Metzger M, Haymann JP, Thervet E, Boffa J-J, Flamant M, et al. The Relation of Hepcidin to Iron Disorders, Inflammation and Hemoglobin in Chronic Kidney Disease. Joles JA, éditeur. *PLoS ONE*. 30 juin 2014;9(6):e99781.
23. Kroot JJC, van Herwaarden AE, Tjalsma H, Jansen RTP, Hendriks JCM, Swinkels DW. Second round robin for plasma hepcidin methods: First steps toward harmonization. *Am J Hematol*. 2012 Oct;87(10):977-83.
24. Van der Vorm LN, Hendriks JCM, Laarakkers CM, Klaver S, Armitage AE, Bamberg A, et al. Toward Worldwide Hepcidin Assay Harmonization: Identification of a Commutable Secondary Reference Material. *Clinical Chemistry*. 1 juill 2016;62(7):993-1001.
25. 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. *Analytical Biochemistry*. juin 2009;389(2):124-9.
26. Schaap CC, Hendriks JC, Kortman GA, Klaver SM, Kroot JJ, Laarakkers CM, et al. Diurnal Rhythm rather than Dietary Iron Mediates Daily Hepcidin Variations. *Clinical Chemistry*. 1 mars 2013;59(3):527-35.

27. Laarakkers CMM, Wiegerinck ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AM, et al. Improved Mass Spectrometry Assay For Plasma Heparin: Detection and Characterization of a Novel Heparin Isoform. *Randeva HS, éditeur. PLoS ONE.* 4 oct 2013;8(10):e75518.
28. Itkonen O, Parkkinen J, Stenman U-H, Hämäläinen E. Preanalytical factors and reference intervals for serum heparin LC–MS/MS method. *Clinica Chimica Acta.* avr 2012;413(7-8):696-701.
29. FDA. Guidance for industry, bioanalytical method validation, US. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Biopharmaceutics. FDA, May 2018
30. Pantopoulos K. Inherited Disorders of Iron Overload. *Front Nutr.* 29 oct 2018;5:103.
31. Pasricha S-R, McHugh K, Drakesmith H. Regulation of Heparin by Erythropoiesis: The Story So Far. *Annu Rev Nutr.* 17 juill 2016;36(1):417-34.

Figure 11 : Absorption duodénale du fer au niveau des entérocytes par l'intermédiaire de HCP1 pour le fer héminique et de DMT1 après réduction par le DcytB pour le fer non héminique.
 DcytB = cytochrome B duodénal ; DMT1 = Divalent metal transporter 1 ; HCP1 = Haem carrier protein 1.

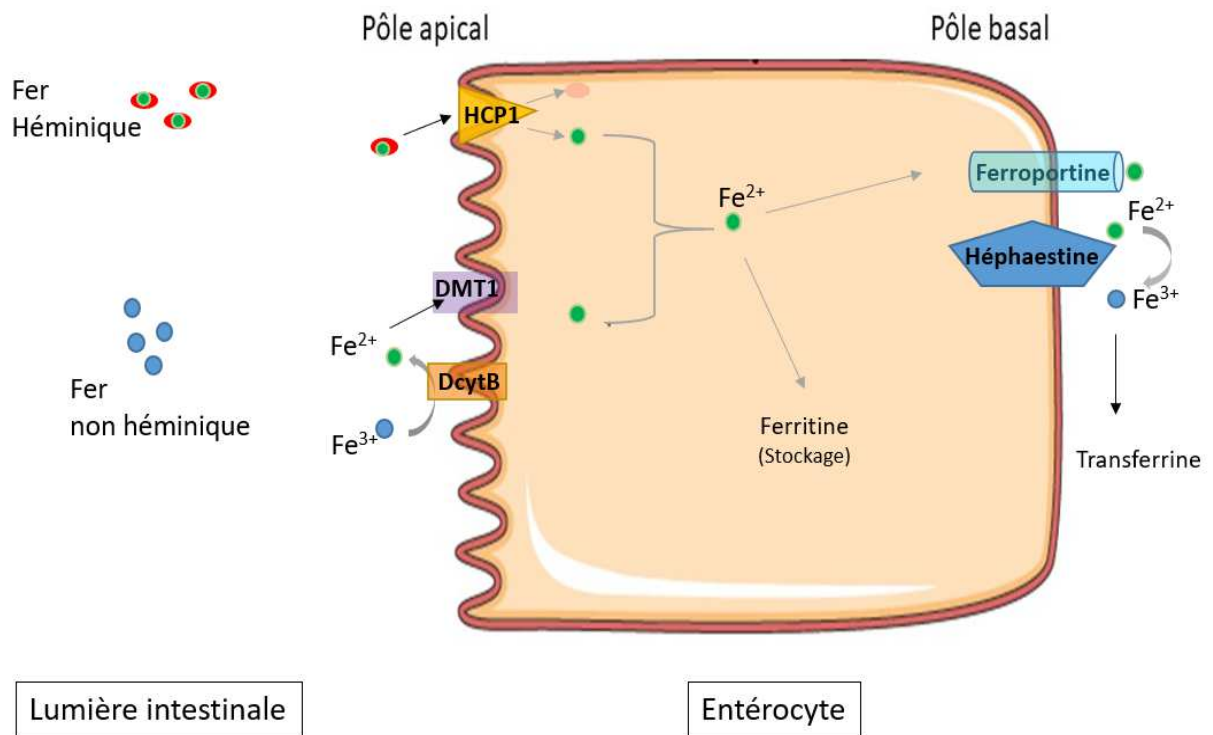


Figure 12 : Phénomène d'érythrophagocytose avec relargage du fer hémérique par le macrophage.

Image créée avec BioRender

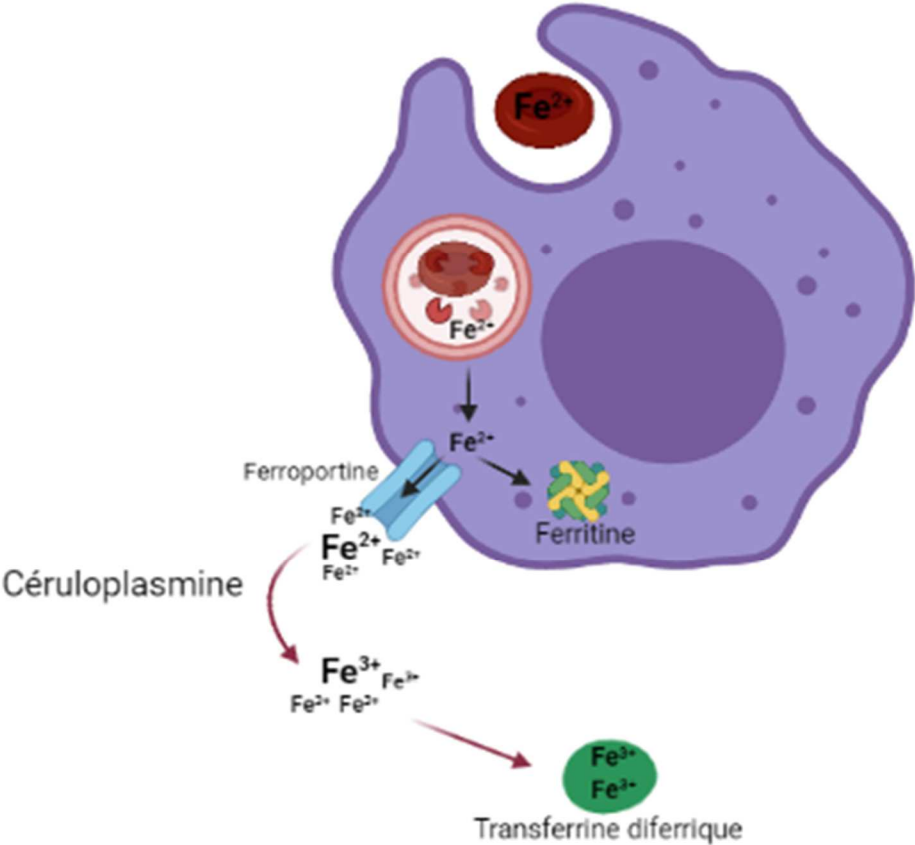


Figure 3 : Mécanismes de régulation de l'expression de l'hepcidine par le fer et l'inflammation d'après «Inherited disorders of Iron Overload» de K.Pantopoulos (30)

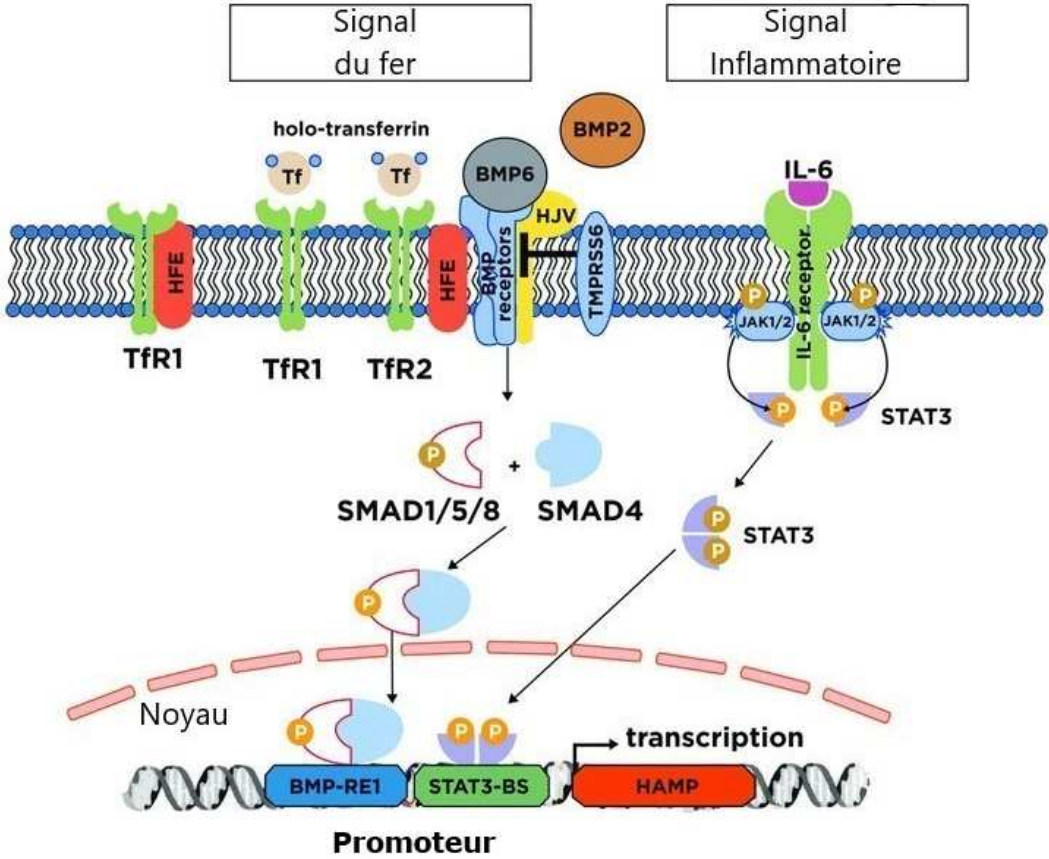


Figure 4 : Mécanisme de régulation de la suppression de l'expression de l'hepcidine par l'érythropoïèse, inspirée de « Regulation of Heparin by Erythropoiesis : The story so far » Annu Rev Nutr. 17 juill 2016;36 (1):417-34, de Pasricha & al. (31)

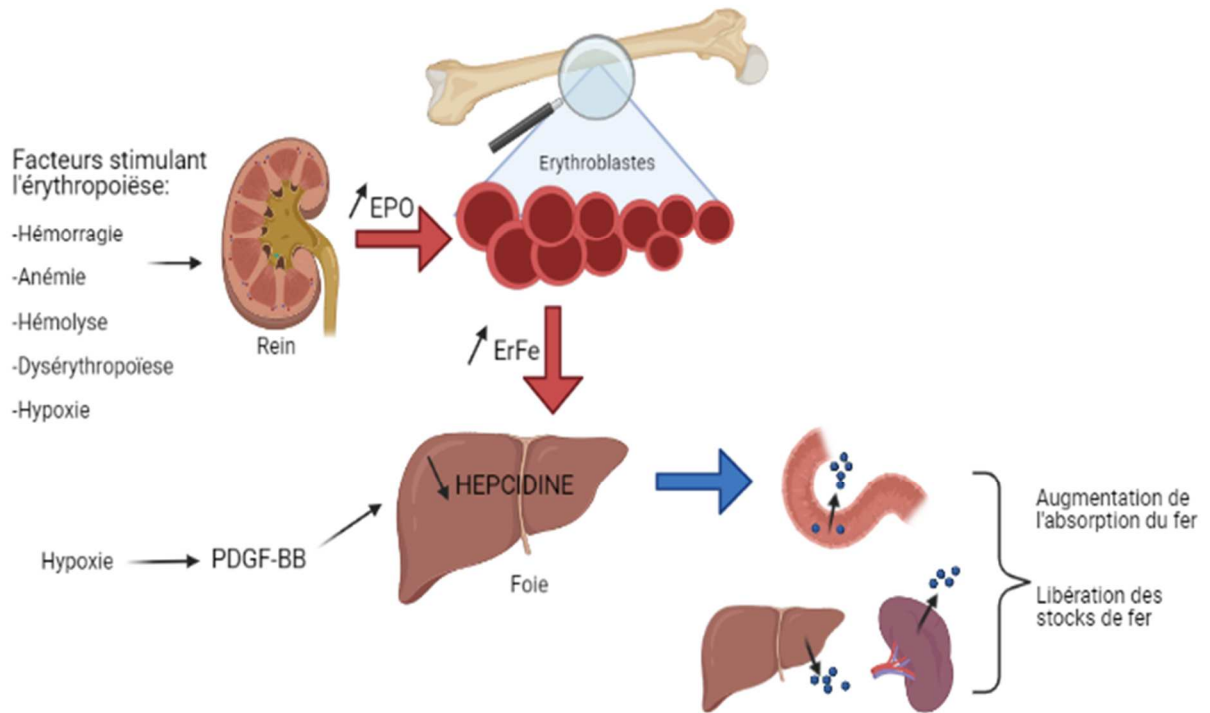


Tableau 7 : Comparaison des 6 modèles d'hémochromatoses héréditaires (1,4)

Type d'hémochromatose	Gène muté	Hérédité	Concentration en hepcidine	Signes cliniques
Type 1 (forme de l'adulte)	HFE	Récessive	Bas	Arthropathie Cirrhose Cancer du foie
Type 2A (forme juvénile)	HJV	Récessive	Indéetectable	Cœur* Cirrhose Diabète Hypogonadisme
Type 2B (forme juvénile)	HAMP (hepcidine)	Récessive	Indéetectable	Cœur* Cirrhose Diabète Hypogonadisme
Type 3 (forme de l'adulte)	RTf2	Récessive	Bas	Cirrhose Cancer du foie
Type 4A Maladie de la ferroportine (perte de fonction)	SLC40A1 (ferroportine)	Dominante	Bas	Surcharge cellules de Kupffer (sans risque de cirrhose)
Type 4B (gain de fonction)	SLC40A1 (ferroportine)	Dominante	Elevé	Cirrhose

* : atteinte cardiaque de type trouble du rythme ou insuffisance cardiaque congestive

Tableau 2 : Valeurs de référence d’hepcidine établies par technique LC-MS/MS retrouvées dans la littérature.

Littératures	Population	Intervalle de référence (en ng/ml)
Itkonen, 2012 (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, 2009 (LC-MS/MS)	Femmes	1,4 à 20,1
	Hommes	3,9 à 30,1
Wolff, 2013 (LC-MS/MS)	Femmes et Hommes	3,35 à 42,13

Le serment d'Hippocrate

Texte revu par l'Ordre des médecins en 2012

“ **Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.**

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque. ”

THÈSE SOUTENUE PAR : Julien MIOZZO

TITRE : RÔLE ET INTERÊT DU DOSAGE DE L'HEPCIDINE DANS L'HOMEOSTASIE DU FER

CONCLUSION

L'homéostasie du fer est un phénomène biologique très complexe dont les connaissances n'ont cessé d'évoluer au cours des dernières années. En effet, le fer est un élément essentiel chez l'Homme et sa régulation est nécessaire pour garantir son homéostasie au sein de l'organisme. La compréhension de cette régulation est donc primordiale et a été révolutionnée par la découverte de l'hepcidine, considérée actuellement comme l'hormone principale de régulation du fer.

Cette protéine, constituée de 25 acides aminés, entraîne l'internalisation et la dégradation de la ferroportine, seule protéine membranaire connue à ce jour pour exporter le fer du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. L'hepcidine permet ainsi de diminuer la sidérémie. Elle est principalement augmentée par l'élévation du fer et l'inflammation tandis que l'activation de l'érythropoïèse l'inhibe. La compréhension de son rôle et de sa régulation nous permet de mieux appréhender certaines pathologies liées au fer. En effet, connaître la concentration en hepcidine chez des patients atteints d'hémochromatose, d'anémie ou bien d'une myélodysplasie nous permet d'évaluer la sévérité de l'impact sur l'homéostasie du fer et ses conséquences au niveau biologique (notamment hématologique) et clinique. Ce dosage, en association avec d'autres paramètres biologiques du bilan martial, permet également d'adopter une conduite à tenir pour la prise en charge thérapeutique de la pathologie. L'hepcidine devient ainsi une molécule prometteuse pour le suivi des pathologies présentant une sur ou sous production en hepcidine, ainsi qu'un outil diagnostique important concernant l'origine des anémies.

Le dosage de cette hormone par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem est aujourd'hui considéré comme la méthode de référence. Les performances de cette technique analytique mise en place au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes, sont fiables, robustes et répondent aux exigences fixées par le laboratoire. Ce dosage est donc désormais accessible à la prescription de biologie médicale et vient compléter le panel des paramètres du bilan martial.

Enfin, au vu des connaissances présentées dans cette thèse, l'axe hepcidine-ferroportine pourrait être à l'avenir une cible thérapeutique spécifique dans le traitement de diverses pathologies touchant l'homéostasie du fer. Ainsi, l'administration d'agonistes pourrait par exemple être effectuée en cas de surcharge en fer, comme dans l'hémochromatose héréditaire, ou à l'inverse, celle d'antagonistes pourrait être envisagée dans le traitement de l'anémie chronique inflammatoire. Ces hypothèses nécessitent cependant d'être explorées pour évaluer l'impact d'une telle modulation sur l'homéostasie du fer, et il est certain que le dosage de l'hepcidine aura toute sa place dans l'exploration de ces pistes thérapeutiques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 1^{er} octobre 2021

LE DOYEN



Pr. Patrice MORAND

Pour le Président
et par délégation

Le Doyen de Médecine
Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Pr. Sophie PARK

CHU GRENOBLE ALPES
Professeur Sophie PARK
CHEF du SERVICE d'HEMATOLOGIE
RPPS 10001566073
CS 10217 - 38043 Grenoble Cedex 09
FINISS 380780080

ABSTRACT

Iron is an essential element to the well functioning of the organism and requires careful maintenance of its homeostasis. This is mainly due to hepcidin, a hormone secreted by the liver that controls the flow of iron within the body. It has a hypsideremic action by reducing the expression of ferroportin, the only protein known to this day, which can export iron into the extracellular environment. This has the effect of decreasing intestinal absorption and increasing intracellular retention, especially in macrophages. Hepcidin is stimulated by elevation of iron and inflammation while activation of erythropoiesis inhibits it. Understanding its regulation allows a better understanding of the pathophysiological mechanisms of overload diseases and iron deficiency. Therefore, the hepcidin analysis is interesting for the exploration of iron homeostasis. In combination with other biological parameters of iron status, it is possible to find better instructions for therapeutic managements of iron metabolism diseases. Thus, an assaying method by coupling liquid chromatography and tandem mass spectrometry has been implemented at Grenoble University Hospital and the analytical performances of this assay met the laboratory requirements in terms of reliability of the analysis.

RÉSUMÉ

Le fer est un élément essentiel au bon fonctionnement du corps humain et nécessite un maintien minutieux de son homéostasie. Ce maintien s'effectue principalement grâce à l'hepcidine, une hormone sécrétée par le foie qui contrôle les flux de fer au sein de l'organisme. Celle-ci possède une action hyposidérémiante en diminuant l'expression de la ferroportine, seule protéine transmembranaire connue à ce jour pour exporter le fer dans le milieu extracellulaire. Ceci a pour effet de diminuer l'absorption intestinale et d'augmenter la rétention intracellulaire, notamment dans les macrophages. L'hepcidine est principalement stimulée par l'élévation du fer et l'inflammation tandis que l'activation de l'érythropoïèse l'inhibe. Comprendre sa régulation permet ainsi de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques des maladies de surcharge et de carence en fer. Le dosage de l'hepcidine, devient donc intéressant dans l'exploration de l'homéostasie du fer. En association avec d'autres paramètres du bilan martial, il permet d'adopter une meilleure prise en charge thérapeutique des pathologies du métabolisme du fer. Aussi, une technique de dosage par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem a été mise en place au CHU de Grenoble et les performances analytiques de cette méthode ont répondu aux exigences du laboratoire en termes de fiabilité et robustesse de l'analyse.