



FACULTÉ  
DE PHARMACIE



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

# Apport du dosage de l'hepcidine dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et autres applications cliniques

**Thèse présentée par Fleur Wolff**

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences pharmaceutiques et biomédicales

Année académique 2019-2020

Sous la direction du Professeur Frédéric Cotton, promoteur

et du Professeur Béatrice Gulbis, co-promotrice

LHUB-ULB

## **Jury de thèse :**

Président : Professeur Jonathan Goole

Membre externe : Professeur Yves Beguin, ULiège, Médecine interne-Hématologie

Membre interne : Professeur Stéphanie Pochet

Membre externe : Professeur Hervé Puy, Université de Paris, Faculté de médecine,  
Medical Biochemistry, Molecular Biology

Membre interne : Professeur Pierre Van Antwerpen

## Remerciements

Je tiens à remercier mon promoteur, le Professeur Frédéric Cotton, pour m'avoir fait confiance et m'avoir donné la possibilité de travailler ensemble en 2010. Tu m'as toujours soutenue dans les projets scientifiques. Ta rigueur, ton encadrement et ton esprit critique m'ont permis de m'améliorer chaque jour et de pouvoir réaliser ce projet.

Je remercie également ma co-promotrice, le Professeur Béatrice Gulbis, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de chimie médicale de l'hôpital Erasme, il y a bientôt 10 ans. Cela reste une période « scientifiquement » passionnante dans ma vie.

Merci aux Professeurs Pierre Van Antwerpen et Francis Corazza pour leur présence et leurs précieux conseils tout au long de la réalisation de ce doctorat.

Je remercie tous mes collègues du LHUB-ULB ; technologues, cadres scientifiques et biologistes, pour leur solidarité, leur ouverture d'esprit et leur rigueur. C'est grâce à vous tous que venir travailler reste un plaisir. Spécial merci à David Fage, mon back up direct, pour nos échanges scientifiques et son humour décalé. Merci à Christine Gervy, mon ancienne collègue, pour son soutien et sa bonne humeur permanente. Merci à Nathalie De Vos qui partage mon bureau et avec qui c'est toujours agréable d'échanger nos points de vue. Merci également à Guillaume Deprez pour ses conseils judicieux en spectrométrie de masse et son dévouement total au laboratoire.

Je tiens à remercier le Professeur Christian Mélot pour l'aide dans les analyses statistiques.

Merci au Professeur Yves Mardens pour m'avoir donné la passion de la biologie clinique.

Je remercie les personnes (à l'époque, post-graduées en biologie clinique) qui ont contribué à l'avancée de ce projet : Marie Deleers ainsi que Marie Gentelet.

Je voudrais remercier chaleureusement l'équipe de l'hôpital de jour gériatrique de l'hôpital Erasme ; le docteur Sandra De Debreucker, Julie, Thierry et Zohra pour leur implication dans l'étude sur les sujets âgés, leur soutien et leur gentillesse.

Je remercie également tous les patients ayant participé à ce projet, cela restera une merveilleuse expérience de vie faite de belles rencontres.

Merci à Anne Decocq, Anne Otto, Julie, Carine, Laurence, France et Roxane pour nos soirées et nos fous rires.

Je voudrais enfin remercier ma famille :

Mes parents, pour m'avoir appris à rester travailleuse et déterminée tout en profitant de la vie.

Yann, mon compagnon de toujours, pour son soutien, son altruisme, sa sérénité inébranlable et ses nombreuses explications scientifiques.

Ma fille, Ilya, pour sa joie, son humour et sa volonté de réussir ce qu'elle entreprend.

Ma fille, Erine, mon petit « électron libre », pour sa créativité, sa capacité à ressentir les choses et son ouverture d'esprit.

Mon fils, Charly, pour ses câlins, son amour et son envie de découvertes.

## Liste des abreviations

ABS: albumine bovine sérique

ACD: anémie des maladies chroniques

ACN: acétonitrile

ADN: acide désoxyribonucléique

AF: aide formique

ALAS2: acide 5-aminolévulinique synthase de type 2

ARNm: acide ribonucléique messenger

AUC: aire sous la courbe

BMP: bone morphogenic protein

CIRS: cumulative index rating scale

CKD: chronic kidney disease

CMH: concentration moyenne en hémoglobine

CP: céruloplasmine

CRP: protéine C-réactive

Dcytb: cytochrome B duodenal reductase

DMT1: divalent metal transporter 1

EDTA: éthylène diamine tétraacétate

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

EPO: érythropoïétine

ERFE: érythroferrone

Fe (II): fer ferreux

Fe (III): fer ferrique

FLVCR : récepteur 1 de type feline leukemia virus subgroup

FPN: ferroportine

GDF-15: growth differentiation factor 15

GFR: taux de filtration glomérulaire

Hb: hémoglobine

HCP-1: heme carrier protein-1

HEPH : héphaestine

HH: hémochromatose héréditaire

HIF: hypoxia inducible factor

HJV: hémojuvénile

HLB: balance hydrophile lipophile

HO-1: hème oxygénase de type 1

HP: haptoglobine

HPX: hémopexine

HRE: Hypoxia responsive element

HRG-1: heme responsive gene-1 protein

IC95%: intervalle de confiance à 95%

ID: déficit en fer

IDA: anémie sur déficit en fer

IDA/ACD: anémie combinée

IFN- $\gamma$ : Interféron  $\gamma$

IL-6: interleukine 6

Index sTfR/log ferritine : rapport entre la concentration en récepteur soluble de la transferrine et le logarithme du taux de ferritine

IRE/IRP: iron responsive elements/iron regulatory proteins

IRIDA: iron refractory iron deficiency anemia

ISAR: identification of senior at risk

JAK: janus kinase

KO: knockout

LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LEAP-1: liver expressed antimicrobial peptide

LIP: labile iron pool

LPI: fer plasmatique labile

LPS: Lipopolysaccharides

MALDI TOF MS: matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry

MeOH: méthanol

MMSE: mini mental state examination

MNA: mini nutritional assessment

MRM: multiple reaction mode

MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88

m/z: rapport masse sur nombre de charges

NCOA4: nuclear receptor co-activator 4

NIST: national institute of standards and technology

NTBI: non-transferrin-bound iron

P2.5: percentile 2.5

P97.5: percentile 97.5

PCBPs: poly(rC) binding proteins

PCFT: proton coupled folate transporter

ROC: receiver operator curve

ROS: reactive oxygen species

SC: standard de calibration

SELDI TOF MS: surface enhanced laser desorption time of flight mass spectrometry

SMAD: homologs of both the drosophila protein mothers against decapentaplegic and the C. elegans proteins

STAT: signal transducer and activator of transcription

STDI: standard interne

Steap2: six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2

Steap3: six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3

sTfR : récepteur soluble de la transferrine

SV: standard de validation

TAFO: test d'absorption en fer oral

TFA: acide trifluoroacétique

TfR1: récepteur à la transferrine de type 1

TfR2 : récepteur à la transferrine de type 2

TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$

TIBC: total iron binding capacity

TLR: toll like receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosing factor  $\alpha$

TS: saturation de la transferrine

UA: anémie d'origine inconnue

UIBC: unsaturated iron binding capacity

USF2: upstream stimulatory factor 2

VCM: volume corpusculaire moyen

ZIP14: Zrt-Irt-like protein 14

## Table des matières

1	Introduction .....	11
1.1	Historique de l'hepcidine: .....	11
1.1.1	Découverte.....	11
1.1.2	Rôle dans le métabolisme ferrique .....	11
1.1.3	Mécanismes moléculaires d'action de l'hepcidine.....	12
1.2	Le fer.....	14
1.2.1	Répartition.....	14
1.2.2	Métabolisme .....	14
1.2.2.1	Absorption.....	16
1.2.2.1.1	Fer inorganique .....	16
1.2.2.1.2	Fer héminique.....	18
1.2.2.2	Utilisation par les précurseurs érythroïdes .....	18
1.2.2.3	Stockage. ....	20
1.2.2.4	Recyclage .....	21
1.3	Le système Iron-Regulatory Proteins/Iron Responsive Elements (IRP/IRE) et la régulation du fer cellulaire .....	23
1.4	Hepcidine et rôle dans la régulation systémique du fer.....	24
1.4.1	Synthèse .....	24
1.4.2	Structure.....	24
1.4.3	Mode d'action .....	25
1.4.4	Liaison protéique et comportement rénal.....	26
1.4.5	Variation circadienne.....	27
1.4.6	Production paracrine d'hepcidine.....	28
1.4.7	Régulation de la synthèse .....	28
1.4.7.1	Réserves en fer.....	29
1.4.7.2	Erythropoïèse .....	31
1.4.7.3	Inflammation .....	33
1.4.8	Quantification de l'hepcidine dans divers milieux biologiques.....	34
1.4.8.1	Difficultés rencontrées.....	34
1.4.8.2	Méthodes immunochimiques .....	35
1.4.8.3	Spectrométrie de masse.....	36
1.4.9	Intérêts cliniques de la détermination de l'hepcidine .....	39
1.4.9.1	La carence en fer absolue.....	39
1.4.9.2	L'anémie sur carence en fer réfractaire à l'administration de fer oral .....	41
1.4.9.3	Les anémies combinées.....	43

1.4.9.4	Les hémochromatoses héréditaires.....	45
1.5	Autres paramètres biologiques évaluant le statut ferrique .....	49
1.5.1	Le fer.....	49
1.5.2	La transferrine et le coefficient de la saturation de la transferrine .....	49
1.5.3	La ferritine .....	51
1.5.4	Le récepteur soluble à la transferrine .....	52
1.5.5	La ponction médullaire et coloration au bleu de Prusse.....	54
1.6	L'anémie du sujet âgé.....	55
1.6.1	Définition et prévalence .....	55
1.6.2	Types d'anémie chez le sujet âgé.....	55
2	Objectifs du projet.....	58
2.1	Développement d'une technique de dosage de l'hepcidine sérique et urinaire : aspects pré-analytiques et analytiques .....	58
2.2	Etude des paramètres pré-analytiques et de l'efficacité diagnostique de l'hepcidine urinaire dans l'identification d'une carence martiale .....	58
2.3	Mesure de l'hepcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et étude de sa corrélation avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un test d'absorption en fer oral.....	59
3	Matériel et méthodes.....	60
3.1	Matériel.....	60
3.1.1	Produits et réactifs.....	60
3.1.2	Appareillages.....	60
3.2	Méthodes .....	61
3.2.1	Quantification des paramètres biochimiques et hématologiques.....	61
3.2.2	Développement d'une technique de dosage de l'hepcidine sérique et urinaire : aspects pré-analytiques et analytiques .....	61
3.2.2.1	Etablissement des transitions optimales et des paramètres du spectromètre pour la quantification par MS/MS.....	62
3.2.2.2	Impact de la nature du vial utilisé pour la réalisation des solutions de travail 62	
3.2.2.3	Optimisation de la séparation chromatographique .....	62
3.2.2.4	Procédures d'extraction des échantillons .....	62
3.2.2.5	Validation de la méthode .....	63
3.2.2.6	Population étudiée et échantillonnage .....	64
3.2.2.7	Evaluation des variations de concentrations en hepcidine dans diverses conditions pathologiques.....	65
3.2.2.8	Variables pré-analytiques évaluées.....	65
3.2.2.8.1	Impact du tube primaire.....	65



3.2.2.8.2	Impact du tube de stockage secondaire.....	65
3.2.2.8.3	Impact de la température, de la durée de stockage du tube primaire et de l'aliquot secondaire .....	65
3.2.2.9	Tests statistiques utilisés .....	65
3.2.3	Etude des facteurs pré-analytiques et évaluation de l'efficacité diagnostique de l'hepcidine urinaire dans l'identification d'une carence martiale .....	67
3.2.3.1	Procédure d'extraction des échantillons et quantification de l'hepcidine-25 par spectrométrie de masse .....	67
3.2.3.2	Populations étudiées et échantillonnage .....	68
3.2.3.3	Etude des paramètres pré-analytiques pour l'hepcidine urinaire .....	68
3.2.3.4	Tests statistiques utilisés .....	69
3.2.4	Mesure de l'hepcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et étude de sa corrélation avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un test d'absorption en fer oral.....	70
3.2.4.1	Populations étudiées .....	70
3.2.4.1.1	Volontaires sains avec test d'absorption en fer oral .....	70
3.2.4.1.2	Patients .....	70
3.2.4.1.2.1	Patients avec mesure de l'hepcidine basale .....	71
3.2.4.1.2.2	Patients avec test d'absorption en fer oral.....	71
3.2.4.2	Classification des anémies.....	72
3.2.4.3	Mesure de l'hepcidine .....	73
3.2.4.4	Tests statistiques utilisés .....	74
4	Résultats et discussion .....	75
4.1	Développement d'une technique de dosage de l'hepcidine sérique et urinaire : aspects pré-analytiques et analytiques .....	75
4.1.1	Etablissement des transitions optimales et des paramètres du spectromètre pour la quantification par MS/MS .....	75
4.1.2	Impact de la nature du vial utilisé pour la réalisation des solutions de travail... ..	76
4.1.3	Optimisation de la séparation chromatographique.....	77
4.1.4	Rendement d'extraction.....	78
4.1.5	Validation de la méthode .....	79
4.1.6	Etablissement de l'intervalle de référence .....	80
4.1.7	Paramètres biochimiques et hématologiques associés à l'hepcidinémie .....	81
4.1.8	Calcul du coefficient d'excrétion rénale de l'hepcidine .....	82
4.1.9	Quantification de l'hepcidine dans la carence martiale absolue .....	83
4.1.10	Etude des variables pré-analytiques sur la mesure de l'hepcidine sérique et urinaire .....	83
4.1.10.1	Impact du tube primaire .....	83

4.1.10.2	Impact de l'aliquot secondaire .....	84
4.1.10.3	Impact de la température, de la durée de stockage du tube primaire et de l'aliquot secondaire.....	84
4.1.11	Discussion.....	86
4.2	Etude des paramètres pré-analytiques et évaluation de l'efficacité diagnostique de l'hepcidine urinaire dans l'identification d'une carence martiale .....	93
4.2.1	Résultats de la population étudiée.....	93
4.2.2	Impact de l'ajout d'ABS sur les concentrations urinaires en hepcidine.....	93
4.2.3	Corrélation entre l'hepcidine urinaire et la ferritine .....	96
4.2.4	Evaluation de l'efficacité diagnostique des taux d'hepcidine mesurés sur des échantillonnages différents pour l'identification de la carence martiale absolue .....	97
4.2.5	Aspects pré-analytiques pour la mesure de l'hepcidine urinaire.....	97
4.2.6	Discussion.....	99
4.3	Mesure de l'hepcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et étude de sa corrélation avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un test de surcharge en fer oral.....	103
4.3.1	Temps de prélèvement optimal pour la réalisation du test d'absorption en fer oral	103
4.3.2	Efficacité diagnostique de l'hepcidinémie basale dans le diagnostic différentiel des anémies .....	103
4.3.3	Corrélation entre la valeur d'hepcidinémie basale et l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après de test de surcharge.....	107
4.3.4	Discussion.....	112
5	Discussion générale.....	120
6	Conclusions et perspectives .....	125
7	Bibliographie:.....	127

# 1 Introduction

## 1.1 Historique de l'hepcidine:

### 1.1.1 Découverte

En l'an 2000, un peptide de 25 acides aminés ayant une masse moléculaire de 2789 Daltons est isolé d'un ultrafiltrat de sang humain. Ce peptide, riche en cystéine, présente des caractéristiques structurales particulières lui conférant des propriétés amphipathiques. Il est principalement sécrété au niveau hépatique et montre un effet antimicrobien sur différentes espèces bactériennes. On le nomme, dans un premier temps, LEAP-1 pour Liver Expressed Antimicrobial Peptide (Krause et al. 2000). Peu après, ce peptide est identifié dans de l'urine humaine et rebaptisé hepcidine pour son origine hépatique et ses propriétés antimicrobiennes. Deux isoformes tronqués du côté N-terminal de l'hepcidine-25 sont également isolés au niveau urinaire, il s'agit de l'hepcidine-20 et de l'hepcidine-22, ce dernier étant présent en quantité minoritaire (Park et al. 2001).

### 1.1.2 Rôle dans le métabolisme ferrique

Rapidement, l'hepcidine-25 semble présenter d'autres fonctions qu'un simple effet antimicrobien et, est suspectée de jouer un rôle clef dans le métabolisme ferrique.

Pigeon et al identifient un gène régulé positivement par le fer en travaillant sur un modèle murin présentant une surcharge martiale acquise, induite par l'administration de fer alimentaire. L'acide ribonucléique messager (ARNm), isolé principalement au niveau du foie, code pour une protéine de 83 acides aminés présentant une homologie structurale avec l'hepcidine-25 du côté C-terminal. L'expression hépatique de cet ARNm est évaluée dans d'autres modèles in vivo de surcharge martiale. Alors qu'une élévation des réserves en fer mène à une surexpression de cet ARNm, une réduction présente l'effet inverse (Pigeon et al. 2001).

Pratiquement simultanément et de façon inopinée, Nicolas et al observent chez des souris knockout (KO) pour le gène codant pour l'Upstream Stimulatory Factor 2 (USF2), l'apparition progressive d'une surcharge en fer, affectant principalement le foie ainsi que le pancréas et épargnant le système réticuloendothélial. Ce phénotype particulier, très ressemblant à celui de l'hémochromatose héréditaire humaine, s'explique par l'absence complète du gène codant pour l'hepcidine (Nicolas et al. 2001). Dans une autre étude de la même équipe, la surexpression du gène codant pour l'hepcidine chez des souris transgéniques mène à une carence en fer majeure.

La majorité des mammifères transgéniques décèdent in utéro, ceux qui survivent présentent une pâleur, une perte de poil et une anémie hypochrome microcytaire sévère (Nicolas et al. 2002).

Une anémie chronique, ne répondant pas à l'administration de fer oral, est observée chez des patients atteints de glycogénose de type I. Ceux-ci présentent un adénome hépatique synthétisant des taux élevés d'hepcidine. La baisse de la concentration en hémoglobine se résout après résection de l'adénome (Weinstein et al. 2002).

Le rôle fondamental de l'hepcidine dans le métabolisme ferrique est renforcé par différents travaux menés tout d'abord dans des modèles murins d'hémochromatose héréditaire puis chez l'homme. Dans un modèle de souris KO pour le gène codant pour la protéine HFE, une baisse de l'expression de l'ARNm codant pour l'hepcidine est mise en évidence. En cours de vie, cette expression devient inappropriée pour le degré de surcharge martiale observé (Ahmad et al. 2002). Cette diminution de l'expression hépatique du gène de l'hepcidine est également observée dans des biopsies de patients souffrant d'hémochromatose héréditaire de type I, caractérisée par un défaut de la protéine HFE (Gehrke et al. 2003). Cette dernière pourrait jouer un rôle dans la régulation positive de la transcription de l'hepcidine.

Enfin, la première mutation du gène codant pour l'hepcidine est identifiée dans deux familles présentant un phénotype sévère d'hémochromatose juvénile (Roetto et al. 2003).

A ce moment, les mécanismes moléculaires d'action de l'hepcidine ne sont pas encore connus.

### 1.1.3 Mécanismes moléculaires d'action de l'hepcidine

Plusieurs protéines candidates sont étudiées comme cible potentielle de l'hepcidine, il faudra néanmoins attendre les travaux de Nemeth et al en 2004, pour connaître le mécanisme moléculaire d'action de l'hepcidine (Nemeth et al. 2004). Cette équipe identifie la ferroportine, le seul exportateur de fer connu chez les mammifères, comme étant la cible d'action de l'hepcidine. En se liant à la ferroportine présente à la surface des entérocytes, macrophages, hépatocytes et cellules placentaires (Donovan et al. 2000), l'hepcidine forme un complexe qui est ensuite internalisé et dégradé avec pour conséquence une diminution de l'export du fer cellulaire (Figure 1). La réduction de l'absorption duodénale de fer ainsi que la séquestration du fer d'origine

macrophagique et hépatocytaire engendrent l'apparition rapide d'une baisse du taux de fer sérique. Dans cette même étude, les auteurs mettent en évidence le caractère hautement spécifique de cette interaction, avec absence d'action de l'isoforme 20 de l'hepcidine sur la ferroportine (Nemeth et al. 2004).

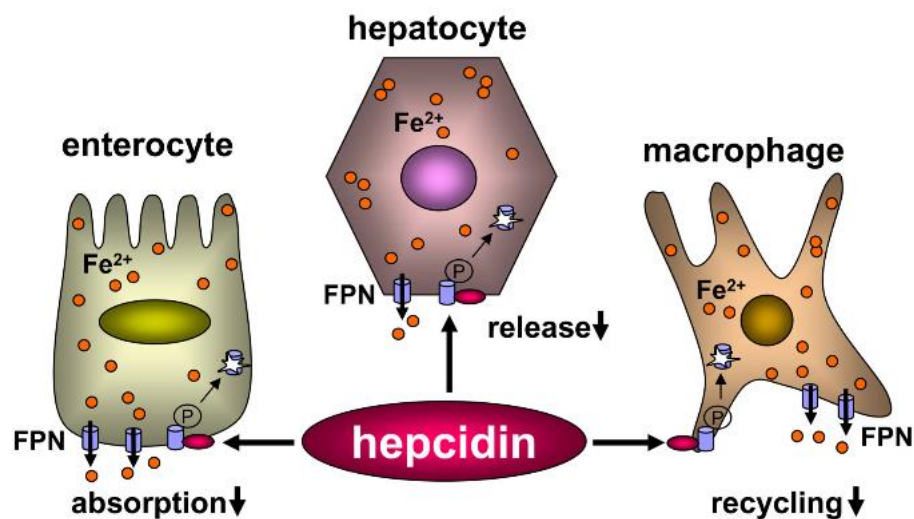


Figure 1 (Cui et al. 2009): L'hepcidine interagit avec la ferroportine (FPN) présente à la surface des entérocytes, hépatocytes et macrophages. Le complexe est internalisé puis dégradé, entraînant une réduction de l'absorption du fer alimentaire ainsi qu'une diminution du relargage du fer hépatocytaire et macrophagique.

## 1.2 Le fer

### 1.2.1 Répartition

Le fer est un élément essentiel ; il participe à de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, jouant à la fois un rôle d'accepteur et de donneur d'électrons. Dans l'organisme humain, cette haute réactivité du fer libre, qui peut être à l'origine d'effets délétères, est maîtrisée par son incorporation dans différentes protéines. Le fer intervient donc dans la constitution de protéines comportant un groupe hème, assurant le transport ou stockage de l'oxygène (hémoglobine et myoglobine) ainsi que dans la composition de nombreuses enzymes et de protéines contenant un groupement fer-soufre. Ces dernières peuvent avoir une localisation cytosolique, nucléaire ou mitochondriale et catalysent des réactions d'oxydoréduction nécessaires à la production d'énergie, à la régulation de l'expression de certains gènes (Pantopoulos et al. 2012). Le fer est également présent dans des protéines de stockage telles que la ferritine ou dans des protéines de transport plasmatique comme la transferrine (Coffey & Ganz 2017). Lorsque les mécanismes de protection de l'organisme vis-à-vis du fer sont saturés, l'excès de fer donne naissance à des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) via la réaction de Fenton et d'Haber-Weiss. Ces ROS altèrent les protéines, les lipides ainsi que l'acide désoxyribonucléique (ADN) et causent des dommages cellulaires dans différents organes (Papanikolaou & Pantopoulos 2005).

Le fer est présent dans l'environnement sous forme oxydée, peu soluble et difficilement assimilable. L'organisme humain a donc évolué pour que ce métal soit conservé et recyclé (Coffey & Ganz 2017). Le corps humain adulte comporte entre 3 et 5 g de fer : environ 60% de ce fer (2,5 g) se présente sous forme héminique dans l'hémoglobine des précurseurs érythroïdes et globules rouges matures. Trente pourcents se retrouvent sous forme de ferritine, la principale forme de stockage du fer, dans les macrophages du système réticulo-endothélial et dans les hépatocytes. Moins de 10% du fer de l'organisme intervient dans la constitution de la myoglobine. La fraction de fer liée à la transferrine, représentant le pool mobile ferrique, ne constitue que 0,1% du fer total (3 mg) (Girelli et al. 2018).

### 1.2.2 Métabolisme

La quantité journalière de fer absorbée au niveau intestinal par un humain avoisine 1 à 2 mg et sert à compenser les faibles pertes dues à la desquamation de l'épiderme,

à l'exfoliation des cellules épithéliales urinaires ou intestinales et aux saignements menstruels. Les besoins en fer journaliers pour maintenir une érythropoïèse efficace sont de l'ordre de 25 à 30 mg ; ils sont principalement assurés par le recyclage macrophagique du fer lors de la phagocytose des érythrocytes vieillissants (Lopez et al. 2016). L'homéostasie du fer est rendue possible via une communication continue entre les cellules qui absorbent le fer (entérocytes), celles qui l'utilisent (érythrocytes) et celles qui interviennent dans son recyclage et stockage (macrophages et hépatocytes) (Figure 2). Jusqu'en 2002, les bases moléculaires des signaux régulant l'homéostasie du fer indépendamment du système transferrine-récepteur de la transferrine et du système Iron Responsive Elements/Iron Regulatory Proteins (IRE/IRP), n'étaient pas connues. La découverte de l'hepcidine a permis d'élucider de nombreux mécanismes impliqués dans le métabolisme ferrique.

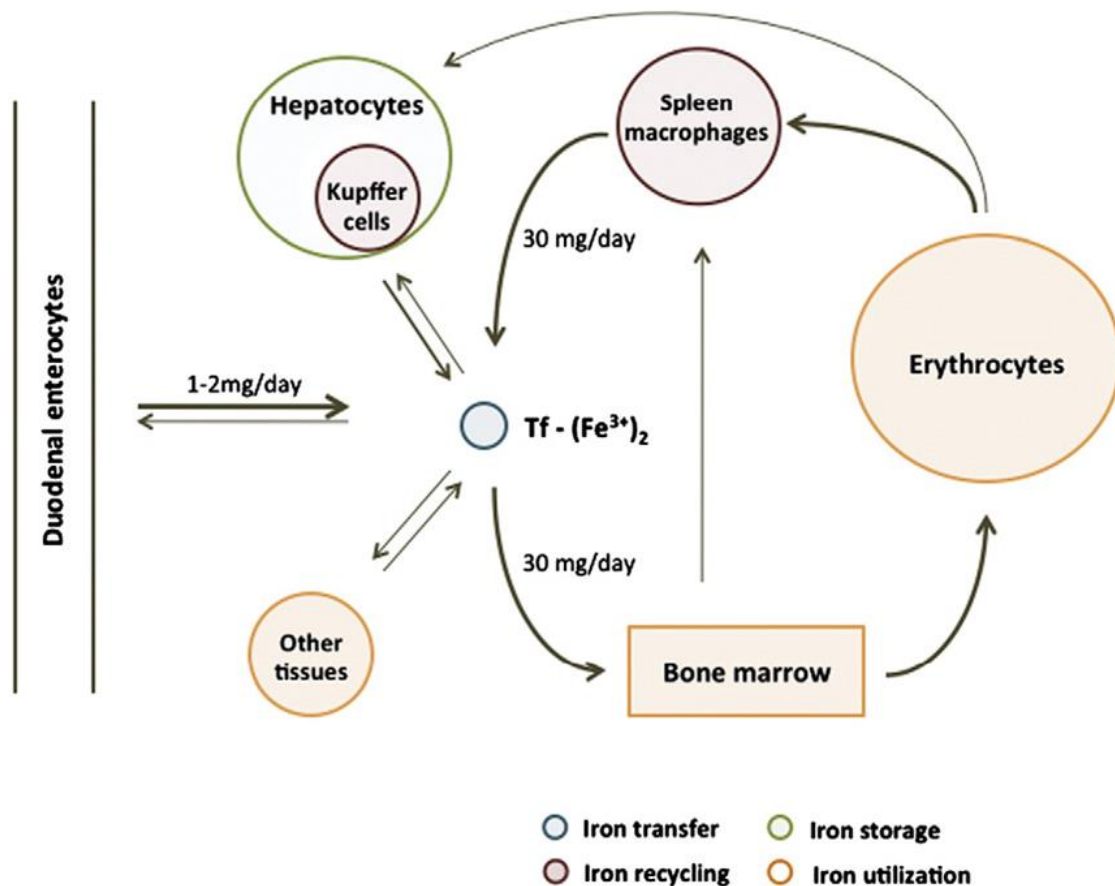


Figure 2 (Gkouvatsos et al. 2012): La quantité de fer absorbée journalièrement par les entérocytes est de 1 à 2 mg et sert à compenser les pertes diverses. Les macrophages, en phagocytant les globules vieillissants, permettent l'obtention de 30 mg de fer ferreux, cette quantité étant requise pour une érythropoïèse optimale.

### 1.2.2.1 Absorption

Le fer alimentaire peut être présent sous forme inorganique et héminique. L'acidité gastrique et l'action de diverses enzymes digestives sont essentielles pour l'absorption du fer inorganique ; elles favorisent le relargage du fer et augmentent la biodisponibilité de ce dernier. L'absorption du fer inorganique est la mieux connue (Ganz 2013).

#### 1.2.2.1.1 Fer inorganique

Le fer inorganique est présent à l'état ferrique Fe(III), une forme peu soluble et par conséquent, peu biodisponible. L'absorption du fer se réalise au niveau de la portion proximale du duodenum ainsi que de la première partie du jéjunum. Elle débute par une réduction en fer ferreux, Fe(II), permise par une ferriréductase appelée Cytochrome B Duodenal Reductase (Dcytb). Cet homodimère comporte deux groupes héminiques et est situé au niveau de la surface externe de la membrane apicale de l'entérocyte. La Dcytb permet le transport d'un électron depuis l'acide ascorbique intracytoplasmique jusqu'au Fe(III), présent au niveau de la lumière intestinale (Wynan et al. 2008). Il semblerait qu'une autre ferriréductase, la Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 2 (Steap2) (Ohgami et al. 2006) soit capable d'assumer ce rôle étant donné que la délétion du gène codant pour la Dcytb dans un modèle murin a peu d'impact sur l'absorption intestinale de fer (Gunshin et al. 2005). Le transport du fer ferreux à travers la membrane apicale de l'entérocyte s'effectue par l'intermédiaire d'un transporteur de cation divalent nommé Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), une protéine de 70 000 Daltons, formée de 10 domaines transmembranaires (Shawki et al. 2012). Les mécanismes de transport du fer intracellulaire dans l'entérocyte ne sont pas encore connus, néanmoins, ils pourraient faire intervenir des protéines chaperones appartenant à la famille des poly(rC) binding proteins (PCBPs). Une fois présent au niveau du cytosol, le Fe(II) pourra être stocké soit sous forme de ferritine, soit être exporté de la membrane basolatérale de l'entérocyte via la ferroportine (Figure 3). Avant d'être incorporé au niveau de la transferrine plasmatique pour pouvoir être distribué aux cellules de l'organisme, le fer ferreux est oxydé en forme ferrique par l'intermédiaire d'une oxydase membranaire, l'héphaestine (Muckenthaler et al. 2017). La saturation de la transferrine (TS) plasmatique chez un individu sain oscille entre 16 et 45% (Camaschella 2017, Brissot et al. 2019).



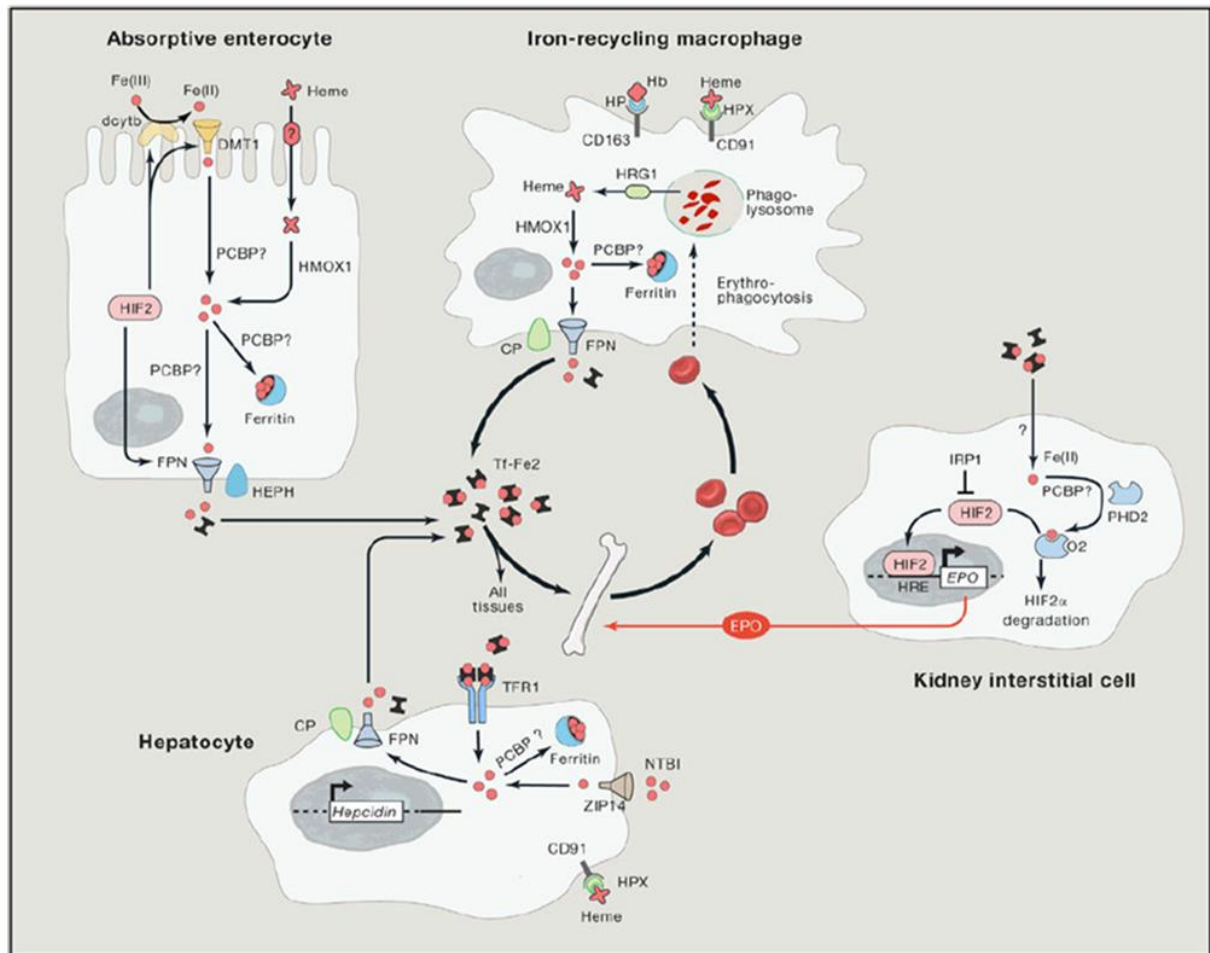


Figure 3 (Muckenthaler et al. 2017): L'homéostasie du fer est rendue possible par une communication continue entre les cellules qui absorbent, stockent et recyclent le fer. Au niveau de la membrane apicale des entérocytes, le fer ferrique est réduit en fer ferreux par la cytochrome B duodénal reductase (Dcytb) avant d'être pris en charge par DMT1. Une fois présent dans le cytosol, le fer ferreux pourrait être incorporé dans la ferritine via une protéine chaperone (PCBP) ou être exporté de la membrane basolatérale via la ferroportine (FPN). Il subit une oxydation permise par l'héphaestine membranaire (HEPH) avant d'être pris en charge par la transferrine plasmatique. L'hépatocyte peut acquérir le fer via différents systèmes de transport. Le récepteur de type 1 à la transferrine (TfR1) permet la liaison de l'holotransferrine. Le fer non lié à la transferrine (NTBI) peut être pris en charge par un transporteur de cation divalent (ZIP14). L'hème lié à l'hémopexine (HPX) est reconnu par le récepteur CD91 présent au niveau de la membrane hépatocytaire et macrophagique. Les globules rouges sénescents sont phagocytés par les macrophages. L'hème, résultant de la dégradation de l'hémoglobine dans l'environnement acide du phagolysosome, est exporté via l'Hème Responsive Gene-1 Protein (HRG1) puis catabolisé par l'hème oxygénase de type 1 (HO-1). Le fer ferreux pourra être stocké sous forme de ferritine ou être exporté via la FPN. Son incorporation à la transferrine nécessite une oxydation permise par la céruloplasmine (CP). Les complexes formés entre l'hémoglobine (Hb) et l'haptoglobine (HP) peuvent être pris en charge par le CD163 présent à la surface du macrophage. Dans les cellules interstitielles rénales, lors d'hypoxie, les hypoxia inducible factors (HIF) forment des hétérodimères pouvant interagir avec un hypoxia responsive element (HRE) présent dans le promoteur du gène codant

pour l'érythropoïétine (EPO) afin de stimuler sa transcription. L'EPO stimule la croissance et la différenciation des progéniteurs érythroïdes.

#### 1.2.2.1.2 Fer héminique

Il existe une autre source de fer alimentaire que le fer inorganique : le fer héminique. Ce dernier représente environ 40% du fer total absorbé au niveau intestinal (Lopez et al. 2016). L'hème est constitué d'un noyau protoporphyrine dans lequel le fer est inséré à l'état Fe(II). Les mécanismes moléculaires d'absorption du fer héminique sont nettement moins connus par rapport au fer inorganique. Le fer héminique pourrait être absorbé à travers la membrane apicale par un mécanisme d'endocytose médié par un récepteur spécifique. L'Heme Carrier Protein-1 (HCP-1) associé au Proton Coupled Folate Transporter (PCFT) semblait être un candidat potentiel pour le transport duodénal de l'hème (Silva & Faustino 2015). Néanmoins, ce dernier interviendrait plutôt dans le transport des folates d'origine alimentaire puisque les individus présentant une mutation de ce transporteur, développent une anémie mégaloblastique suite à une carence en acide folique (Qiu et al. 2006). Après cette liaison à un récepteur encore non identifié, le complexe pourrait être internalisé dans le cytosol où le fer serait libéré sous l'action de l'hème oxygénase de type 1 (HO-1) (Silva & Faustino 2015).

#### 1.2.2.2 Utilisation par les précurseurs érythroïdes

Le fer à l'état III, transporté au niveau plasmatique par la transferrine est délivré aux cellules jeunes érythroïdes nécessitant du fer, exprimant à leur surface le récepteur à la transferrine de type 1 (TfR1) (Figure 4). Le TfR1, glycoprotéine transmembranaire, se présente sous la forme d'un homodimère relié par deux ponts disulfures, capable de lier une molécule d'holotransferrine au niveau de chacune de ses sous-unités. Cette liaison est dépendante de la saturation de la transferrine en fer puisque l'holotransferrine lie le TfR1 avec une affinité nettement supérieure par rapport à l'apotransferrine (Pantopoulos et al. 2012). Après liaison de l'holotransferrine au récepteur TfR1, le complexe est internalisé dans une vacuole endosomale recouverte de clathrine (Gkoutvatsos et al. 2012). L'acidification à pH 5,5 est obtenue sous l'action d'une pompe à protons ATPase, cette réduction de pH induit un changement de conformation de la transferrine, qui reste fixée au TfR1, avec relargage de fer à l'état III. Le complexe apotransferrine/TfR1 est exporté au niveau de la surface érythroïde, par l'intermédiaire de la sortin nexin 3 et du complexe exocyst protein 6 (Muckenthaler et al. 2017). L'apotransferrine, ensuite libérée dans la circulation, est à

nouveau disponible pour un autre cycle de capture du fer et de livraison aux précurseurs érythroïdes. Une ferriréductase présente au niveau de la membrane de la vacuole d'endosome, la Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3 (Steap3) est responsable de la réduction du fer ferrique en fer ferreux (Ohgami et al. 2006). Ce dernier est exporté de l'endosome via DMT1 et constitue un pool de fer labile (LIP : Labile Iron Pool). Le transport du fer cytosolique vers la ferritine ou la mitochondrie n'est pas complètement élucidé mais pourrait faire intervenir les PCBP. Un mécanisme « kiss and run » impliquant un contact entre l'endosome et la membrane mitochondriale est également décrit et permettrait un passage direct du fer ferreux endosomal vers la mitochondrie (Hamdi et al. 2016).

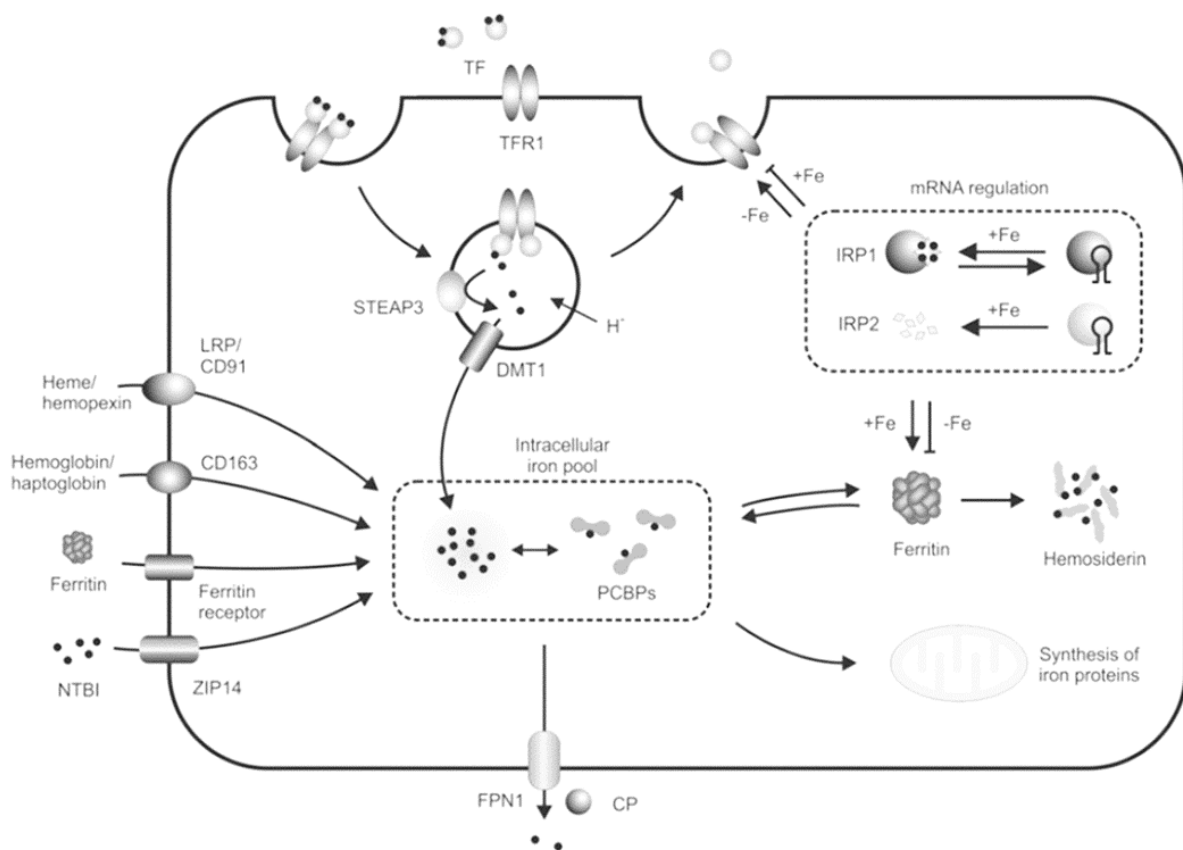


Figure 4 (Anderson & Frazer 2017): La livraison du fer aux cellules de l'organisme peut se réaliser via différents systèmes de transport. Les cellules peuvent acquérir le fer via le récepteur de type 1 à la transferrine (TfR1). Le fer ferrique, après avoir été réduit par une réductase (Steap3) et transporté au niveau du cytosol par DMT1, pourra être stocké sous forme de ferritine ou être utilisé au niveau mitochondrial pour la synthèse de l'hème et des groupements fer-soufre. D'autres systèmes permettent l'entrée du fer au niveau cellulaire, tels que le transporteur de cation divalent ZIP14, le récepteur de la ferritine, le CD163 et CD91.

Le passage du fer au niveau de la membrane interne mitochondriale s'effectue via la mitoferrine 1, ce transport étant facilité par la présence de l'ABCB10, une ATP-binding

cassette qui la stabilise. Le Fe(II) ainsi incorporé dans les mitochondries joue un rôle majeur dans la synthèse de l'hème et des groupements fer-soufre, constituant de nombreuses protéines mitochondriales, cytosoliques et nucléaires. La synthèse de l'hème démarre par une condensation du succinyl coenzyme A avec une glycine, catalysée par l'acide 5-aminolévulinique synthase de type 2 érythroïde (ALAS2) et se termine par l'incorporation du Fe(II) dans le noyau protoporphyrine IX, catalysée par la ferrochelatase (Brissot et al. 2018). Le récepteur 1 de type Feline Leukemia Virus Subgroup de type b (FLVCR1b) est impliqué dans l'export de l'hème des mitochondries vers le cytosol où ce dernier est incorporé dans les chaînes de globines ou d'autres protéines afin de donner naissance respectivement à l'hémoglobine et aux hémoprotéines (Muckenthaler et al. 2017).

#### 1.2.2.3 Stockage.

Le foie est un organe majeur de stockage du fer. Il existe différents systèmes situés au niveau de la membrane hépatocytaire qui interviennent dans son transport.

Le fer lié à la transferrine plasmatique est pris en charge par le TfR1.

Dans les états de surcharges martiales, du fer non lié à la transferrine (NTBI : Non-Transferrin-Bound Iron) apparaît au niveau plasmatique lorsque la concentration en fer dépasse de manière chronique la capacité maximale de liaison de la transferrine (Coffey & Ganz 2017). Le fer ferrique constituant le NTBI serait présent sous une forme complexée à différents anions plasmatiques comme les citrates et les acétates, et sous une forme liée à des protéines, comme l'albumine. L'origine et la nature exactes du NTBI restent néanmoins à déterminer (Brissot et al. 2012). La capture du NTBI plasmatique par les hépatocytes se réalise par l'intermédiaire d'un transporteur de cation divalent Zrt-Irt-like protein 14 (ZIP14) (Liuzzi et al. 2006).

Le fer présent dans le cytosol peut être stocké sous forme de ferritine ou être exporté de l'hépatocyte via la ferroportine. Son incorporation à la transferrine plasmatique requiert une oxydation préalable permise par la céruloplasmine.

L'hème, relargué lors d'hémolyse intravasculaire est pris en charge par l'hémopexine circulante. Ces complexes hème-hémopexine peuvent être transportés à travers la membrane de l'hépatocyte par le récepteur CD91 (Muckenthaler et al. 2017, figure 3).

#### 1.2.2.4 Recyclage

Les macrophages interviennent dans la phagocytose des globules rouges sénescents, le stockage du fer ainsi généré et la redistribution du fer aux précurseurs érythroïdes. La forme majeure des macrophages responsables du processus d'érythrophagocytose sont les cellules de Küpffer, macrophages tissulaires résidant entre les sinusoides hépatiques, et les macrophages spléniques (Coffey & Ganz 2017). Certaines modifications membranaires apparaissent au niveau du globule rouge vieillissant telles que la diminution du contenu en acide sialique, l'expression d'une phosphatidylsérine ainsi que l'altération de la flexibilité (Silva & Faustino 2015). Toutes ces altérations observées en fin de vie des érythrocytes permettent une phagocytose ciblée de ceux-ci par les macrophages. Dans la vacuole de phagocytose macrophagique, l'environnement acide permet la digestion de l'érythrocyte et le relargage de l'hème de l'hémoglobine. L'export de l'hème du phagolysosome vers le cytosol requiert la présence du transporteur d'hème : l'Heme Responsive Gene-1 Protein (HRG1). L'hème, présent au niveau cytosolique est alors catabolisé par l'HO-1 en biliverdine, monoxyde de carbone et fer ferreux (Coffey & Ganz 2017). Le fer ferreux cytosolique pourrait être transporté via les PCBP et est, soit stocké sous forme de ferritine, soit exporté dans la circulation via la ferroportine. Il est ensuite oxydé en fer ferrique par la céruloplasmine avant d'être pris en charge par la transferrine plasmatique.

Le fer séquestré dans la ferritine constitue un pool de fer mobilisable et peut être relargué selon un processus appelé ferritinophagie contribuant à l'homéostasie cellulaire du fer. Lors d'une réduction du contenu en fer cellulaire, la protéine autophagosomale appelée Nuclear Receptor Co-Activator 4 (NCOA4) interagit avec les sous-unités H de la ferritine. Il s'en suit une dégradation lysosomale du complexe NCOA4-ferritine où le pH acide favorise la solubilisation du noyau ferrique permettant la libération du fer (Coffey & Ganz 2017). A l'inverse, lors d'une élévation des réserves en fer cellulaire, la protéine NCOA4 est reconnue par une E3 ubiquitine ligase et est dirigée vers des protéasomes où elle sera dégradée. Ce processus de régulation du fer cellulaire est essentiel dans les macrophages dont le rôle est de recycler et de stocker le fer après phagocytose des globules rouges vieillissants (Camaschella & Pagani 2018).

Lors d'hémolyse, l'hémoglobine et l'hème libérés au niveau plasmatique seront transportés respectivement par l'haptoglobine et l'hémopexine. Les complexes ainsi

formés peuvent se fixer sur le CD163 et le CD91, exprimés à la surface du macrophage (Muckenthaler et al. 2017, figure 3).

### 1.3 Le système Iron-Regulatory Proteins/Iron Responsive Elements (IRP/IRE) et la régulation du fer cellulaire

L'équilibre du contenu en fer cellulaire est maintenu à un niveau post-transcriptionnel. Le système IRE/IRP régule la production d'ARNm codant pour des protéines intervenant dans la captation (TfR1, DMT1), le stockage (sous-unités L et H de la ferritine), l'export du fer (ferroportine) mais également d'autres ARNm codant pour des protéines impliquées dans la synthèse de l'hème (ALAS2) et dans la sensibilité à l'oxygène (HIF2 $\alpha$  : Hypoxia Inducible Factor 2 $\alpha$ ). Les IRP 1 et 2 sont des protéines cytosoliques capables de se lier à des éléments de réponse au fer (IRE) présents au niveau des extrémités 3' ou 5' de régions non traduites d'ARNm codant des protéines impliquées dans l'homéostasie cellulaire ferrique. Selon la liaison du côté 5' ou 3' de l'ARNm, les effets des IRP sur ces ARNm seront différents.

Lors d'une diminution du contenu en fer cellulaire, les IRP1 et 2 se lient à la région 5' de l'ARNm codant pour les sous-unités H et L de la ferritine et à l'ARNm codant pour la ferroportine entraînant une réduction de la synthèse de ferritine, impliquée dans le stockage du fer, ainsi qu'une diminution de la production de ferroportine (Anderson & Frazer 2017). Une suppression de la traduction de l'ARNm codant pour l'ALAS2 et l'HIF-2 $\alpha$  est également engendrée lors de l'interaction entre les IRP1 et 2 et IRE, afin d'éviter la synthèse de protoporphyrine IX en excès. Ces IRP en se fixant à la région 3' non traduite de l'ARNm codant pour le TfR1 et la DMT1, vont soit prévenir la dégradation, soit stimuler l'expression de ces ARNm, favorisant ainsi la capture du fer et son transport cellulaire (Harms & Kaiser 2015).

A l'inverse, lors d'une élévation du contenu en fer cellulaire, la liaison des IRP aux IRE est inhibée ; l'IRP1 acquiert un groupement fer-soufre qui le convertit en une aconitase cytosolique incapable de se lier aux IRE. Quant à l'IRP2, il se dégrade au niveau du protéasome par un processus impliquant une ubiquitination (Muckenthaler et al. 2017). Cette inhibition de la liaison des IRP aux IRE s'accompagne d'une diminution de la captation et du transport du fer, d'une augmentation de sa mise en réserve sous forme de ferritine et d'une élévation de l'export de fer cellulaire.

Les IRP ne régulent pas directement la synthèse d'hepcidine, en effet, l'ARNm codant pour ce peptide est dépourvu d'IRE (Bayele et al. 2006).

## 1.4 Hepcidine et rôle dans la régulation systémique du fer

### 1.4.1 Synthèse

L'hepcidine dérive de la partie C-terminale de la préprohepcidine, un précurseur peptidique de 84 acides aminés, comportant une séquence signal d'adressage au réticulum endoplasmique de 24 acides aminés du côté N-terminal, une prorégion de 35 acides aminés et une région C-terminale correspondant à l'hepcidine-25. Ce précurseur de l'hepcidine est codé par le gène HAMP, présent sur le chromosome 19. Lors de son export du noyau, la préprohepcidine entre dans le réticulum endoplasmique où elle subit un clivage du côté N-terminal catalysé par une protéine de type enterokinase, donnant naissance à la prohepcidine. Cette dernière entre dans l'appareil de Golgi où elle est clivée au niveau d'un motif pentarginyl par des enzymes appartenant à la famille des furine-convertases avec libération de l'hepcidine active, comportant 25 acides aminés (Silva & Faustino 2015). Des modifications post-traductionnelles de l'hepcidine résultent en la production des isoformes 20 et 22, présents en quantité minime dans des conditions physiologiques (Park et al. 2001). Récemment, un autre isoforme de l'hepcidine a été découvert, il s'agit de l'hepcidine 24 (Laarakkers et al. 2013). L'hepcidine-25 est synthétisée majoritairement par le foie (Pigeon et al. 2001).

### 1.4.2 Structure

L'hepcidine est un peptide de 25 acides aminés, présentant une structure particulière en épingle à cheveux avec un feuillet bêta déformé, stabilisé par 4 ponts disulfures : C7-C23, C10-C13, C11-C19 et C14-C22 (Rochette et al. 2015, figure 5). Sa masse moléculaire est de 2.789 Daltons. La structure de ce peptide, particulièrement la partie N-terminale, est hautement conservée d'une espèce à l'autre. Ce phénomène complique les processus d'immunisation animale pour la production d'anticorps (Nemeth et al. 2006). Comme d'autres peptides à action antimicrobienne, il présente une structure amphipathique avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe (Hunter et al. 2002). L'hepcidine est chargée positivement à pH neutre avec un point isoélectrique à 8,2. Elle présente 1 arginine, 2 lysines, 2 histidines et 1 acide aspartique (Abbas et al. 2018). Du côté N-terminal, on retrouve un site correspondant à 3 acides aminés ; l'acide aspartique, la thréonine et l'histidine, capable de lier les métaux. Ce motif particulier, après avoir fixé du cuivre, limite la propension de l'hepcidine à s'agréger suite à une modification conformationnelle (Melino et al. 2006). Ce site pourrait également jouer un rôle dans son activité biologique (Abbas et al. 2018b). La



délétion séquentielle des acides aminés N-terminaux s'accompagne d'une baisse progressive de l'activité biologique de l'hepcidine (Nemeth et al. 2006). En effet, les 7 à 9 acides aminés N-terminaux de l'hepcidine sont critiques pour sa liaison avec la ferroportine et l'internalisation du complexe ainsi formé (Preza et al. 2011). Cette découverte est à l'origine du développement des mini-hepcidines (Rochette et al. 2015). L'utilisation de ces dérivés semble être prometteuse pour réduire la surcharge en fer pancréatique observée dans des modèles de souris KO pour le gène de l'hepcidine. Un traitement combinant l'administration de mini-hepcidines et d'un chélateur en fer, la défériprone, permet également de diminuer la splénomégalie et l'accumulation de fer hépatique dans des modèles murins de bêta-thalassémie. Enfin, des études cliniques sont en cours pour démontrer l'intérêt de l'utilisation de tels dérivés chez les patients avec bêta-thalassémie intermédiaire ou hémochromatose héréditaire (Katsarou & Pantopoulos 2018).

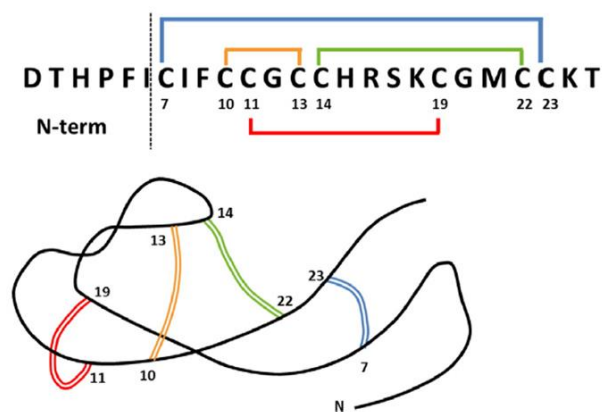


Figure 5 (Rochette et al. 2015): L'hepcidine est un peptide comportant 25 acides aminés. Sa structure compacte est stabilisée par 4 ponts disulfures reliant les acides aminés C7-C23, C10-C13, C 11-C19 et C14-C22.

#### 1.4.3 Mode d'action

L'hepcidine agit par fixation au seul exportateur de fer connu chez les mammifères, la ferroportine (Donovan et al. 2000). Cette protéine comporte 12 segments transmembranaires organisés en deux moitiés comportant 6 hélices reliées par un pont intracytoplasmique (Drakesmith et al. 2015). Ses parties N et C-terminales étant localisées du côté cytoplasmique. L'exportateur de fer est codé par le gène SLC40A1 localisé sur le chromosome 2. L'étude de la structure de la ferroportine suggère la présence de deux lobes séparés par une boucle cytosolique, formant une cavité dans laquelle le fer ferreux peut se loger. Selon la configuration des deux lobes, la cavité fait face soit au domaine intracellulaire, soit au domaine extracellulaire (Muckenthaler

et al. 2017). L'hepcidine se lie à un domaine hautement conservé, situé au niveau d'une des boucles extracellulaires de la ferroportine. Une étude réalisée sur une famille hémochromatosique présentant une résistance à l'action de l'hepcidine, a mis en évidence l'importance de la cystéine en position 326 de la ferroportine dans sa liaison avec l'hepcidine (Sham et al. 2009). En effet, les résidus thiols de cette cystéine forment un pont disulfure avec une des cystéines présentes au niveau de l'hepcidine, stabilisant l'interaction. L'histidine, la phénylalanine et l'isoleucine situées respectivement en position 3, 4 et 6 de la partie N-terminale de l'hepcidine jouent également un rôle majeur dans son interaction avec la ferroportine (Clark et al. 2011).

Les nombreuses lysines présentes au niveau de la boucle extracellulaire de la ferroportine sont ensuite ubiquitinées. Cette ubiquitination est essentielle pour la création de corps multivésiculaires fusionnant par la suite avec des lysosomes afin de permettre la dégradation de la ferroportine (Qiao et al. 2012). Les conséquences de cette interaction entre l'hepcidine et la ferroportine sont une réduction de l'absorption du fer duodénal ainsi qu'une diminution de l'export de fer au niveau hépatocytaire et macrophagique, tous ces phénomènes contribuent à une baisse de la concentration plasmatique en fer.

En plus de ce mécanisme impliquant une dégradation de la ferroportine, l'hepcidine exerce un effet occlusif mécanique sur l'exportateur de fer (Aschemeyer et al. 2018).

#### 1.4.4 Liaison protéique et comportement rénal

In vitro, l'hepcidine se lie avec une haute affinité à l' $\alpha$ 2-macroglobuline. Sa liaison avec l'albumine est, quant à elle, non spécifique et d'affinité moindre. Sur base de ces premiers résultats, la fraction libre de l'hepcidine pouvant circuler au niveau plasmatique chez l'homme est estimée aux environs de 11%. L'hepcidine liée à l' $\alpha$ 2-macroglobuline provoque une diminution plus importante de l'expression de la ferroportine sur des lignées macrophagiques murines par rapport à l'hepcidine libre (Peslova et al. 2009). Ces résultats sont confirmés in vivo chez la souris où l'administration d'hepcidine liée à l' $\alpha$ 2-macroglobuline engendre une réduction des concentrations en fer plasmatique plus importante comparativement à l'hepcidine non liée (Huang et al. 2013). Une des raisons expliquant cette différence d'activité de l'hepcidine libre et liée consiste en une freination de la clairance rénale du complexe, augmentant le temps de demi-vie de l'hepcidine et prolongeant ainsi sa capacité à interagir avec la ferroportine (Peslova et al. 2009). Les résultats obtenus par cette

équipe ont été remis en question par la suite. En effet, les concentrations en hepcidine mises en présence d' $\alpha$ 2-macroglobuline pour évaluer le pourcentage de liaison protéique de ce peptide, n'étaient pas représentatives des taux observés in vivo (Itkonen et al. 2012).

En travaillant sur des séra humains fractionnés par filtration sur gel puis analysés par spectrométrie de masse, l'équipe d'Itkonen et al a démontré que l'hepcidine plasmatique humaine circule principalement sous forme libre, avec moins de 3% liés à l' $\alpha$ 2-macroglobuline et à l'albumine (Itkonen et al. 2012).

Récemment, le taux de liaison protéique de l'hepcidine a été évalué chez des patients atteints de maladie rénale chronique terminale, nécessitant une dialyse péritonéale. Le pourcentage de fixation du peptide aux protéines est estimé sur base d'un calcul impliquant les concentrations sériques en hepcidine et celles mesurées dans le liquide péritonéal. Le taux de liaison est évalué à 40%, avec une dispersion importante des résultats obtenus (Diepeveen et al. 2019).

Comme d'autres peptides de faible masse moléculaire, l'hepcidine est filtrée librement par le glomérule avant d'être réabsorbée via un récepteur mégaline présent au niveau des tubules proximaux (Peters et al. 2013). Les concentrations sériques d'hepcidine corrélaient inversement avec le taux de filtration glomérulaire estimé (Troutt et al. 2013). Une dysfonction tubulaire s'accompagne d'une élévation des taux d'hepcidine urinaire (Peters et al. 2013). Les cellules tubulaires rénales sont capables de produire localement de l'hepcidine (Kulaksiz et al. 2005). Tous ces facteurs rendent l'interprétation des concentrations urinaires d'hepcidine particulièrement complexe (Kroot et al. 2011). A côté de cette clairance rénale, une fraction de l'hepcidine est éliminée par co-dégradation avec la ferroportine à son site d'action (Rochette et al. 2015).

#### 1.4.5 Variation circadienne

L'hepcidine présente une variation circadienne. Les concentrations sériques les plus basses sont observées tôt le matin puis elles augmentent graduellement en cours de journée pour atteindre un pic en début de soirée. Ces taux diminuent progressivement la nuit pour revenir à leur valeur basale en matinée (Kroot et al. 2009, Troutt et al. 2012). Cette production diurne de l'hepcidine observée chez l'humain n'est pas affectée par la prise de nourriture ou lors d'une privation de sommeil (Troutt et al. 2012). Le profil de variation de concentrations de l'hepcidine est similaire lors de la

prise d'un repas pauvre ou enrichi en fer (Schaap et al. 2013). Chez la souris, des régulateurs transcriptionnels reconnaissent des sites situés dans le promoteur du gène codant pour l'hepcidine. Ces facteurs de transcription, dont l'USF1 et l'USF2, régulent l'expression de l'hepcidine par l'intermédiaire d'Eboxes et pourraient être responsables de cette rythmicité de production. En effet, les gènes sous contrôle transcriptionnel par l'intermédiaire d'Eboxes ont tendance à avoir une sécrétion circadienne (Bayele et al. 2006).

#### 1.4.6 Production paracrine d'hepcidine

A côté des hépatocytes, d'autres cellules sont capables de synthétiser l'hepcidine (adipocytes, cellules pariétales, tubules rénaux, macrophages,...) mais en quantité minoritaire. Cette production ne contribue pas aux taux circulants de l'hepcidine mais exerce une action locale (Kroot et al. 2011). Ainsi, une corrélation positive est observée dans les adipocytes, entre l'expression de cytokines pro-inflammatoires et l'ARNm codant pour l'hepcidine. Ces résultats permettent d'expliquer la prévalence plus élevée de déficit en fer lors d'obésité. Au niveau des cellules pariétales de l'estomac, l'hepcidine joue un rôle dans la sécrétion acide et la protection vis-à-vis de la colonisation par *Helicobacter pylori*. Enfin, lors d'invasions bactériennes, la production locale d'hepcidine par les macrophages et les cellules tubulaires distales joue un rôle dans l'immunité innée en limitant la quantité de fer disponible pour les microorganismes par rétention intracellulaire du fer (Daher et al. 2019).

#### 1.4.7 Régulation de la synthèse

Les modèles murins génétiquement modifiés ont permis de comprendre la complexité et l'interconnection des voies impliquées dans la production d'hepcidine. La régulation de la synthèse de ce peptide est transcriptionnelle et se réalise par l'intermédiaire de différents stimuli, soit activateurs, soit inhibiteurs. Alors que la synthèse de l'hepcidine par les hépatocytes est stimulée par l'augmentation des réserves en fer hépatique, l'activation de l'érythropoïèse inhibe la transcription du peptide (Girelli et al. 2016). Par ailleurs, la stimulation de la synthèse de l'hepcidine lors d'inflammation constitue une des causes de développement de l'anémie inflammatoire (Weiss et al. 2019). Une hiérarchie semble exister entre les différents signaux régulant la transcription de l'hepcidine avec un effet dominant négatif de la carence martiale par rapport à l'effet positif d'un syndrome inflammatoire induit par l'injection de lipopolysaccharides (LPS) (Darshan et al. 2010). L'augmentation de l'activité érythropoïétique a également un

effet inhibiteur plus puissant sur la synthèse de l'hepcidine par rapport à l'effet stimulant de l'inflammation (Theurl et al. 2011).

#### 1.4.7.1 Réserves en fer

La production hépatocytaire d'hepcidine est contrôlée majoritairement par la voie impliquant les bone morphogenic proteins (BMP) et les protéines intracellulaires appelées Homologs of both the Drosophila Protein Mothers against Decapentaplegic and the C. Elegans Proteins (SMAD). Cette voie de signalisation BMP-SMAD fait intervenir des récepteurs de deux types agissant chacun sous forme de dimères : les activin receptor-like kinases (BMPRI : Alk2 et Alk3) et les récepteurs de type sérine thréonine kinase (BMPRII : ACVR2A, BMPR2). Les BMP-2 et BMP-6 appartiennent à la superfamille du Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), elles sont sécrétées par les cellules endothéliales hépatiques sinusoïdales par un mécanisme non encore élucidé (Canali et al. 2017). Après dimérisation par formation de ponts disulfures, les BMP-2 et BMP-6 interagissent avec leurs récepteurs respectifs. On distingue deux voies différentes dans la signalisation BMP-SMAD.

Dans la première voie, BMP-2 est responsable de la transcription basale de l'hepcidine. Elle interagit avec un récepteur BMPRI (Alk3) et un récepteur BMPRII. L'hémojuvénile (HJV), le récepteur de type 2 à la transferrine (TfR2) et la protéine HFE sont fonctionnellement reliés à Alk3 et contribuent à la production basale d'hepcidine via la voie BMP-SMAD. L'HJV est une protéine insérée dans la membrane de l'hépatocyte dont la partie C-terminale interagit avec la néogénine (Silvestri et al. 2019).

La seconde voie est activée par BMP-6. Lorsque les réserves hépatiques en fer augmentent, la production de BMP-6 est fortement stimulée. Cette dernière active la transcription de l'hepcidine alors que la synthèse de BMP-2 est seulement légèrement augmentée (Camaschella & Pagani 2018). BMP-6 se lie principalement à Alk2 et un récepteur BMPRII. Une protéine cytosolique appelée immunophiline FKBP12, lie Alk2 pour limiter l'activation de cette voie en l'absence de ligand. En cas d'augmentation des réserves en fer tissulaire, FKBP12 est déplacée et la transcription de l'hepcidine, stimulée (Silvestri et al. 2019).

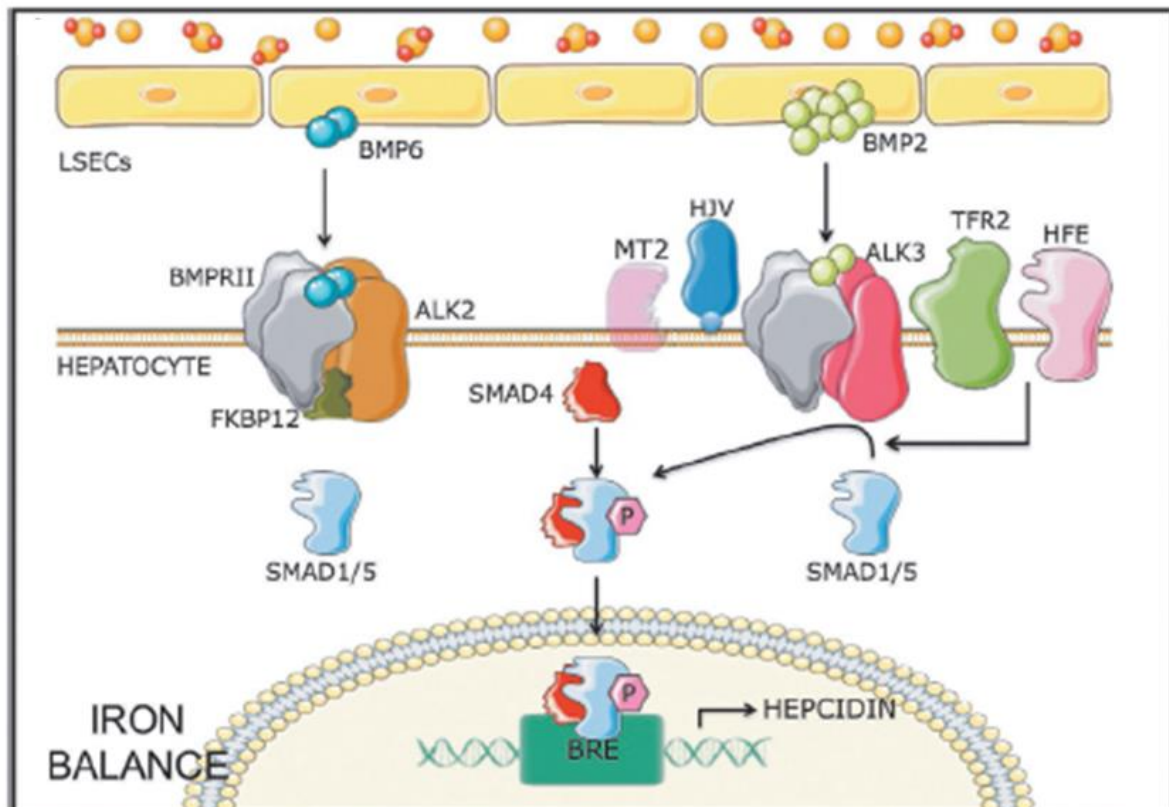


Figure 6 (Silvestri et al. 2019): Dans des conditions physiologiques, la transcription basale de l'hépcidine est assurée par l'interaction de BMP-2 avec son récepteur Alk3, présent au niveau de la membrane hépatocytaire et relié fonctionnellement à HJV, Tfr2 et HFE. Après phosphorylations successives, le complexe SMAD1/5/4 migre dans le noyau pour interagir avec l'élément de réponse BMP et activer la transcription du peptide.

Après cette interaction entre BMP-2 et Alk3 ou BMP-6 et Alk2, une phosphorylation des protéines intracellulaires SMAD1/5 survient. Le groupe activé SMAD1/5 interagit avec SMAD4 et le complexe migre dans le noyau pour se lier à 2 éléments de réponse BMP (BMP-RE1 et BMP-RE2), situés au niveau du promoteur du gène codant pour l'hépcidine. Cette liaison s'accompagne d'une augmentation de la transcription de l'ARNm de l'hépcidine (Muckenthaler et al. 2017).

Lors de diminution des réserves en fer tissulaire, la transcription du gène *TMPRSS6* est activée, avec traduction en matriptase 2 (Du et al. 2008, Folgueras et al. 2008). Cette sérine protéase transmembranaire est synthétisée sous forme de proenzyme et devient active après clivage autocatalytique. La matriptase 2 est capable de cliver l'HJV (Figure 7). Le clivage de ce co-récepteur de BMPRI altère l'activation de la voie BMP-SMAD avec diminution de la cascade de phosphorylation, et par conséquent, réduction de la transcription de l'hépcidine (Silvestri et al. 2008). Des mutations du gène codant pour la matriptase 2 sont décrites chez l'humain et sont responsables du

développement d'une anémie hypochrome microcytaire, réfractaire au traitement par le fer oral (Iron Refractory Iron Deficiency Anemia : IRIDA). Des taux anormalement élevés d'hepcidine sérique sont observés chez ces patients, témoignant du rôle essentiel de la matriptase 2 dans la régulation négative de la transcription de l'hepcidine.

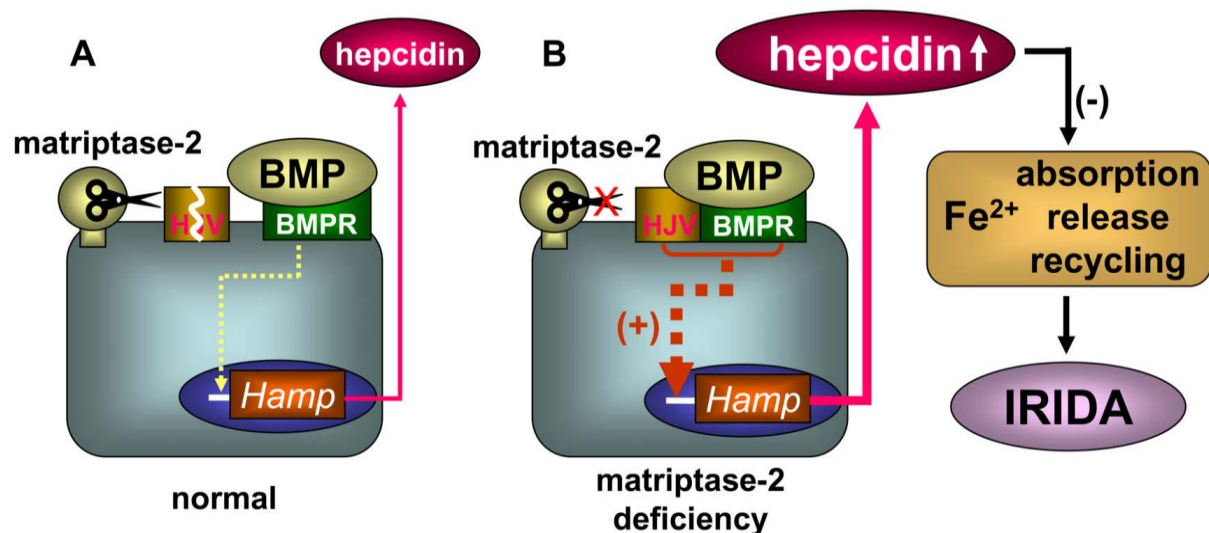


Figure 7 (Cui et al. 2009): Lors de carence en fer (A), la matriptase 2 clive l'HJV pour donner naissance à une forme soluble d'HJV. L'activation de la voie BMP-SMAD est inhibée avec réduction de la transcription de l'hepcidine. Des taux anormalement élevés d'hepcidine sont mis en évidence pour les patients IRIDA (B) suite à une mutation du gène codant pour la matriptase 2.

#### 1.4.7.2 Erythropoïèse

L'activation de l'érythropoïèse induite par phlébotomies répétées et par hémolyse aiguë provoque une réduction de la transcription de l'hepcidine dans un modèle murin (Nicolas et al. 2002b). Chez l'homme, la stimulation de l'érythropoïèse induite par une saignée ou l'administration d'érythropoïétine (EPO), s'accompagne d'une diminution rapide de l'hepcidinémie, favorisant de cette manière l'absorption de fer duodénal et la libération du fer macrophagique et hépatocytaire (Ashby et al. 2010). L'érythropoïétine ne semble pas avoir un effet direct sur la répression de la synthèse d'hepcidine. Alors que l'administration d'EPO chez les souris s'accompagne d'une suppression de la transcription de l'ARNm codant pour l'hepcidine, cet effet est aboli pour ces mêmes souris rendues aplasiques par administration d'inhibiteurs de l'érythropoïèse (Pak et al. 2006). Le régulateur erythropoïétique de l'hepcidine semblerait être un facteur circulant relargué par les précurseurs érythroïdes en réponse à l'EPO.

Le Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) appartient à la superfamille du TGF- $\beta$  et est relargué à un stade tardif de la différenciation érythroblastique. Le GDF-15 a été proposé comme suppresseur potentiel de la synthèse d'hepcidine. Néanmoins, les souris KO pour le gène codant pour GDF15, présentent le même profil de suppression de transcription de l'hepcidine par rapport aux souris sauvages, après phlébotomies (Casanovas et al. 2013). De plus, l'injection d'EPO chez l'humain ne semble pas s'accompagner d'une modification significative des taux plasmatiques de GDF-15 (Ashby et al. 2010). Ces résultats remettent donc en cause le rôle joué par ce facteur dans la régulation érythropoïétique de l'hepcidine.

En 2014, l'équipe de Kautz et al, en travaillant sur des souris phlébotomisées ou recevant de l'érythropoïétine, identifie une protéine sécrétée précocement par les érythroblastes différenciés, en tant qu'inhibiteur de la transcription de l'hepcidine. Cette protéine, reliée à la famille du C1q tumor necrosing factor, est baptisée erythroferrone (ERFE) pour son origine et son implication potentielle dans le métabolisme ferrique. La transcription de l'ARNm codant pour ERFE est rapidement stimulée chez des souris sauvages après saignées ou administration d'EPO. L'absence de répression de la synthèse d'hepcidine chez des souris phlébotomisées, KO pour le gène codant pour l'ERFE, conforte le rôle joué par cette protéine dans la régulation érythropoïétique de l'hepcidine (Kautz et al. 2014). Les souris KO pour ERFE ont, à la naissance, des paramètres hématologiques similaires aux souris sauvages. L'ERFE ne serait donc pas un acteur majeur de l'érythropoïèse en conditions physiologiques mais jouerait un rôle manifeste lors de stress érythropoïétique (Kautz 2014b).

Lors de stimulation érythropoïétique, la synthèse rénale d'EPO est augmentée. L'EPO interagit avec des récepteurs présents au niveau des précurseurs érythroïdes de la moëlle et de la rate. Cette liaison s'accompagne d'une activation de la Janus Kinase de type 2 (JAK2) et d'une phosphorylation du Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) à l'origine de la production d'érythroferrone. Celle-ci est relarguée au niveau plasmatique et réprime la synthèse d'hepcidine par un mécanisme dépendant de la voie BMP, non complètement élucidé (Ganz 2018).

L'érythroferrone est la molécule clef ayant permis de faire le lien entre la synthèse des globules rouges et l'apport en fer requis pour une érythropoïèse optimale (Camaschella & Pagani 2018).



Chez les patients atteints de bêta-thalassémie ou d'érythropoïèse inefficace, les taux d'hepcidinémie sont anormalement bas pour le degré de surcharge martiale observé (Papanikolaou et al. 2005b). Dans un modèle de souris bêta-thalassémique intermédiaire, des taux élevés d'ARNm codant pour ERFE sont observés au niveau médullaire et splénique. Lorsque le gène codant pour ERFE est supprimé dans ce modèle, les souris KO présentent une normalisation des taux plasmatiques d'hepcidine avec une réduction de la surcharge en fer hépatique (Kautz et al. 2014).

D'autres régulateurs encore non identifiés pourraient intervenir dans la régulation de la transcription de l'hepcidine lors de l'activation de l'érythropoïèse (Vallet 2018).

#### 1.4.7.3 Inflammation

Lors d'un processus inflammatoire, différentes cytokines sont relarguées dans la circulation sanguine. Les LPS interagissent avec le Toll Like Receptor de type 4 (TLR4) au niveau macrophagique pour stimuler la production d'interleukine-6 (IL-6), d'IL-1 $\beta$  (Silvestri et al. 2019). L'IL-6 joue un rôle essentiel dans la stimulation de la transcription de l'hepcidine. L'implication de l'IL-6 est démontrée dans des cultures cellulaires, des modèles expérimentaux animaux et humains (Nemeth et al. 2004b). Cette cytokine interagit avec le récepteur IL-6 présent à la surface de l'hépatocyte. Il y a alors activation de JAK2 et phosphorylation de STAT3. Ce dernier migre dans le noyau et stimule la synthèse de l'hepcidine par fixation à un site spécifique STAT présent au niveau du promoteur du gène (Wang & Babitt 2016).

Une collaboration étroite est requise entre les voies JAK2-STAT3 et BMP-SMAD pour une activation complète de la transcription d'hepcidine lors de phénomènes inflammatoires (Silvestri et al. 2019). La dorsomorphine, inhibiteur sélectif de la voie de phosphorylation BMP/SMAD bloque la transcription du peptide induite par l'IL-6 (Yu et al. 2008). Les souris KO pour SMAD4 ne présentent plus d'augmentation de l'ARNm de l'hepcidine lorsqu'elles sont soumises à l'IL-6 (Wang et al. 2005).

Enfin, la protéine myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), activée lors de l'interaction des LPS avec les TLR4 au niveau hépatocytaire, pourrait stabiliser SMAD4 et réguler positivement la voie BMP-SMAD (Silvestri et al. 2019, figure 8).

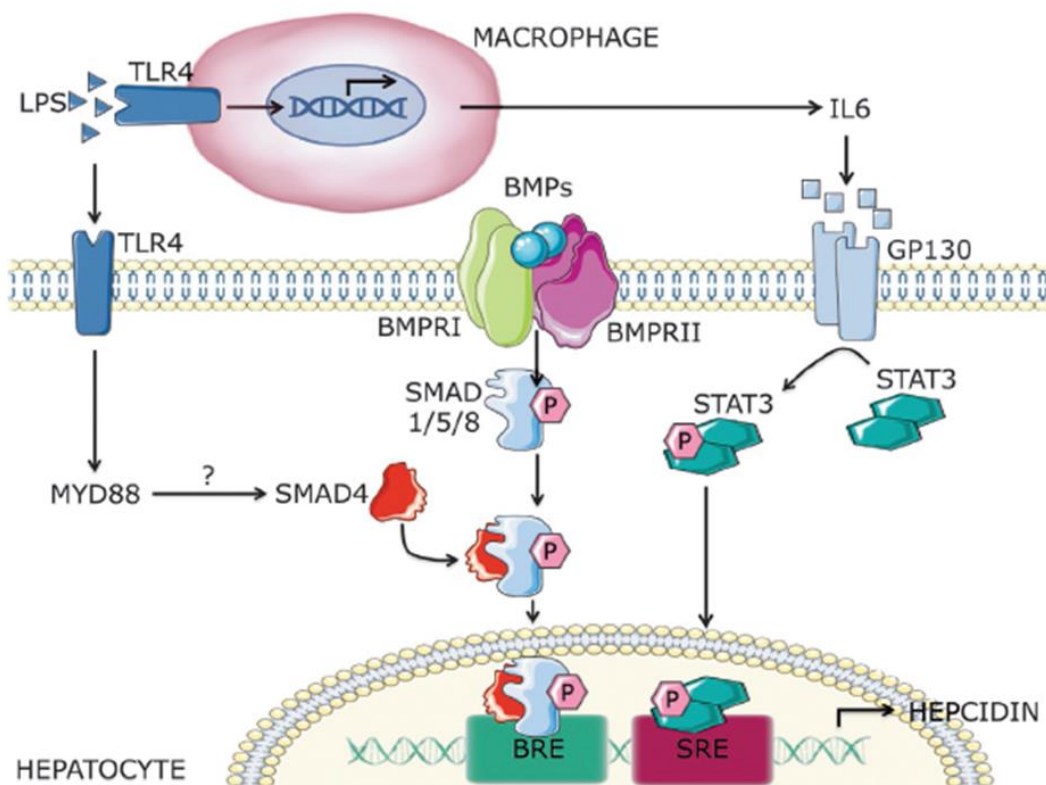


Figure 8 (Silvestri et al. 2019): Lors d'un processus inflammatoire, l'interleukine-6 (IL6) interagit avec son récepteur présent au niveau de la membrane hépatocytaire. Il s'en suit une phosphorylation de STAT3, migrant au niveau du noyau pour stimuler la transcription de l'hepcidine. Les lipopolysaccharides (LPS) se lient au Toll Like Receptor 4 (TLR4), présent au niveau de la membrane hépatocytaire, pour activer la protéine MyD88. Cette dernière pourrait stabiliser SMAD4 et amplifier la voie BMP-SMAD.

#### 1.4.8 Quantification de l'hepcidine dans divers milieux biologiques

##### 1.4.8.1 Difficultés rencontrées

La quantification de l'hepcidine reste problématique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la production d'anticorps pour la réalisation de tests immunochimiques est un processus laborieux. La structure de l'hepcidine, hautement conservée d'une espèce à l'autre, complique les procédures d'immunisation d'animaux pour la génération d'anticorps (Nemeth et al. 2006). L'hepcidine présente également une structure compacte en épingle à cheveux, stabilisée par 4 ponts disulfures, avec un accès limité aux différents épitopes. Les isoformes 20, 22 et 24 de l'hepcidine, modifiés du côté N-terminal, peuvent interférer dans les tests immunochimiques et provoquer des réactions croisées qui sont à l'origine d'inexactitude (Laarakkers et al. 2013, Kroot et al. 2011). A l'heure actuelle, il n'existe aucun test commercial immunologique sélectif pour l'isoforme 25 de l'hepcidine (Abbas et al. 2018).

L'hepcidine, de par sa structure amphipathique, présente des problèmes d'agrégation, observés surtout dans les environnements pauvres en protéines (Hunter et al. 2002).

Ce peptide présente également la capacité d'adhérer fortement aux matériaux en plastique. Ces effets sont responsables d'un faible rendement de récupération pour les procédures d'extraction ainsi que d'une variabilité pré-analytique importante excédant la variabilité intra et inter-sujet pour des milieux appauvris en protéines comme l'urine (Kroot et al. 2009). Finalement, aucune méthode ni aucun matériel de référence n'est défini à l'heure actuelle, ceci pouvant expliquer la grande disparité des résultats obtenus entre les laboratoires (Kroot et al. 2009b, Kroot et al. 2012). Concernant ce dernier point, de nombreux efforts sont actuellement mis en place pour l'harmonisation de la quantification de l'hepcidine par l'identification d'un matériel de référence secondaire (van der Vorm et al. 2016).

Parmi les techniques décrites dans la littérature, on distingue deux types de méthodes permettant la quantification de l'hepcidine humaine sérique ou urinaire : les méthodes immunologiques et celles associant la spectrométrie de masse.

#### 1.4.8.2 Méthodes immunochimiques

La première technique développée pour le dosage de l'hepcidine humaine était un immunodot réalisé sur urine. Après extraction de l'hepcidine urinaire par chromatographie échangeuse cationique, cette dernière était semi-quantifiée à l'aide d'anticorps de lapin anti-hepcidine. L'utilisation de ce test laborieux a permis de démontrer le rôle essentiel joué par ce peptide dans l'anémie inflammatoire (Nemeth et al. 2004b). En 2004, un immunoessai permettant la quantification du précurseur sérique de l'hepcidine, la prohepcidine, est développé (Kulaksiz et al. 2004). L'absence de corrélation entre la concentration sérique de la prohepcidine et de l'hepcidine d'une part, et l'absence de corrélation entre la concentration sérique de prohepcidine et l'absorption de fer marqué au niveau duodénal d'autre part, remettent en question l'utilité du dosage du précurseur (Young et al. 2009). Un test compétitif de type Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), utilisant les mêmes anticorps de lapin anti-hepcidine que l'immunodot et de l'hepcidine biotinylée comme compétiteur est développé pour le dosage de l'hepcidine sérique ; les valeurs obtenues étant corrélées aux diverses situations cliniques pouvant modifier la transcription de l'hepcidine (Ganz et al. 2008). Une méthode radioimmunologique compétitive utilisant une plaque recouverte d'anticorps de chèvre anti-lapin mise en contact avec des anticorps

polyclonaux de lapin anti-hepcidine est ensuite décrite par l'équipe de Grebenchtchikov avec une excellente limite de quantification (Grebenchtchikov et al. 2009). Un autre test ELISA compétitif, moins sensible que la technique radioimmunologique, utilisant des anticorps polyclonaux et de l'hepcidine recombinante comme compétiteur est développé (Koliaraki et al. 2009). Le principal défaut de ces tests immunologiques réside dans la mesure de l'ensemble des isoformes de l'hepcidine, avec surestimation globale des résultats par rapport à des techniques plus spécifiques associant la spectrométrie de masse (Kroot et al. 2009b).

En 2010, une méthode ELISA de type sandwich plus spécifique, par utilisation d'anticorps monoclonaux voit le jour. Le premier anticorps dirigé contre les 7 acides aminés N-terminaux de l'hepcidine est biotinylé permettant sa fixation à la streptavidine fixée au support solide. Le second anticorps de lapin anti-hepcidine est marqué au ruthénium, sa fixation avec l'hepcidine étant mesurée par chemiluminescence (Butterfield et al. 2010). Dans cette méthodologie, les réactions croisées avec les isoformes de l'hepcidine non impliqués dans le métabolisme ferrique, semblent être minimisées avec des résultats corrélés à ceux obtenus par chromatographie liquide liée à la spectrométrie de masse. Néanmoins, la seconde étude internationale « Round Robin » évaluant les résultats d'hepcidine quantifiés par différentes méthodes analytiques a mis en évidence une disparité importante entre les taux mesurés par cette technique et ceux obtenus via les méthodologies associant la spectrométrie de masse (Kroot et al. 2012).

#### 1.4.8.3 Spectrométrie de masse

Les premières méthodes quantifiant l'hepcidine sérique et urinaire à l'aide d'un spectromètre de masse étaient semi-quantitatives avec la surface enhanced laser desorption time of flight mass spectrometry (SELDI TOF MS) (Tomosugi et al. 2006) et la matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI TOF MS). La première méthode MALDI TOF MS décrite présentait l'inconvénient d'être peu reproductible suite à la fluctuation du laser, à l'effet matrice impactant la qualité de l'ionisation de l'échantillon et enfin, à la variabilité du volume d'échantillon déposé pour l'analyse. Elle a été améliorée par la suite et est devenue quantitative par l'utilisation d'hepcidine 25 marquée comme standard interne (Anderson et al. 2011). Une des techniques SELDI TOF MS a également été développée avec de l'hepcidine 24 synthétique comme standard interne (Kroot et al. 2010). Le recours à ce standard interne a été néanmoins critiqué, compte tenu de sa possible présence dans les

échantillons biologiques (Konz et al. 2014). Un des avantages de ces techniques réside dans la possibilité d'identifier et de quantifier les différents isoformes de l'hepcidine.

Les techniques associant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) sont des méthodes d'analyse physico-chimique très spécifiques et sensibles pour la mesure de l'isoforme actif de l'hepcidine. La spectrométrie de masse en tandem permet la séparation de molécules, préalablement ionisées, selon leur rapport masse sur nombre de charges ( $m/z$ ). La quantification des molécules d'intérêt est rendue possible en comparant l'abondance relative des transitions sélectionnées par rapport à un calibrateur de concentration définie. La source est l'élément du spectromètre de masse permettant la pulvérisation, l'ionisation des analytes d'intérêt et l'évaporation du solvant. Dans le cadre d'une ionisation par électronébulisation, l'échantillon, issu de la séparation par chromatographie liquide, est acheminé dans un capillaire au niveau duquel est appliquée une différence de potentiel. Suite aux répulsions coulombiennes entre les charges ainsi générées, l'échantillon sera pulvérisé en fines gouttelettes. Ces dernières seront ensuite évaporées à l'aide d'un gaz neutre. Les ions générés vont être focalisés avant d'entrer dans le premier quadripôle. Chaque quadripôle comporte quatre électrodes, situées parallèlement 2 à 2 et de potentiels différents, permettant la génération d'un champ électrique nécessaire à la sélection des ions d'intérêt. Seuls les ions ayant une trajectoire dite stable pourront traverser le quadripôle. Après fragmentation des ions parents dans une cellule de collision, les ions filles produits pourront être sélectionnés dans le deuxième quadripôle afin d'être détectés.

L'utilisation du quadripôle peut se réaliser selon un mode «scan» qui permet le passage de l'ensemble des ions générés à travers le quadripôle, ou selon un mode «statique», réglé pour sélectionner la traversée d'un ou de plusieurs ions (Menet 2011).

Le choix du standard interne sera primordial pour les techniques utilisant la spectrométrie de masse ; le standard interne optimal étant la molécule à doser présentant des isotopes lourds. Certaines méthodes utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, ont parfois été dépréciées pour le choix du standard interne, structurellement très différent de l'hepcidine 25 (Murphy et al.

2007). Ces techniques ont été progressivement améliorées par l'introduction d'un standard interne marqué par isotopes.

Les techniques d'extraction utilisées pour la purification de l'échantillon incluent la précipitation par l'acide trifluoroacétique (Murao et al. 2007, Vialaret et al. 2018), l'ultrafiltration (Kobold et al. 2008), l'utilisation de microbilles magnétiques de type échangeuses cationiques faibles (Bansal et al. 2009, Bansal et al. 2010, Hwang et al. 2011) et enfin, la séparation en phase solide de type balance hydrophile/lipophile (HLB) (Li et al. 2009, Houbart et al 2011, Itkonen et al. 2012b) ou de type échangeuse ionique (Lefebvre et al. 2015).

#### 1.4.9 Intérêts cliniques de la détermination de l'hepcidine

##### 1.4.9.1 La carence en fer absolue

La carence en fer absolue (ID : Iron deficiency) liée à une réduction des réserves ferriques est un problème fréquent dans la population, avec une prévalence estimée de 9% et 15,7% chez les jeunes enfants de moins de 2 ans et les femmes en âge de procréer, respectivement (Lopez et al. 2016). L'ID peut être causée par des apports en fer insuffisants (régime particulier de type végétarien ou végétane), une élévation des besoins en fer (croissance, grossesse), une malabsorption digestive (liée à des procédures chirurgicales bariatriques, des maladies inflammatoires intestinales ou la prise de certains médicaments) et des pertes accentuées lors de saignements chroniques (Camaschella 2015). La mise en évidence d'un déficit en fer en l'absence d'une maladie chronique est aisée et repose sur la mesure de la ferritine (Harms & Kaiser 2015). Les taux d'hepcidine sont bas, voire indétectables lors de déficit acquis en fer, ceci permettant une stimulation de l'absorption duodénale de fer et un relargage du fer hépatocytaire et macrophagique (Ganz et al. 2008). Les études ayant évalué l'intérêt d'une supplémentation en fer lors d'ID isolée, sans réduction de la concentration en hémoglobine, montrent une élévation des taux de ferritine sérique et une augmentation de l'hémoglobine, associées à une diminution de la sensation de fatigue (Camaschella 2019).

La carence en fer peut avoir un impact négatif sur l'érythropoïèse avec apparition d'une anémie hypochrome microcytaire (IDA : Iron Deficiency Anemia). Environ 1/3 de la population mondiale souffre d'anémie dont la moitié des cas serait expliquée par un déficit martial. Les signes (pâleur cutanée et des conjonctives) ainsi que les symptômes (fatigue, maux de tête, tachycardie,...) observés dépendront de la sévérité, de la rapidité d'installation de l'anémie, de l'âge et des comorbidités éventuellement présentes (Lopez et al. 2016). Lors d'IDA, la détermination de l'hepcidinémie ne présente pas de valeur ajoutée par rapport à la mesure de la ferritine, excepté lors de suspicion d'IRIDA : une cause génétique rare de carence en fer décrite dans le paragraphe 1.4.8.2. (Camaschella & Pagani 2018).

La supplémentation en fer repose sur deux stratégies : la prévention de la carence martiale dans les populations à risque (enfants de moins de 5 ans, femmes enceintes, femmes allaitant) et le traitement de l'IDA. Concernant ce dernier point, la thérapie se base sur une supplémentation en fer par la voie la mieux appropriée et sur la recherche

ainsi que la correction de la cause associée. Le but final du traitement n'est pas seulement de normaliser le taux d'hémoglobine mais également de remplir les réserves en fer tissulaire avec une cible pour la concentration en ferritine supérieure à 100 µg/L (Girelli et al. 2018). La durée d'une supplémentation en fer oral est de 3 mois minimum (Goddard et al. 2011).

Les traitements per os sont utilisés en première ligne; ils sont généralement efficaces et peu coûteux. Les formulations orales sont utilisées pour le traitement de l'IDA légère à modérée et reposent sur l'administration de gluconate, fumarate, ou sulfate ferreux associé éventuellement à l'acide ascorbique. L'efficacité de ces formes orales semble équivalente. La posologie classique consiste en l'administration de 65 mg de fer ferreux, deux à trois fois par jour. Une étude de Moretti et al remet en question ce schéma d'administration classique. Cette équipe a évalué l'absorption de fer marqué aux isotopes chez des jeunes femmes présentant une carence martiale. Une absorption plus efficace du fer per os, associée à des effets indésirables digestifs moindres, est atteinte en administrant des doses de fer ferreux plus faibles et, surtout en alternant les jours de supplémentation. En effet, le fer administré stimule la transcription de l'hepcidine avec pour conséquence une élévation de l'hepcidinémie, 24 heures après la première prise. L'augmentation des taux sériques du peptide s'accompagne d'une dégradation accrue de la ferroportine duodénale avec blocage de l'absorption des doses futures administrées (Moretti et al. 2015).

Dans le cadre d'une absorption optimale des formes per os, une élévation du taux d'hémoglobine peut être déjà visible après 2 semaines de traitement. Une réponse optimale lors de supplémentation en fer oral est généralement définie comme une augmentation de la concentration en hémoglobine supérieure à 2 g/dL après 3 semaines de traitement (Girelli et al. 2018).

Le choix d'une forme parentérale se réalise lors d'absence de réponse au fer oral, lors de pathologies associées à un phénomène de malabsorption, lors d'un souhait de correction rapide d'une anémie sévère. Il existe plusieurs formes parentérales disponibles en Belgique : dextran ferrique (de faible poids moléculaire), carboxymaltose et saccharose ferrique. Les formes dextran ferrique de haut poids moléculaire ne sont plus recommandées vu le risque de réactions anaphylactiques. La forme carboxymaltose constitue un traitement de choix. Cette dernière comporte un noyau avec un sel ferrique entouré d'une coque carbohydrate. La cinétique de



relargage du fer à partir du complexe définit la quantité de fer totale pouvant être administrée par dose (Lopez et al. 2016).

#### 1.4.9.2 L'anémie sur carence en fer réfractaire à l'administration de fer oral

Deux équipes ont démontré le rôle essentiel joué par le gène *TMPRSS6*, situé sur le chromosome 22 et codant pour la matriptase 2, dans la régulation de la transcription de l'hepcidine (Du et al. 2008, Folgueras et al. 2008).

Les souris KO pour *TMPRSS6* présentent une anémie hypochrome microcytaire avec carence martiale ainsi qu'un accroissement de l'expression hépatique de l'ARNm du gène codant pour l'hepcidine par rapport aux souris contrôles (Folgueras et al. 2008). Ce rôle essentiel, joué par la matriptase 2 dans le métabolisme ferrique, est rapidement confirmé par l'équipe de Du et al mettant en évidence un défaut d'absorption duodénale de fer marqué chez des souris *Mask*, présentant un déficit fonctionnel en matriptase 2 (Du et al. 2008).

La matriptase 2 est une sérine protéase transmembranaire d'expression principalement hépatique (Finberg et al. 2008). Elle possède une partie N-terminale courte intracytoplasmique, un domaine transmembranaire, une région centrale contenant des domaines modulaires et un domaine catalytique C-terminal. La matriptase 2 est synthétisée sous forme de proenzyme et s'active par autoclivage au niveau d'un résidu arginine. Elle régule négativement la transcription de l'hepcidine via la voie BMP-SMAD (Finberg et al. 2010). L'hémojuvénile membranaire est identifiée comme étant un substrat de la matriptase 2 (Silvestri et al. 2008). En clivant l'HJV, la matriptase 2 affaiblit la voie de signalisation BMP-SMAD, cet effet réduit la transcription de l'hepcidine ce qui favorise l'absorption de fer duodéal.

Les patients présentant un déficit d'activité de la matriptase 2 développent un syndrome IRIDA, une cause génétique rare d'anémie ferriprive (Finberg et al. 2008). La prévalence de l'IRIDA est évaluée comme étant inférieure à 1/1.000.000 mais pourrait être sous-estimée (Poggiali et al. 2015). Ce syndrome est initialement décrit comme étant transmis selon un mode autosomique récessif, nécessitant 2 variants alléliques. Cependant, son mode de transmission semble plus complexe. En effet, certains patients présentant un seul variant allélique peuvent être affectés phénotypiquement, leur expression phénotypique étant plus légère comparativement aux patients bi-alléliques (Donker et al. 2016). Des études d'association du génome humain montrent également que certains polymorphismes du gène *TMPRSS6* sont

associés à des taux plus bas d'hémoglobine, de TS et de volume corpusculaire moyen (Benyamin et al. 2009).

Cette pathologie est caractérisée par l'apparition d'une anémie hypochrome microcytaire se développant en période post-natale avec nette diminution du fer sérique et de la TS (Finberg et al. 2008). Les valeurs de ferritine sont le plus souvent basses ou normales ; certains cas avec concentration en ferritine augmentée sont néanmoins décrits. Les valeurs d'hepcidine sérique sont anormalement élevées pour le degré de carence martiale avec blocage de l'absorption de fer alimentaire et du relargage de fer macrophagique. La majorité des patients IRIDA ne répondent pas à l'administration de fer oral. L'absence de réponse est définie comme une augmentation du taux d'hémoglobine inférieure à 1 g/dL après 4-6 semaines de traitement per os (Bhatia et al. 2017). Ils nécessiteront des apports parentéraux en fer pour une amélioration lente de leurs paramètres hématologiques. Certains cas rares décrits semblent néanmoins répondre à l'administration de fer oral. Le rapport de la saturation de la transferrine sur l'hepcidine (%/nmol/L) semble être un marqueur prometteur pour le diagnostic des patients IRIDA, même après que ceux-ci aient initié une thérapie de supplémentation en fer parentéral (Donker et al. 2016).

Le syndrome IRIDA est caractérisé par une forte variabilité génotypique et phénotypique. Plus d'une soixantaine de mutations sont décrites chez les patients (Donker et al. 2016). La plupart d'entre elles sont localisées dans le domaine extracellulaire de la protéine avec absence d'autoactivation de la matriptase 2. Dans de rares cas, des mutations sont décrites dans la région intracytoplasmique ou transmembranaire (De Falco et al. 2014). Les patients IRIDA sont identifiés durant l'enfance, certains peuvent être cependant diagnostiqués à l'âge adulte, soit parce que l'anémie est modérée soit parce que la cause de l'anémie a été mal définie. L'âge au moment du diagnostic, la sévérité de la pathologie ainsi que la réponse à la supplémentation en fer peuvent être très différents pour un même génotype (Donker et al. 2016). Cette variabilité du phénotype pourrait être influencée par des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux comme l'inflammation chronique ou les pertes sanguines (Nai et al. 2010). Avant d'évoquer un syndrome IRIDA, il est nécessaire d'exclure les autres causes d'absence de réponse au traitement oral en fer comme l'incompliance, l'infection à *Helicobacter pylori*, la maladie coeliaque ou la gastrite atrophique (Bhatia et al. 2017).

#### 1.4.9.3 Les anémies combinées

L'intervention de l'hepcidine dans le développement de l'anémie inflammatoire est suggérée, pour la première fois, dans des modèles expérimentaux animaux, où l'injection de LPS (Pigeon et al. 2001) ou de turpentine (Nicolas et al. 2002b) s'accompagne d'une réduction du taux sérique en fer. Cette baisse de concentration en fer sérique est observée dans les heures qui suivent l'injection et, est associée à une élévation des taux hépatiques d'ARNm codant pour HAMP. Le rôle de l'hepcidine dans l'anémie de l'inflammation est confirmé chez l'humain où l'administration d'IL-6 s'accompagne d'une augmentation rapide des taux urinaires d'hepcidine avec développement d'une baisse de la concentration en fer sérique en parallèle (Nemeth et al. 2004b).

L'anémie liée à des maladies chroniques (ACD : Anemia of Chronic Disease) s'observe dans les pathologies inflammatoires chroniques, les maladies autoimmunes et phénomènes néoplasiques, elle se rencontre également dans les maladies rénales chroniques (CKD : Chronic Kidney Disease), l'insuffisance cardiaque et l'obésité. Au niveau mondial, elle représente la seconde cause la plus fréquente d'anémie (Wang & Babitt 2016). Sa physiopathologie peut s'expliquer par différents mécanismes.

Le premier est la perturbation du métabolisme ferrique induite par diverses cytokines avec séquestration du fer macrophagique. Ce phénomène, dépendant ou indépendant de la production d'hepcidine, joue un rôle essentiel dans le développement de l'anémie inflammatoire puisque 90% des besoins en fer journaliers sont assurés par le recyclage du fer érythrocytaire par les macrophages. L'IL-6 stimule la transcription de l'hepcidine avec réduction de l'expression de la ferroportine au niveau macrophagique (Nemeth 2004b). D'autres cytokines comme l'IL-1, l'IL-10 et le Tumor Necrosing Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) favorisent l'acquisition directe de fer par les macrophages via une endocytose médiée par les récepteurs à la transferrine. Elles peuvent également stimuler la synthèse de protéines qui vont séquestrer le fer comme la lactoferrine (Weiss et al. 2019). Les LPS en se liant aux TLR-4, diminuent la transcription de la ferroportine et réduisent l'export de fer macrophagique (Muckenthaler et al. 2017).

Le deuxième mécanisme est la suppression de l'érythropoïèse par l'inflammation. La production d'EPO par les cellules rénales est altérée suite à la génération de radicaux libres. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  inhibent la transcription de l'EPO activée par l'hypoxie. Consécutivement à la séquestration de fer macrophagique et l'altération de la

production ainsi que de l'action de l'EPO, la prolifération des cellules érythroïdes est perturbée.

Le troisième mécanisme est la réduction de la survie des globules rouges. L'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produit, inhibe la différenciation des progéniteurs érythroïdes et stimulent l'érythrophagocytose par les macrophages spléniques et hépatiques.

La chute de l'hémoglobine, observée lors de sepsis ou de pathologies accompagnées d'un relargage important de cytokines pro-inflammatoires, est observée rapidement dans les heures qui suivent le début de l'infection. Cette rapidité d'installation de l'anémie peut être reliée au phénomène d'hémodilution (Weiss et al. 2019).

Un déficit en fer peut aggraver une anémie inflammatoire, on parlera alors d'anémie combinée (IDA/ACD). La mise en évidence d'une carence martiale chez un patient anémique présentant une maladie chronique est essentielle pour sa prise en charge. Une supplémentation en fer pourra être initiée lors de déficit. A l'inverse, l'administration de suppléments ferreux chez un individu non carencé pourra potentiellement avoir des effets délétères (Theurl et al. 2009, Chua et al. 2013).

Alors que la mise en évidence d'une carence martiale isolée est aisée et repose sur la mesure de la ferritine. L'identification d'un déficit en fer lors d'une maladie chronique est plus compliquée. Les marqueurs biochimiques classiques tels que la ferritine et la TS présentent une efficacité diagnostique limitée dans l'identification des anémies combinées (Rimon et al. 2002). La ferritine est une protéine de phase aiguë dont les taux s'élèvent en présence d'un syndrome inflammatoire. La TS voit ses valeurs diminuées lors d'IDA, d'ACD et d'IDA/ACD (Joosten 2018). La ponction médullaire avec coloration au bleu de Prusse, est considérée comme le gold standard pour identifier une carence en fer lors d'un syndrome inflammatoire concomittant. En l'absence de gold standard non invasif pour la mise en évidence d'une carence martiale lors d'ACD, l'identification de l'étiologie d'une anémie repose sur l'utilisation d'algorithmes compliqués avec des valeurs seuils pouvant être différentes d'une étude à l'autre (Weiss & Goodnough 2005). L'évolution des marqueurs biochimiques lors d'IDA, d'ACD et d'anémie combinée est décrite dans le tableau 1.

Tableau 1 (Polin et al. 2013) : Evolution de la concentration en fer, transferrine, saturation de la transferrine, ferritine, récepteurs solubles ainsi que du rapport entre la concentration en récepteurs solubles de la transferrine et le logarithme de la ferritine.

	Anaemia of chronic disease			Iron deficiency anaemia	Both conditions
	Chronic infection	Cancer	Inflammatory disease		
Iron level	Reduced	Reduced	Reduced	Reduced	Reduced
Transferrin	Reduced or normal	Reduced or normal	Reduced or normal	Increased	Reduced
Transferrin saturation	Reduced	Reduced	Reduced	Reduced	Reduced
Ferritin (ng/ml)	>30	>30	>30	<30	<100
Soluble transferrin receptor	Normal	Normal	Normal	Increased	Normal or increased
Ratio of soluble transferrin receptor/log ferritin	<1	<1	<1	>2	>2

L'hepcidine est un marqueur potentiel pour l'identification d'un déficit en fer en présence d'une maladie chronique. Alors que la carence martiale réprime la transcription de l'hepcidine (Ganz et al. 2008), la libération de cytokines proinflammatoires lors d'ACD entraîne l'effet inverse. L'utilité de l'hepcidine dans cette application clinique est rapportée dans diverses populations (Theurl et al. 2009) notamment pour les patients avec arthrite rhumatoïde (van Santen et al. 2011) et avec pathologie intestinale inflammatoire chronique (Bergamashi et al. 2013). Certains auteurs ont démontré que l'hepcidinémie était capable de différencier l'ACD de l'IDA/ACD (Theurl et al. 2009), d'autres qu'elle permettait de discriminer l'IDA de l'IDA/ACD (Thomas et al. 2011). La différence entre les résultats obtenus par ces études peut être expliquée par la stratification des patients, les algorithmes, les seuils décisionnels utilisés ainsi que les méthodes sélectionnées pour la quantification du peptide (Kroot et al. 2011).

#### 1.4.9.4 Les hémochromatoses héréditaires

Les hémochromatoses héréditaires (HH) sont définies comme des surcharges en fer d'origine génétique, suite à une incapacité de l'organisme à réguler positivement la transcription de l'hepcidine (HH type I, IIa, IIb et III), suite à une perte de fonction d'export de la ferroportine (maladie de la ferroportine) ou suite à une résistance de cette dernière à l'action de l'hepcidine (HH associée à la ferroportine). Elles se caractérisent par un degré différent d'inactivation de l'hepcidine et de surcharge martiale (Brissot et al. 2018). Elles sont transmises selon un mode autosomique récessif, excepté la maladie de la ferroportine et l'HH associée à la ferroportine, transmises selon un mode autosomique dominant.

Les HH caractérisées par une altération de la production de l'hepcidine (type I, IIa, IIb et III), ou de sa capacité à réguler la ferroportine (HH associée à la ferroportine) s'accompagnent d'une augmentation de l'absorption de fer alimentaire par les

entérocytes avec élévation de la TS (Figure 9). Lorsque cette dernière excède 45%, du NTBI apparaît au niveau plasmatique (Brissot et al. 2012). Ce dernier est capté préférentiellement par les cellules parenchymateuses de l'organisme. Au-delà d'une TS de 75%, une forme particulière de fer hautement réactif apparaît ; le fer plasmatique labile (LPI : Labile Plasma Iron) et peut être à l'origine de dommages cellulaires au niveau hépatique, pancréatique et splénique suite à la génération d'espèces ROS (Garbowski et al. 2016). Les modifications des paramètres biochimiques tels que la TS et la ferritine précèdent les atteintes organiques diverses qui pourront se manifester sous forme de fatigue chronique, diabète, douleurs articulaires, hypogonadisme, troubles hépatiques évoluant de la fibrose vers la cirrhose et finalement, le carcinome hépatocellulaire (Brissot et al. 2017).

La maladie de la ferroportine est liée à une perte de la fonction d'export de la ferroportine au niveau des macrophages du système réticuloendothélial avec un phénotype plus modéré comparativement aux autres HH. En effet, l'origine de cette pathologie est une rétention du fer macrophagique et non plus, une hyperabsorption de fer alimentaire (Figure 9). La surcharge en fer atteindra préférentiellement la rate ainsi que les cellules de Küpffer, les cellules parenchymateuses hépatiques étant épargnées. L'expression phénotypique de la maladie de la ferroportine est généralement peu sévère mais peut être modulée par des facteurs environnementaux et génétiques. Biochimiquement, cette pathologie est caractérisée par une TS basse avec une ferritine élevée (Pietrangelo 2017).

L'HH de type I représente environ 90% de l'ensemble des hémochromatoses héréditaires avec une prévalence élevée dans la population caucasienne d'Europe du nord. Cette pathologie est liée à un défaut d'expression d'HFE (Feder et al. 1996). La présence de la mutation C282Y à l'état homozygote explique la majeure partie des cas d'HH de type I. Le remplacement d'une cystéine par une tyrosine en position 282 d'HFE interrompt la formation d'un pont disulfure indispensable pour sa liaison avec la  $\beta$ 2-microglobuline (Feder et al. 1997). Il s'en suit une accélération de la dégradation intracellulaire de la protéine HFE, celle-ci devenant incapable de s'exprimer à la surface cellulaire. La régulation positive de la transcription d'hépcidine via la voie de signalisation BMP-SMAD est altérée avec développement d'une hypohepcidinémie. Six pourcents de la population caucasienne est porteuse de la mutation à l'état hétérozygote (European Association for the study of liver 2010). D'autres mutations sont décrites pour le gène codant pour la protéine HFE ; la mutation S65C est

cliniquement non significative. La mutation H63D est un polymorphisme qui, à l'état homozygote ou hétérozygote composite avec C282Y, peut être associée à une surcharge en fer en présence de facteurs environnementaux précipitants comme l'alcoolisme ou le syndrome métabolique (Porto et al. 2016). Les manifestations cliniques liées à l'HH de type I surviennent généralement chez les hommes après 40 ans et chez la femme ménopausée. La pénétrance de l'HH type 1 est faible et, est estimée à 13,5% pour les patients homozygotes C282Y. L'expression phénotypique est impactée par la consommation chronique d'alcool, les pertes menstruelles, les apports en fer alimentaire et certains polymorphismes génétiques (Brissot et al. 2017).

Les HH n'affectant pas le gène codant pour la protéine HFE représentent moins de 10% des hémochromatoses héréditaires, avec une large distribution géographique. Ce groupe inclut les hémochromatoses juvéniles se caractérisant par un défaut d'HJV (HH type IIa) (Papanikolaou et al. 2004) ou de l'hepcidine (HH type IIb) (Roetto et al. 2003), l'HH de type III, liée à des mutations du gène codant pour le récepteur de type 2 à la transferrine (Camaschella et al. 2000) et l'HH associée à la ferroportine suite à une mutation gain de fonction de la ferroportine (Montosi et al. 2001). Les hémochromatoses juvéniles se caractérisent par des surcharges en fer massives induisant des manifestations cliniques sévères avant la troisième décennie. L'hémochromatose de type III et l'HH associée à FPN sont caractérisées par un phénotype plus modéré bien que des cas cliniques de mutations combinées d'HFE et de TfR2 aient été décrits avec une expression phénotypique similaire à celle des hémochromatoses juvéniles (Pietrangelo et al. 2005).

Le dosage de l'hepcidine, exprimé sous forme de ratio hepcidine/ferritine, est évoqué par certains auteurs dans la sélection des gènes à investiguer lors de suspicion d'HH, en combinaison de la présentation clinique et des résultats d'imagerie (Swinkels et al. 2006). Des taux d'hepcidine bas, inappropriés au regard du degré de surcharge martiale, sont décrits chez des patients présentant une HH de type IIa (Papanikolaou et al. 2004), une HH de type IIb (Matthes et al. 2004) ou une HH de type III (Nemeth et al. 2005). A l'inverse, des taux normaux ou élevés d'hepcidine sont rapportés chez les patients atteints de la maladie de la ferroportine et l'HH associée à la ferroportine. Néanmoins, l'absence de matériau de référence pour le dosage de l'hepcidine, les progrès des techniques d'imagerie telle que la résonance magnétique nucléaire ainsi que la nouvelle technique de criblage « large » en biologie moléculaire pour les HH type non HFE, limite l'utilité clinique de ce marqueur dans cette indication.

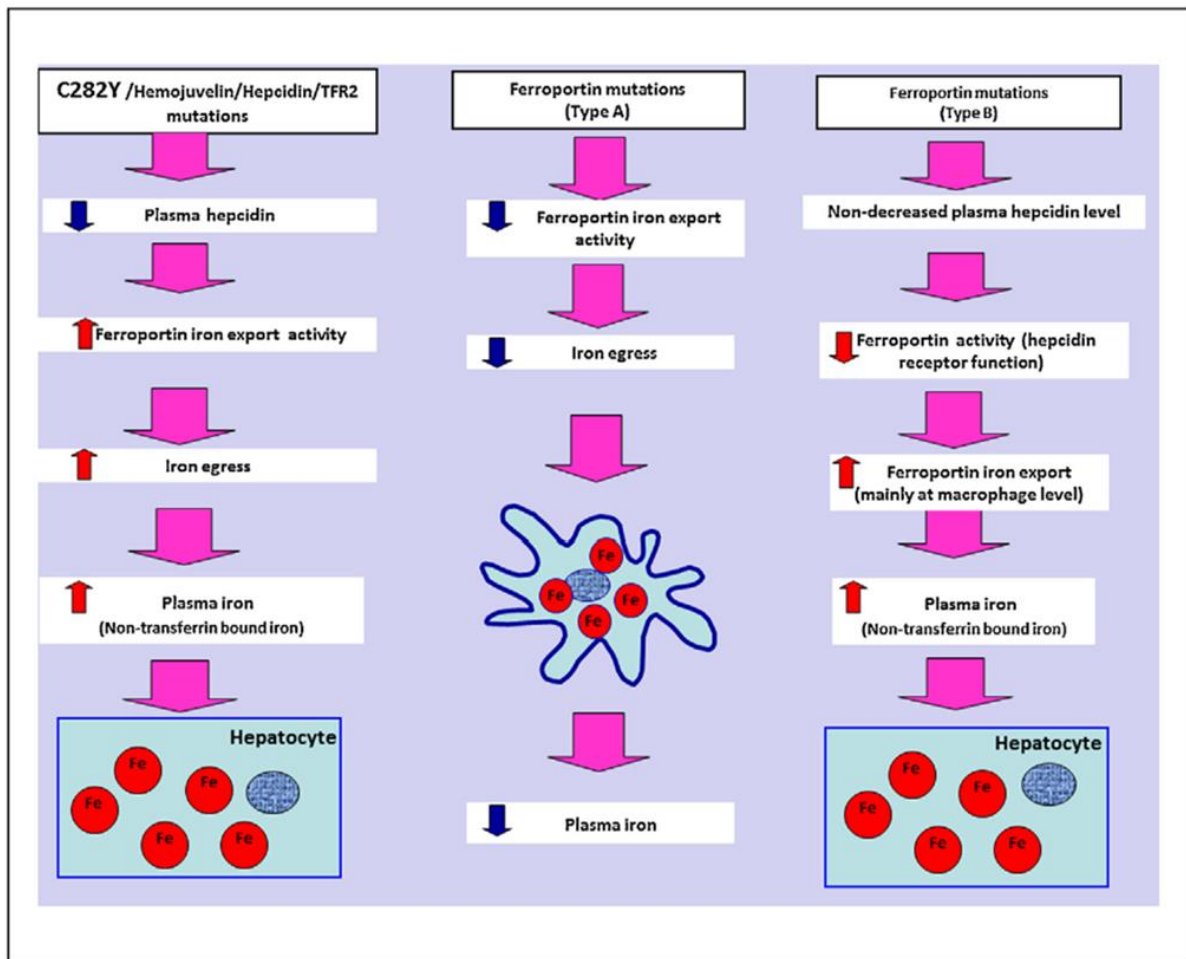


Figure 9 (Brissot et al. 2017): Les hémochromatoses de type I, IIa/b, III et associée à la ferroportine (type B) s'accompagnent d'une augmentation de l'absorption de fer par voie duodénale avec apparition de fer non lié à la transferrine au niveau plasmatique. La maladie de la ferroportine (type A) est caractérisée par une perte de la fonction d'export de la ferroportine avec accumulation de fer macrophagique.



## 1.5 Autres paramètres biologiques évaluant le statut ferrique

L'interprétation du statut ferrique combine plusieurs paramètres biologiques.

### 1.5.1 Le fer

La mesure isolée du fer plasmatique, ne présente pas beaucoup d'intérêt dans l'évaluation du métabolisme ferrique, compte tenu de sa variation biologique intra-individuelle importante (26,5%) et de sa variation diurne (Ricós et al. 1999). Sa mesure intervient néanmoins dans le calcul de la saturation de la transferrine, cette dernière étant complémentaire au dosage de la ferritine dans l'investigation des désordres du métabolisme martial. Le dosage du fer plasmatique se réalise par une technique colorimétrique faisant intervenir la ferrozine, un chromogène permettant la formation d'un complexe coloré suivie à une longueur d'onde définie. Ce test est standardisé par rapport à un matériel international de référence NIST (National Institute of Standards and Technology) : le SRM 937.

### 1.5.2 La transferrine et le coefficient de la saturation de la transferrine

La transferrine est une glycoprotéine de 80.000 Daltons principalement sécrétée par les hépatocytes. Cette bêta-globuline homodimérique possède une chaîne polypeptidique avec deux sites de liaison réversible pour le fer ferrique. Cette liaison permet le transport du fer et sa livraison aux cellules en nécessitant. Elle maintient le Fe(III) sous une forme soluble et inerte au niveau des réactions d'oxydo-réduction, prévenant ainsi la formation de radicaux libres. La transferrine est une protéine de phase aiguë négative. La saturation de la transferrine plasmatique représente le pourcentage de sites de liaison présents sur toutes les molécules de transferrine et occupés par le fer. Le degré de TS est impacté par la quantité de fer alimentaire absorbée, la quantité de fer utilisée par les précurseurs érythroïdes pour la synthèse de l'hème et, enfin, la quantité de fer relarguée par les macrophages lors du recyclage du fer héminique (Gkouvatsos et al. 2012). La TS représente la quantité de fer disponible pour l'érythropoïèse, une valeur inférieure à 16% est généralement utilisée pour mettre en évidence une carence martiale (Camaschella 2017). La liaison du fer sur la transferrine induit un changement conformationnel de cette dernière et est pH dépendante. La transferrine présente un temps de demi-vie de 8 jours, son élimination se réalisant au niveau hépatique par dégradation lysosomiale (Pantopoulos et al. 2012).

Au laboratoire, il y a plusieurs façons de calculer la TS ; l'une indirecte, estimant la capacité totale de fixation du fer par les molécules de transferrine (TIBC : Total Iron Binding Capacity) ou la capacité de fixation du fer sur les sites de liaison non occupés des molécules de transferrine (UIBC : Unsaturated Iron Binding Capacity), et l'autre, basée sur la mesure directe de la transferrine. L'évaluation de la TIBC se réalise en ajoutant une solution de concentration connue en fer ferreux. Le fer en excès non lié est ensuite mesuré. La différence entre le fer total ajouté et le fer en excès fournit une estimation de l'UIBC. La somme de l'UIBC et du fer sérique total permet d'obtenir la TIBC (Pfeiffer et al. 2017, figure 10). La concentration en transferrine plasmatique est quantifiée au laboratoire via une technique immunoturbidimétrique, calibrée par rapport à la préparation de référence CRM470.

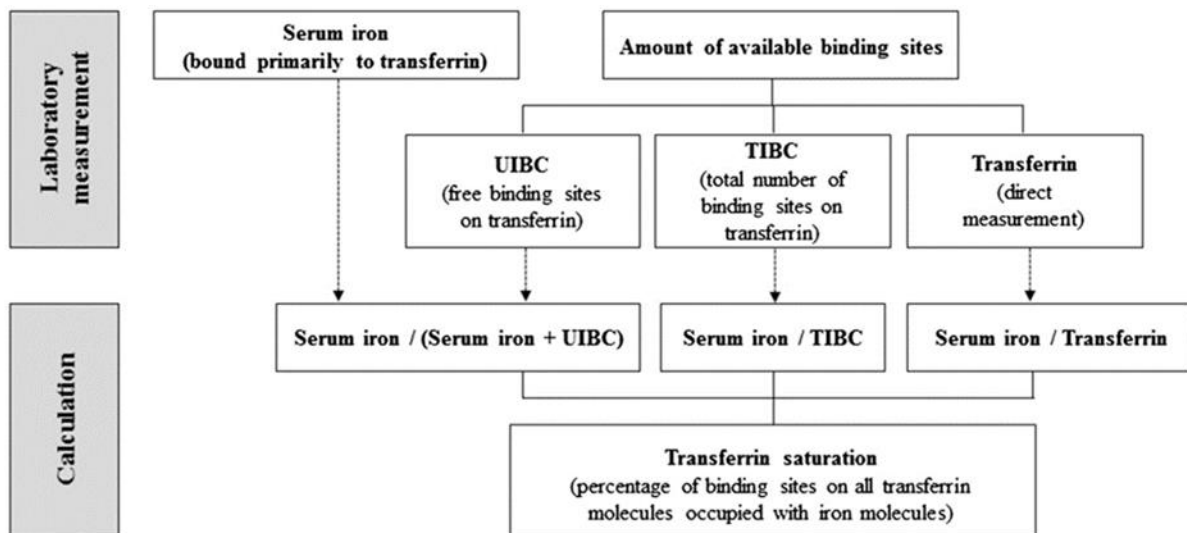


Figure 10 (Pfeiffer et al. 2017): Méthodes utilisées pour calculer la saturation de la transferrine. L'une est basée sur la capacité de fixation de fer sur les sites de liaison non occupés des molécules de transferrine (UIBC). L'autre fait intervenir une mesure directe de la concentration en transferrine.

La TS est calculée comme étant le rapport du fer total divisé par la capacité totale de fixation du fer ou la concentration en transferrine, multiplié par cent. L'efficacité diagnostique de la TS évaluée par ces 2 méthodes est identique pour la mise en évidence d'une carence martiale (Hawkins 2007). La détermination de la TS est réalisée dans l'identification de surcharge martiale en association de la ferritine, son efficacité diagnostique étant faible dans le cas d'une déficience en fer (Guyatt 1992). Malgré ses faibles performances, la détermination de la TS continue d'être

recommandée en association de la ferritine pour l'identification des patients présentant une carence martiale.

### 1.5.3 La ferritine

La ferritine est un hétéropolymère comportant 24 sous-unités qui peuvent être de 2 types, les sous-unités H (Heavy) de 21.000 Daltons et L (Light) de 19.000 Daltons formant une coque protéique. Le fer est stocké au sein de cette cavité sous une forme minéralisée ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). $9\text{H}_2\text{O}$ . Les sous-unités H et L sont fonctionnellement distinctes, les sous-unités H possèdent une activité ferroxidasique (Silva & Faustino 2015). Le fer ferreux cytosolique est livré à la ferritine via des protéines chaperones de type PCBP et entre dans la cavité centrale de cette dernière via des canaux hydrophiles. Les sous-unités H oxydent alors le Fe(II) en Fe(III) permettant sa minéralisation dans un noyau ferrique sans génération de radicaux libres (Wang et al. 2010). Les sous-unités L ne possèdent pas d'activité enzymatique, par contre elles possèdent de nombreux groupes carboxyliques qui leur permettent de délimiter la cavité où est stocké le fer. La proportion des sous-unités H et L diffèrent selon l'origine tissulaire de la ferritine, les isomères de la ferritine riche en sous-unités L sont plutôt retrouvés au niveau splénique et hépatique (Torti & Torti 2002). La ferritine est synthétisée sous forme d'apoferritine à partir du réticulum endoplasmique.

Cette protéine de stockage du fer permet de le maintenir sous une forme inerte au niveau oxydo-réducteur et est capable d'incorporer jusqu'à 4500 atomes de fer sous forme facilement disponible (Silva & Faustino 2015). La libération du fer de la ferritine s'effectue par un mécanisme d'autophagie appelé ferritinophagie intervenant dans l'homéostasie cellulaire du fer (Muckenthaler et al. 2017). La ferritine plasmatique serait d'origine macrophagique et, est constituée essentiellement de sous-unités L. Cette forme plasmatique est pauvre en fer et se trouve sous forme glycosylée vu sa capacité à lier la concanaviline A (Wang et al. 2010).

Le taux sérique de ferritine est considéré comme le meilleur paramètre biochimique pour identifier une carence en fer ; sa concentration est proportionnelle aux réserves tissulaires ferriques. Les valeurs seuils retrouvées dans la littérature pour établir un déficit en fer chez l'adulte, en l'absence de syndrome inflammatoire, varient de 15 à 30  $\mu\text{g/L}$  (Daru et al. 2017). A une valeur seuil inférieure à 30  $\mu\text{g/L}$ , elle présente une spécificité et sensibilité de 98% et 92%, respectivement pour identifier une carence martiale (Mast et al. 1998). Chez l'enfant de moins de 5 ans, une valeur de ferritine

inférieure à 12 µg/L est le signe d'un déficit en fer (Daru et al. 2017). Son excellente efficacité diagnostique est néanmoins altérée lors de phénomènes inflammatoires, la ferritine étant une protéine de phase aiguë dont la transcription est induite par des cytokines inflammatoires (Weiss et al. 2019). Une valeur seuil inférieure à 30 µg/L chez l'enfant et inférieure à 100 µg/L chez l'adulte, lors de syndrome inflammatoire ou de maladie chronique est prédictive d'une carence en fer associée (Camaschella 2015, Daru et al. 2017). La concentration en ferritine n'est pas impactée par la prise d'un repas et ne présente pas de variation circadienne, sa détermination peut donc se réaliser non à jeun à n'importe quel moment de la journée (Ridefelt et al. 2010). Sa variation biologique intra-individuelle (14,2%) est bien inférieure à celle du fer plasmatique (Ricós et al. 1999). La ferritine est quantifiée au laboratoire par une technique immunologique.

#### 1.5.4 Le récepteur soluble à la transferrine

Le récepteur de type 1 de la transferrine est une glycoprotéine transmembranaire de 190.000 Daltons constituée d'un homodimère réuni par deux ponts disulfures. Chaque chaîne polypeptidique comporte 760 acides aminés et se constitue d'un domaine N-terminal cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal extracellulaire (Harms & Kaiser 2015). Ce récepteur permet la livraison du fer à toutes les cellules en requérant, il est présent sur de nombreuses cellules de l'organisme, à l'exception des érythrocytes matures et d'autres cellules différenciées. Sa liaison au couple transferrine-Fe(III) est impactée par le pourcentage de TS. Le TfR1 est codé par un gène situé sur le chromosome 3 et sa transcription est régulée par le système IRP/IRE (Muckenthaler et al. 2017). Au cours du cycle endocytaire permettant l'apport de fer aux différentes cellules de l'organisme, une forme du TfR1, dépourvue de la partie cytoplasmique et transmembranaire, est relarguée au niveau plasmatique au moment de la réexpression du récepteur à la surface cellulaire ; il s'agit du récepteur soluble à la transferrine (sTfR), un monomère de 85.000 Daltons (Figure 11). La quantification de la concentration en sTfR est réalisée via des techniques immunologiques telles que des tests ELISA (Virtanen et al. 1998), des essais immunoturbidimétriques ou immunonéphélométriques (Cotton et al. 2000). Ce paramètre biochimique présente une bonne stabilité à température ambiante et après plusieurs cycles de congélation-décongélation (Pfeiffer et al. 2007).

Le récepteur de type 2 à la transferrine partage 45% d'identité en terme de séquence d'acides aminés avec le TfR1 (Pantopoulos et al. 2012) mais sa répartition cellulaire

est différente avec une localisation centralisée sur les hépatocytes et les érythroblastes (Harms & Kaiser 2015). Son affinité pour le couple transferrine-Fe(III) est nettement moindre comparativement au TfR1. Son rôle principal est de réguler la transcription de l'hepcidine et de moduler la voie de signalisation des récepteurs à l'EPO pour ajuster la production des globules rouges selon la disponibilité du fer circulant (Muckenthaler et al. 2017).

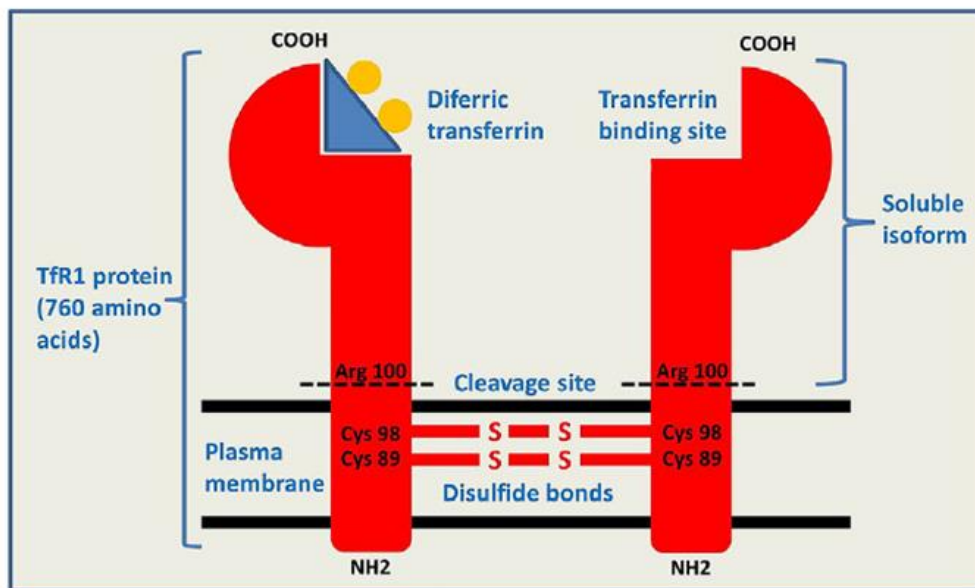


Figure 11 (Harms & Kaiser 2015): Le récepteur de type 1 à la transferrine est un homodimère comportant une région N-terminale cytoplasmique, un domaine transmembranaire et une région C-terminale extracellulaire qui donnera naissance à la forme soluble du récepteur à la transferrine au cours du cycle de livraison endocytaire du fer.

La concentration sérique en sTfR s'élève lorsque la demande cellulaire en fer augmente. Le taux de sTfR est également un reflet de l'activité érythropoïétique puisque dépendant du nombre de cellules exprimant le TfR1 à leur surface (Beguin 2003). Contrairement à la ferritine, les taux sériques de sTfR ne sont pas affectés par un processus inflammatoire. Ce paramètre biochimique est, par conséquent, intéressant à évaluer dans la différenciation des anémies inflammatoires avec ou sans carence martiale (Suominen et al. 1997). L'efficacité diagnostique des sTfR dans cette indication peut différer fortement selon les études, compte tenu de la variabilité des critères utilisés pour stratifier les populations et également, de l'absence de standardisation des différents tests commerciaux. Concernant ce dernier point, l'organisation mondiale de la santé a développé une préparation lyophilisée d'une forme recombinante du récepteur soluble à la transferrine en tant que standard

international qui devrait permettre de réduire la disparité des résultats fournis par les différentes techniques. Une élévation des concentrations sériques en sTfR peut s'observer lors d'anémies hémolytiques, lors de déficit en vitamine B12 ou en acide folique, lors de syndromes myéloprolifératifs. A l'inverse, une réduction du taux de sTfR peut être objectivée lors d'hypoplasie érythroïde (Braga et al. 2014).

#### 1.5.5 La ponction médullaire et coloration au bleu de Prusse

La réalisation d'une ponction médullaire avec l'analyse du frottis par coloration au bleu de Prusse (coloration de Perls) et la mise en évidence d'absence de fer colorable au niveau des érythroblastes est considérée comme le gold standard pour évaluer une carence martiale chez un individu. Cette analyse présente l'inconvénient d'être une procédure invasive dont les résultats sont examinateur dépendant avec des limitations techniques. En effet, une absence de fer médullaire colorable par le bleu de Prusse peut être observée chez certains patients ne présentant pas de carence martiale (Barron et al. 2001). De plus, la définition du déficit médullaire en fer sur base de l'analyse de frottis de moëlle peut être fortement variable d'une étude à l'autre (Braga et al. 2014). Cette analyse est très rarement utilisée en pratique pour l'évaluation du statut en fer (Camaschella 2017).

## 1.6 L'anémie du sujet âgé

### 1.6.1 Définition et prévalence

Selon les critères de l'organisation mondiale de la santé, l'anémie se définit comme étant une concentration en hémoglobine inférieure à 12 g/dL et 13 g/dL pour les femmes et les hommes de plus de 18 ans, respectivement (Nutritional anaemias, 1968). La prévalence de l'anémie augmente au cours du vieillissement; une étude réalisée sur une population américaine vieillissante, non institutionnalisée et non hospitalisée, entre 1988 et 1994, a estimé que plus de 20% des individus d'un âge supérieur à 85 ans sont anémiques (Guralnik et al. 2004). Les chiffres retrouvés dans la littérature diffèrent d'une étude à l'autre selon les critères utilisés pour définir l'anémie et le type de population investiguée (hospitalisée, institutionnalisée ou ambulatoire) avec une prévalence pouvant atteindre 40 à 50% chez les patients institutionnalisés et hospitalisés (Stauder et al. 2018).

### 1.6.2 Types d'anémie chez le sujet âgé

L'anamnèse (hématémèse, méléna, chirurgie bariatrique, médicaments,...) et l'examen clinique sont primordiaux pour l'orientation étiologique de l'anémie du sujet âgé (Joosten 2018).

Dans un tiers des cas, l'anémie observée chez le sujet âgé peut être reliée à une carence en fer, une carence en vitamine B12 ou en acide folique. La carence en fer absolue est le déficit le plus fréquent et est liée à une diminution des stocks ferriques. Elle s'accompagne, à un stade initial, d'une diminution de la TS sans anémie et à un stade plus avancé, d'une baisse de concentration en hémoglobine. L'IDA du sujet âgé est, le plus souvent, liée à une maladie chronique du tractus digestif supérieur (dans 60% des cas) ou inférieur (dans 30% des cas) (Andrès et al. 2013). L'œsophagite, la gastrite, les ulcères, le cancer du côlon, les polypes pré-malins peuvent conduire à des pertes sanguines ou une malabsorption du fer. La médication à risque comme la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou d'anticoagulants et la prévalence des lésions angiodysplasiques et néoplasiques qui augmentent en cours de vieillissement, accentuent le risque de saignements et, par conséquent de perte en fer (Busti et al. 2014). L'IDA du sujet âgé peut s'accompagner de signes et symptômes aspécifiques incluant une pâleur, une fatigue, une dyspnée ; elle est rarement liée à des apports ferriques insuffisants (Andrès et al. 2013). La valeur seuil de la ferritine pour identifier une carence martiale reste controversée pour les sujets âgés. La limite inférieure à 30

µg/L (Mast et al. 1998) utilisée dans la population adulte, présente une faible sensibilité diagnostique lorsqu'elle est appliquée dans une population âgée (Busti et al. 2014). En effet, la concentration en ferritine s'élève avec l'âge et les phénomènes inflammatoires rencontrés fréquemment dans ce type de population. Une concentration inférieure à 50 µg/L pour la ferritine semble plus appropriée pour cette population (Joosten 2018). Lors d'une carence en fer chez le sujet âgé, il est important d'identifier la source et de supplémenter en fer.

La baisse de concentration en hémoglobine suite à une carence en folates est quant à elle, généralement liée à des apports insuffisants lors de malnutrition. En effet, les réserves de l'organisme en folates sont très limitées. Ce déficit peut être néanmoins précipité lors d'éthylisme chronique, lors de la prise d'anticonvulsivant ou de méthotrexate.

La carence en vitamine B12 à l'origine du développement d'une anémie chez le sujet âgé, est causée, le plus souvent par une malabsorption suite à une gastrite atrophique, une infection par *Helicobacter pylori* ou à d'autres phénomènes entraînant une hypochloridrie, elle est beaucoup plus rarement engendrée par une anémie pernicieuse (Stauder et al. 2018).

Dans le second tiers des cas, l'anémie du sujet âgé peut être reliée à une maladie chronique suite à une pathologie inflammatoire chronique, un phénomène néoplasique ou autoimmun. Cette anémie légère à modérée, est généralement normochrome et normocytaire avec un index réticulocytaire faible (Theurl et al. 2009). L'anémie observée lors d'une réduction du taux de filtration glomérulaire suite à une maladie rénale chronique fait partie du spectre des ACD, elle peut être observée lors d'un taux de filtration glomérulaire, calculé selon la formule CKD-EPI (Levey et al. 2009), inférieur à 30 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (Price et al. 2011).

Dans le dernier tiers des cas, aucune cause spécifique ne peut être mise en évidence, on parle alors d'anémie d'origine inconnue (UA : Unexplained Anemia). Ce dernier type d'anémie pourrait être, néanmoins, expliqué par un état proinflammatoire chronique et/ou la résistance progressive des progéniteurs érythroïdes à l'érythropoïétine (Vanasse & Berliner 2010). Les syndromes myélodysplasiques peuvent se retrouver dans cette catégorie. Ce désordre clonal acquis des cellules souches hématopoïétiques affecte diverses lignées cellulaires. Il se caractérise par une anémie macrocytaire le plus souvent avec d'autres anomalies hématologiques



(neutropénie, thrombocytopénie, macrocytose sans déficience, monocytose ou basophilie).

Il n'existe pas de corrélation entre la sévérité de l'anémie et l'origine de cette dernière (Andrès et al. 2013). Des causes multi-factorielles peuvent être identifiées pour environ la moitié des patients âgés anémiques (Petrosyan et al. 2012).

## 2 Objectifs du projet

### 2.1 Développement d'une technique de dosage de l'hepcidine sérique et urinaire : aspects pré-analytiques et analytiques

Dans un premier temps, la mise au point analytique du dosage de l'hepcidine sur sérum et urine par spectrométrie de masse a été réalisée. Les critères de fiabilité analytique (précision intermédiaire, exactitude, linéarité,...) ont été déterminés via les profils d'exactitude (Hubert et al. 2004, Hubert et al. 2007, Hubert et al. 2007b, Hubert et al. 2008). Les intervalles de référence pour l'hepcidine sérique et urinaire ont été définis sur base des résultats obtenus dans une population d'individus sains provenant de la médecine du travail de l'hôpital Erasme. Les heures de prélèvements ont été standardisées entre 8h et 11h du matin. Le coefficient d'excrétion rénale de l'hepcidine a été également déterminé en collectant des paires urine-sérum chez ces mêmes volontaires. Finalement, les aspects pré-analytiques pouvant impacter la concentration en hepcidine, ont été investigués (type de prélèvement, présence d'un gel séparateur, nature du vial utilisé pour la réalisation de l'aliquot secondaire, durée et température de stockage).

Cette première partie du projet a fait l'objet d'une publication dans *Clinica Chimica Acta* (Wolff et al. 2013).

### 2.2 Etude des paramètres pré-analytiques et de l'efficacité diagnostique de l'hepcidine urinaire dans l'identification d'une carence martiale

Dans un second temps, l'impact de l'ajout d'albumine bovine sérique (ABS) sur les concentrations urinaires en hepcidine a été étudié. En effet, l'hepcidine présente une structure amphipatique à l'origine de divers problèmes pré-analytiques (Hunter et al. 2002) ; notamment une propension à s'agréger et à s'adsorber sur divers matériaux et ce, d'autant plus, dans les milieux biologiques pauvres en protéines (Kroot et al. 2011). La concentration en hepcidine a été mesurée sur du plasma, un échantillon urinaire non traité et traité par ABS ainsi que sur une collecte urinaire de 24h traitée par ABS chez 35 volontaires. L'hepcidine est un peptide qui présente une variation circadienne importante avec les concentrations sériques les plus faibles observées en matinée qui augmentent progressivement en cours de journée (Kroot et al. 2009). Aucune étude, n'a, à l'heure actuelle, investigué si les concentrations mesurées sur urine de 24 heures pourraient être un meilleur reflet des réserves ferriques. L'efficacité diagnostique de la mesure de l'hepcidine sur ces différents prélèvements a été évaluée

chez 35 volontaires pour la mise en évidence d'une carence martiale. La stabilité de l'hepcidine urinaire en cours de stockage a également été étudiée sur échantillon traité ou pas par ABS.

Les résultats de cette deuxième partie du projet ont été publiés dans *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* (Wolff et al. 2016).

### 2.3 Mesure de l'hepcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et étude de sa corrélation avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un test d'absorption en fer oral

Dans ce troisième volet, l'intérêt de la détermination de l'hepcidine sérique basale ou de sa cinétique quatre heures après un test d'absorption en fer oral (TAFO), a été évalué dans le cadre du diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé. Le premier objectif a été de déterminer si la mesure de l'hepcidinémie pourrait être un biomarqueur intéressant pour identifier une carence martiale chez un patient anémique âgé souffrant d'une maladie chronique. Dans ce but, les paramètres hématologiques, biochimiques et l'hepcidine ont été mesurés sur un prélèvement réalisé entre 7h30 et 10h00 chez 332 patients issus de l'hôpital de jour gériatrique de l'hôpital Erasme. L'identification du type d'anémie (IDA, ACD, IDA/ACD) a été réalisée sur base de critères biochimiques et cliniques définis par l'équipe de Theurl (Theurl et al. 2009), Joosten (Joosten et al. 1991), Busti (Busti et al. 2014) et Thomas (Thomas et al. 2011).

Le second objectif a été d'évaluer si la concentration basale en hepcidine corrèle avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un TAFO. Dans ce but, un tel test a été proposé aux patients ayant une durée de séjour à l'hôpital de jour gériatrique supérieure à 4h.

Cette troisième partie du projet a permis la publication d'un article dans *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Wolff et al. 2018).

### 3 Matériel et méthodes

#### 3.1 Matériel

##### 3.1.1 Produits et réactifs

La provenance ainsi que le détail des produits utilisés sont décrits ci-dessous:

- Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands): acétonitrile (ACN), méthanol (MeOH), acide formique 99% (AF); tous étant de qualité optimale pour l'analyse par spectrométrie de masse.
- VWR International (Leuven, Belgique): solution d'ammoniaque à 32%.
- Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique): acide trifluoroacétique anhydre (TFA), charbon activé et albumine bovine sérique lyophilisée.
- Station de purification d'eau Millipore (Bruxelles, Belgique): eau Milli-Q.
- Eurogentec (Seraing, Belgique): hepcidine-25 native [DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT-OH] (masse moléculaire: 2790.5) et hepcidine-25 marquée aux isotopes, [DTHFPI(<sup>13</sup>C<sub>6</sub> <sup>15</sup>N<sub>1</sub>)CI(<sup>13</sup>C<sub>6</sub> <sup>15</sup>N<sub>1</sub>)FCCGCCHRSKCGMCCKT-OH] (masse moléculaire: 2804.5).
- Peptides Institute (Ozaka, Japon): hepcidine-25 native [DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT-OH] (masse moléculaire: 2789.4) et hepcidine-25 marquée aux isotopes, [DTH(<sup>13</sup>C<sub>9</sub>,<sup>15</sup>N)FPICI(<sup>13</sup>C<sub>9</sub>, <sup>15</sup>N)FCC(<sup>15</sup>N)GCCHRSKCGMCCKT] (masse moléculaire: 2810.2).
- Pool sérique dépourvu d'hepcidine : 50 mL de pool sérique humain sont traités par 6 grammes de charbon actif, sous agitation durant 2 heures. Trois ultracentrifugations sont ensuite réalisées à 15000 rpm durant 10 minutes. Le pool sérique est aliquoté et stocké à -80°C.
- Pool urinaire dépourvu d'hepcidine : 100 mL de pool urinaire humain sont agités en présence d'1 gramme de charbon actif durant 2 heures. Après trois ultracentrifugations (15000 rpm/10 minutes), le pool d'urine est aliquoté et stocké à -80°C.

##### 3.1.2 Appareillages

- Terumo (Leuven, Belgique) : tube sec sans gel séparateur (VF-076SP), tube sec avec gel séparateur (VF-054SAS), tube avec héparinate de lithium (VF-053SHL), tube avec éthylène diamine tétraacétate (EDTA) (VF-052SDK).
- Pots à urine en polypropylène (contenance 100 mL).
- Pots à urine opaque pour collecte de 24h (contenance 3300 mL).

- Waters (Zellik, Belgique) : Cartouche d'extraction en phase solide HLB 3cc/60 mg, plaque microéluvative Oasis HLB, système de pompe à vide pour microplaque, évaporateur azote, colonne X-Terra MS C-18 2.5 µm, 125Å (3.1x50 mm).
- Agilent Technologies (Diegem, Belgique) : Colonne Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT 1.8 µm, 80Å (2.1x50 mm), système HPLC 1260 Infinity, spectromètre de masse en tandem 6460 triple quadripôle, spectromètre de masse en tandem 6490 triple quadripôle, vials en polypropylène certifié 250 µL, vials transparent certifié en verre 2 mL.
- Tube en verre (5 mL).
- Tube en plastique (5 mL).
- Eppendorf en polypropylène (1.2 mL).

## 3.2 Méthodes

### 3.2.1 Quantification des paramètres biochimiques et hématologiques

Le fer a été mesuré par une technique colorimétrique utilisant la ferrozine, la créatinine a été quantifiée par la technique compensée de Jaffé à l'aide de réactifs Roche Diagnostics (Vilvoorde, Belgique) sur un analyseur de type Hitachi Modular P. Les concentrations en récepteurs solubles de la transferrine, en transferrine, en protéine C-réactive (CRP) ont été mesurées par immunoturbidimétrie sur le même module P à l'aide de réactifs respectivement commercialisés par Roche Diagnostics, Diasource (Louvain-la-Neuve, Belgique) et Diasys Diagnostic Systems (Holzheim, Allemagne). Les concentrations en ferritine, vitamine B12 et acide folique ont été déterminées par un test immunologique de type chemiluminescence (réactifs Roche Diagnostics) sur un analyseur de type Modular E170. La concentration en hémoglobine, le volume corpusculaire moyen (VCM) et la concentration moyenne en hémoglobine (CMH) ont été analysés par un automate Unicel DxH800 de Beckman Coulter (Suarlée, Belgique).

### 3.2.2 Développement d'une technique de dosage de l'hepcidine sérique et urinaire : aspects pré-analytiques et analytiques

Cette étude a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'hôpital Erasme (références P2011/028 et P2012/314). La première partie de ce projet a été réalisée avec le calibrateur hepcidine-25 et son standard interne marqué (STDI) aux isotopes provenant de la firme Eurogentec.

### 3.2.2.1 Etablissement des transitions optimales et des paramètres du spectromètre pour la quantification par MS/MS

La détermination des paramètres requis pour la quantification par MS/MS (choix des transitions, voltage du fragmenteur, énergie de collision) a été réalisée par infusion directe d'une solution d'hepcidine et de son STDI marqué à une concentration finale de 15000 nmol/L dans 50/50/0.1 (v/v/v) MeOH/eau/AF. Les phases mobiles utilisées après dégazage, étaient composées de 0,1% d'AF dans l'eau (phase A) et de 0,1% d'AF dans un mélange 90/10 (v/v) ACN/eau (phase B) et étaient délivrées dans une proportion 85%(A)/15%(B) à un débit de 0,4 mL/min.

### 3.2.2.2 Impact de la nature du vial utilisé pour la réalisation des solutions de travail

Des solutions aqueuses de travail d'hepcidine ont été préparées dans 20/80/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/FA à 50 et à 1000 nmol/L. Ces solutions ont été réalisées dans trois eppendorfs en polypropylène, trois tubes en plastique et trois tubes en verre puis transférées secondairement, après 1 heure à T° ambiante, dans des vials en polypropylène, développés par Agilent Technologies pour limiter l'adsorption des peptides. L'hepcidine a été mesurée par spectrométrie de masse sur chacun des vials.

### 3.2.2.3 Optimisation de la séparation chromatographique

Le gradient utilisé pour la séparation chromatographique s'est basé sur celui décrit par Houbart et al (Houbart et al. 2011). Les performances résolutes de 2 colonnes ont été évaluées au cours du développement de la méthode : la colonne Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT 1,8 µm (2.1x50 mm) et la colonne X-Terra MS C-18 2,5µm (3,1x50 mm). Le carry-over a été évalué en passant un blanc constitué de 33,8/66,2/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/TFA à la suite d'un standard de calibration sérique à 100 nmol/L, 4 fois consécutives. Le pourcentage de carry-over est exprimé comme suit : [(Intensité de la transition sélectionnée pour l'hepcidine en mode MRM (multiple reaction mode) mesurée dans le blanc / Intensité de la transition sélectionnée pour l'hepcidine en mode MRM dans le standard de calibration sérique à 100 nmol/L) X 100].

### 3.2.2.4 Procédures d'extraction des échantillons

Les solutions stocks pour l'hepcidine et son STDI ont été réalisées dans 20/80/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/FA à une concentration respective de 35000 et 14500 nmol/L, et stockées dans des eppendorfs placées à -80°C. Les solutions de travail utilisées pour la constitution des standards de calibration (SC) et de validation (SV) sont réalisées

extemporanément dans des eppendorfs avec 20/80/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/FA pour obtenir une concentration finale à 50 nmol/L et 1000 nmol/L pour l'hepcidine et, à 362,5 nmol/L pour le STDI. Concernant l'extraction des échantillons, plusieurs techniques ont été évaluées (précipitation protéique par ACN, traitement par billes magnétiques échangeuses cationiques faibles, macro-colonnes échangeuses ioniques). En utilisant le protocole d'extraction fourni par la firme commercialisant les macro-colonnes, sans optimisation préalable, les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus sur les colonnes HLB. L'extraction des séra et urines s'est donc réalisée sur colonne HLB en se basant sur une technique modifiée en phase solide, initialement décrite par Li et al (Li et al. 2009). Trente µL d'une solution de travail de STDI, 100 µL d'une solution d'AF à 0,1% et 500 µL d'eau ont été ajoutés à 200 µL de sérum, standard de calibration ou de validation. Pour la quantification de l'hepcidine urinaire, 60 µL de STDI à 362,5 nmol/L ainsi que 500 µL d'une solution d'AF à 0,1% ont été ajoutés à 1000 µL d'urine. Le mélange ainsi obtenu a été vortexé durant 30 secondes. Les colonnes HLB ont été conditionnées par passage d'1 mL de MeOH suivi d'1 mL d'eau. Les matrices sériques et urinaires ont été placées sur les cartouches HLB et lavées séquentiellement par 1 mL d'eau, 1 mL de 30/75/5 (v/v/v) MeOH/eau/solution d'ammoniaque à 32%. L'élution s'est réalisée par 3 passages successifs de 400 µL de MeOH avec 0,1% d'AF. Après évaporation sous flux d'azote, le résidu sec a été repris par 100 µL de 33,8/66,2/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/TFA et homogénéisé avant d'être centrifugé 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant a été collecté dans des vials en polypropylène. Les rendements d'extraction de cette procédure ont été évalués sur des matrices sériques et urinaires enrichies à deux concentrations différentes (5 nmol/L et 50 nmol/L) et analysées 5 fois chacune.

#### 3.2.2.5 Validation de la méthode

Les critères de fiabilité analytique ont été évalués à l'aide d'une méthode de validation reposant sur les profils d'exactitude (Hubert et al. 2004, Hubert et al. 2007, Hubert et al. 2007b, Hubert et al. 2008). Il s'agit d'une méthode prédictive dans laquelle le risque que les résultats fournis par la technique soient en dehors des limites d'acceptation préalablement fixées, est ajusté à 5%. Pour la validation de l'hepcidine sérique et urinaire, une erreur totale de 30% a été choisie selon les exigences réglementaires (Viswanathan et al. 2007). Les SCs pour la matrice sérique et urinaire ont été réalisés respectivement en enrichissant un pool sérique et urinaire en hepcidine de façon à obtenir des concentrations finales comprises entre 0,25-100 nmol/L et entre 0,5-200

nmol/L. Ces SCs ont été analysés 3 fois durant 3 jours consécutifs. Les SVs ont été préparés indépendamment dans la même gamme de concentrations et quantifiés 4 fois durant les 3 mêmes jours consécutifs. Une droite de calibration a été réalisée chaque jour sur base des résultats des SCs et la concentration en hepcidine, extrapolée pour les SVs. Pour chaque niveau de concentration, la justesse (représentée par le biais relatif), la précision (représentée par le coefficient de variation pour la répétabilité et la précision intermédiaire), l'exactitude (représentée par les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance  $\beta$ ) ont été déterminées. La linéarité et la limite de quantification pour les deux matrices ont été également évaluées. Cette dernière a été calculée sur base des profils d'exactitude obtenus et correspond à la valeur de x extrapolée, sur base de l'intersection entre la limite supérieure ou inférieure de l'intervalle de tolérance et l'erreur totale fixée à 30%.

### 3.2.2.6 Population étudiée et échantillonnage

Cinq millilitres de sang ont été collectés dans des tubes secs sans gel séparateur chez des travailleurs sains de l'hôpital Erasme depuis janvier 2011 jusqu'à mars 2012. Les informations suivantes ont été obtenues pour chaque volontaire: âge, sexe et état de santé. Sur les 308 séra récoltés, 108 ont été réalisés entre 8h00 et 11h00 et ont été utilisés pour établir les valeurs de référence. Quarante-huit paires sérum-urine ont également été collectées chez ces mêmes volontaires entre 7h30 et 15h35 et stockées dans des tubes en polypropylène. Les tubes ont été centrifugés à 4000 rpm durant 10 minutes. Le sérum ainsi que l'urine ont été placés dans des tubes eppendorfs stockés à -80°C jusqu'à réalisation des analyses. Les paramètres du métabolisme ferrique (TS et ferritine), la créatinine, l'hémoglobine (Hb) et la CRP ont été quantifiés pour les 108 séra de volontaires sains et les séra des 48 paires sérum-urine. Le taux de filtration glomérulaire a été calculé sur base de l'équation CKD-EPI faisant intervenir la concentration en créatinine, l'âge et le sexe (Levey et al. 2009). Afin de déterminer l'intervalle de référence de l'hepcidinémie, les résultats de volontaires présentant une carence martiale absolue (taux de ferritine <30 µg/L (Mast et al. 1998)), un syndrome inflammatoire (CRP ≥ 20 mg/L) ou une diminution du taux de filtration glomérulaire (GFR : glomerular filtration rate ≤ 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>) ont été exclus. La concentration en hepcidine urinaire a été rapportée à la créatinine urinaire et le coefficient d'excrétion rénal a été calculé comme suit : 
$$\frac{([\text{hepcidine urinaire}] \times [\text{créatinine sérique}])}{([\text{hepcidine sérique}] \times [\text{créatinine urinaire}])} \times 100.$$



### 3.2.2.7 Evaluation des variations de concentrations en hepcidine dans diverses conditions pathologiques

La concentration en hepcidine a été évaluée chez 18 volontaires et 11 patients présentant une carence martiale absolue (âge médian : 39 ans, intervalle : 23-59 ans, 28 femmes, 1 homme). Les valeurs ainsi obtenues ont été comparées à celles déterminées dans la population de référence.

### 3.2.2.8 Variables pré-analytiques évaluées

#### 3.2.2.8.1 Impact du tube primaire

L'hepcidine a été quantifiée chez 15 volontaires pour lesquels du sang total a été prélevé dans 3 tubes différents : un tube sec sans gel séparateur, un tube comportant de l'héparinate de lithium et un tube contenant de l'EDTA. L'impact de la présence ou de l'absence de gel séparateur dans les tubes secs sur les valeurs d'hepcidinémie a été évalué chez 10 volontaires. Pour tous ces prélèvements, une centrifugation a été réalisée durant 10 minutes à 4000 rpm. Le sérum ou plasma obtenu, a été stocké dans des eppendorfs à -80°C.

#### 3.2.2.8.2 Impact du tube de stockage secondaire

Sept sera et cinq urines émises dans des flacons en polypropylène ont été aliquotés dans des tubes en plastique et en verre avant d'être stockés à -80°C.

#### 3.2.2.8.3 Impact de la température, de la durée de stockage du tube primaire et de l'aliquot secondaire

Un tube sec avec gel séparateur a été prélevé chez 10 volontaires. Ces prélèvements ont été centrifugés durant 10 minutes à 4000 rpm. Deux aliquots ont été réalisés dans un tube en plastique, l'un a été directement placé à -80°C (prélèvement basal), l'autre a été conservé 24 heures à T° ambiante avant d'être congelé à -80°C. Après réalisation de ces aliquots secondaires, le tube primaire a directement été placé à 4°C avec réalisation d'un nouvel aliquot conservé à -80°C après 3 jours et après 6 jours de conservation.

### 3.2.2.9 Tests statistiques utilisés

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du programme GraphPad Prism, version 4.0 (La Jolla, USA) ainsi que le programme Statistix version 9.0 (Tallahassee, USA). Le test de normalité Shapiro-Wilk a été utilisé pour l'analyse de la distribution des variables continues. Les valeurs obtenues ont été rapportées sous forme

de médiane, de percentiles 2,5 (P2,5) et 97,5 (P97,5). Les différences de résultats entre les groupes ont été investiguées à l'aide d'un test de Student pour données non paires (variables continues gaussiennes) et d'un test de Mann-Whitney (variables continues non paires non gaussiennes). Les analyses de régression linéaire univariable et multivariable ont été utilisées pour évaluer l'association entre la concentration en hepcidine et les paramètres hématologiques ainsi que biochimiques. Pour l'analyse multivariable, les coefficients  $\beta$  ont été rapportés sous forme de moyenne et d'intervalle de confiance à 95% (IC95%). Les coefficients de Pearson et Spearman, rho, ont été calculés respectivement pour évaluer les corrélations entre les données continues gaussiennes ou non-gaussiennes. Un test d'analyse de variance pour mesures répétées, distribuées de manière gaussienne, avec un post test de Tukey ainsi qu'un test de Friedman avec un post test de Dunns (mesures répétées, non-gaussiennes) ont été utilisés pour déterminer l'effet de la nature du vial pour la réalisation des solutions aqueuses de travail ainsi que l'impact des conditions pré-analytiques (type de tube primaire, effet de la température, effet de la durée de stockage du tube primaire et de l'aliquot secondaire) sur les concentrations en hepcidine mesurées. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

### 3.2.3 Etude des facteurs pré-analytiques et évaluation de l'efficacité diagnostique de l'hepcidine urinaire dans l'identification d'une carence martiale

Cette étude a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'hôpital Erasme (référence P2014/398). La deuxième partie de ce projet a été réalisée avec le calibrateur hepcidine-25 et son standard interne marqué aux isotopes provenant de la firme Eurogentec.

#### 3.2.3.1 Procédure d'extraction des échantillons et quantification de l'hepcidine-25 par spectrométrie de masse

La quantification de l'hepcidine plasmatique et urinaire a été réalisée par une technique légèrement modifiée par rapport à celle initialement décrite (Wolff et al. 2013). Les modifications introduites concernent la procédure d'extraction des échantillons ainsi que le spectromètre de masse utilisé pour la quantification. L'extraction a été effectuée sur une microplaque Oasis HLB de 96 puits avec une pompe à vide. Trente  $\mu\text{L}$  d'une solution de STDI à 362,5 nmol/L, 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'AF à 0,1% et 200  $\mu\text{L}$  d'eau ont été ajoutés à 300  $\mu\text{L}$  de plasma, urine, calibrateur ou contrôle. Le mélange ainsi obtenu a été vortexé durant 30 secondes. Les micro-colonnes HLB ont été conditionnées par passage de 400  $\mu\text{L}$  de MeOH suivi de 400  $\mu\text{L}$  d'eau. Le mélange a été placé sur les micro-colonnes qui ont été lavées séquentiellement par 200  $\mu\text{L}$  d'eau MilliQ, 200  $\mu\text{L}$  de 30/75/5 (v/v/v) MeOH/eau/solution d'ammoniaque à 32%. L'élution s'est réalisée par 2 passages successifs de 200  $\mu\text{L}$  de méthanol avec 0,1% d'AF. Après évaporation sous flux d'azote, le résidu sec a été repris par 100  $\mu\text{L}$  de 33,8/66,2/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/TFA et homogénéisé avant d'être centrifugé 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant a été collecté dans des vials en polypropylène. Le volume injecté est de 25  $\mu\text{L}$ . Le spectromètre de masse utilisé est un triple quadripôle de type 6490. Suite à ce changement d'appareillage et de procédure d'extraction, la méthode a été à nouveau évaluée pour ses critères de fiabilité analytique par l'utilisation des profils d'exactitude à 4 niveaux de concentration différente (0,25, 0,5, 2 et 10 nmol/L). La justesse, exprimée par le biais relatif, et la précision intermédiaire sont respectivement : -3,1% et 5,7% à 0,5 nmol/L, -1,5% et 5,8% à 2 nmol/L, 0,1% et 7,2% à 10 nmol/L avec une limite de quantification calculée à 0,28 nmol/L. Le taux de récupération obtenu pour cette nouvelle technique d'extraction a été évalué sur des matrices sériques enrichies à deux concentrations différentes (2 nmol/L et 25 nmol/L) et analysées en triplicat. Les moyennes (déviations standard) des rendements d'extraction obtenus sur microplaque

sont respectivement 59,3% (3,5%) et 52,1% (5,4%) pour des pools sériques enrichis à 2 et 25 nmol/L.

### 3.2.3.2 Populations étudiées et échantillonnage

Trente-cinq volontaires (20 femmes, 15 hommes, âgés de 22 à 63 ans) ont accepté de participer à l'étude et ont donné leur consentement écrit. Les renseignements cliniques et les informations sur la médication ont été obtenus pour chaque participant. Sur les 35 volontaires, deux n'étaient pas considérés comme sains. L'un d'entre eux était traité par méthylprednisolone pour une infection de la sphère ORL, l'autre était sous quinolones pour une épididymite. La collecte des échantillons sanguins et urinaires s'est réalisée entre 8h00 et 14h00, non à jeun. Du sang total a été prélevé dans 3 tubes différents : un tube sec pour les paramètres biochimiques (mesurés immédiatement), un tube héparinate de lithium pour l'hepcidine (aliquot de plasma stocké à -80°C jusqu'à analyse) et un tube EDTA pour l'hémogramme (réalisé immédiatement). Les échantillons urinaires ont été émis dans les 10 minutes suivant la ponction veineuse. Environ 25 mL d'urine ont été collectés directement dans trois pots à urine en polypropylène. Le premier contenait 0,065 g d'ABS (concentration finale en ABS à 2,5 g/L), le deuxième, 0,130 g d'ABS (concentration finale en ABS à 5 g/L) et le dernier ne contenait pas d'ABS. Après l'émission de ces échantillons urinaires, l'heure a été notée et la collecte urinaire initiée durant les 24 heures suivantes, dans un récipient de 3300 mL comportant 5 g d'ABS (concentration finale de 2,5 g/L en considérant une diurèse moyenne de 2000 mL/24 heures). Les différents prélèvements urinaires ont été aliquotés dans des tubes en polypropylène et stockés à -80°C. Le jour de la quantification de l'hepcidine, les prélèvements ont été décongelés à température ambiante et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes avant extraction. Les concentrations en hepcidine urinaire ont été exprimées en nmol/mmol de créatinine. L'absence d'hepcidine dans des solutions aqueuses d'ABS à 2,5 et 5 g/L a été confirmée par spectrométrie de masse.

### 3.2.3.3 Etude des paramètres pré-analytiques pour l'hepcidine urinaire

Neuf échantillons urinaires collectés sans et avec ABS (concentration finale en ABS à 2,5 g/L) ainsi que 7 collectes urinaires de 24h ont été placés durant 24 heures à température ambiante avant d'être aliquotés et stockés à -80°C. Les concentrations en hepcidine mesurées ont été comparées à celles obtenues après aliquotage direct.

#### 3.2.3.4 Tests statistiques utilisés

Les différences des concentrations en hepcidine observées entre les échantillons urinaires ont été investiguées à l'aide d'un test d'analyse de variance pour mesures répétées non paramétriques (test de Friedman) avec un post test de Dunns. Une régression de Deming ainsi qu'un test de Bland-Altman ont été utilisés pour évaluer les différences de concentrations en hepcidine urinaire observées entre les échantillons collectés sans ABS et avec ABS à une concentration finale de 2,5 g/L. Le coefficient de Pearson et Spearman, rho, ont été calculés pour évaluer la corrélation entre les données continues gaussiennes et non-gaussiennes. L'analyse Receiver Operator Curve (ROC) a été utilisée pour évaluer l'efficacité diagnostique avec laquelle la concentration en hepcidine mesurée sur plasma, échantillon urinaire et collecte de 24 heures permet de différencier les volontaires carencés en fer de ceux non carencés. Les différences de concentrations en hepcidine urinaire mesurées après 24 heures de stockage à température ambiante ont été évaluées par un test de Student pour données paires.

### 3.2.4 Mesure de l'hepcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et étude de sa corrélation avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un test d'absorption en fer oral

Cette étude a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'hôpital Erasme (référence P2014/079). Un consentement écrit a été obtenu pour les patients participant au test d'absorption en fer oral. La troisième partie de ce projet a été réalisée avec le calibrateur hepcidine-25 et son standard interne marqué aux isotopes provenant de la firme Peptide Institute.

#### 3.2.4.1 Populations étudiées

##### 3.2.4.1.1 Volontaires sains avec test d'absorption en fer oral

Dans le cadre du test d'absorption en fer oral, une étude préalable a été réalisée pour pouvoir déterminer le temps de prélèvement optimal après administration de fer oral chez des volontaires sains. L'évolution de la concentration en hepcidine et de la TS ont été évaluées chez 12 volontaires après une nuit de jeûne. La TS, la ferritine, la CRP, la créatinine, l'Hb, le VCM, la CMH, l'acide folique et la vitamine B12 ont été mesurés immédiatement sur le premier prélèvement sanguin réalisé à jeûn à 8h00. Six des 12 volontaires (50%) ont ingéré, directement après cette prise de sang, 160 mg de fer ferreux sous forme de gluconate (2X80 mg; 2 comprimés de Losferron® 695 mg, Grünenthal, Sint-Stevens-Woluwe, Belgique). Tous les volontaires sains ont ensuite reçu un déjeuner standardisé, fourni par l'hôpital de jour. Ce déjeuner comportait 2 tartines de pain blanc (70 g), 5 g de confiture, 5 g de margarine et une boisson chaude. La quantité de fer ferreux a été estimée à environ 1,5 mg et, considérée comme négligeable par rapport au test d'absorption en fer oral (160 mg). Les paramètres du métabolisme ferrique incluant la TS et l'hepcidine ont été évalués pour les 12 volontaires sains à 12h (soit 4h après la prise de fer oral) et à 15h30 (soit 7h30 après la prise de fer oral). Un repas de composition variable, mais avec une quantité équivalente en fer (quantité de fer ferreux inférieure à 5 mg), a été fourni par l'hôpital de jour vers 12h30 pour chaque volontaire. Le temps de prélèvement optimal pour la mesure de la TS et de l'hepcidine après l'administration de fer dans le groupe des patients a été déterminé sur base des résultats obtenus chez les volontaires sains.

##### 3.2.4.1.2 Patients

Les patients recrutés pour cette troisième partie du projet, provenaient de l'hôpital de jour gériatrique. Septante-cinq pourcents d'entre eux étaient référés pour une mise

au point de troubles cognitifs. Les 25% restants étaient adressés à l'hôpital de jour pour un bilan préopératoire ou une mise au point de chutes à répétition. Les patients sous supplémentation en fer, ayant reçu des agents stimulant l'érythropoïèse le mois précédant ou ayant reçu une transfusion dans les 3 mois précédant ont été exclus de l'étude.

#### 3.2.4.1.2.1 Patients avec mesure de l'hepcidine basale

Des prélèvements sanguins à jeun ont été collectés entre 7h30 et 10h00 pour 332 patients de mai 2014 à décembre 2016. La saturation de la transferrine, la ferritine, la CRP, la créatinine, l'Hb, le VCM, la CMH, l'acide folique et la vitamine B12 ont été mesurés immédiatement. Le plasma ou sérum résiduel a été stocké dans des eppendorfs stockés à -80°C jusqu'à la mesure de l'hepcidine et de la concentration en récepteurs solubles de la transferrine. Le protocole de l'étude est décrit dans la figure 12.

#### 3.2.4.1.2.2 Patients avec test d'absorption en fer oral

Les patients bénéficiant d'un prélèvement sanguin entre 7h30 et 10h00 et ayant une durée de séjour supérieure à 4 heures à l'hôpital de jour ont été sollicités pour participer au TAFO. Sur les 149 patients répondant à ces critères, 102 ont accepté la participation à l'étude et ont ingéré, directement après la prise de sang, 160 mg de fer ferreux sous forme de gluconate (2X80 mg; 2 comprimés de Losferron® 695 mg). Les patients ont ensuite reçu un déjeuner standardisé, fourni par l'hôpital de jour, dont la composition est décrite dans le paragraphe 3.2.4.1.1. Une évaluation nutritionnelle (MNA : Mini Nutritional Assessment), fonctionnelle (échelle de Katz) et cognitive (MMSE : Mini Mental State Examination) (Heeren et al. 1990) ont été réalisées pour chaque participant. La fragilité a été évaluée par le score ISAR (ISAR : Identification of Senior at risk) (Dendukuri et al. 2004), la fatigue par le score FACIT et les comorbidités à l'aide d'une échelle adéquate (CIRS : Cumulative Index Rating Scale) (Miller et al. 1992). La saturation de la transferrine et l'hepcidine ont été quantifiées sur la prise de sang réalisée 4 heures ( $\pm 30$  minutes) après l'administration de fer oral. Le Delta TS et le Delta hepcidine ont été calculés sur base de la formule suivante :  $[(\text{valeur 4h après le TAFO}) - (\text{valeur basale}) / (\text{valeur basale})] \times 100$ .

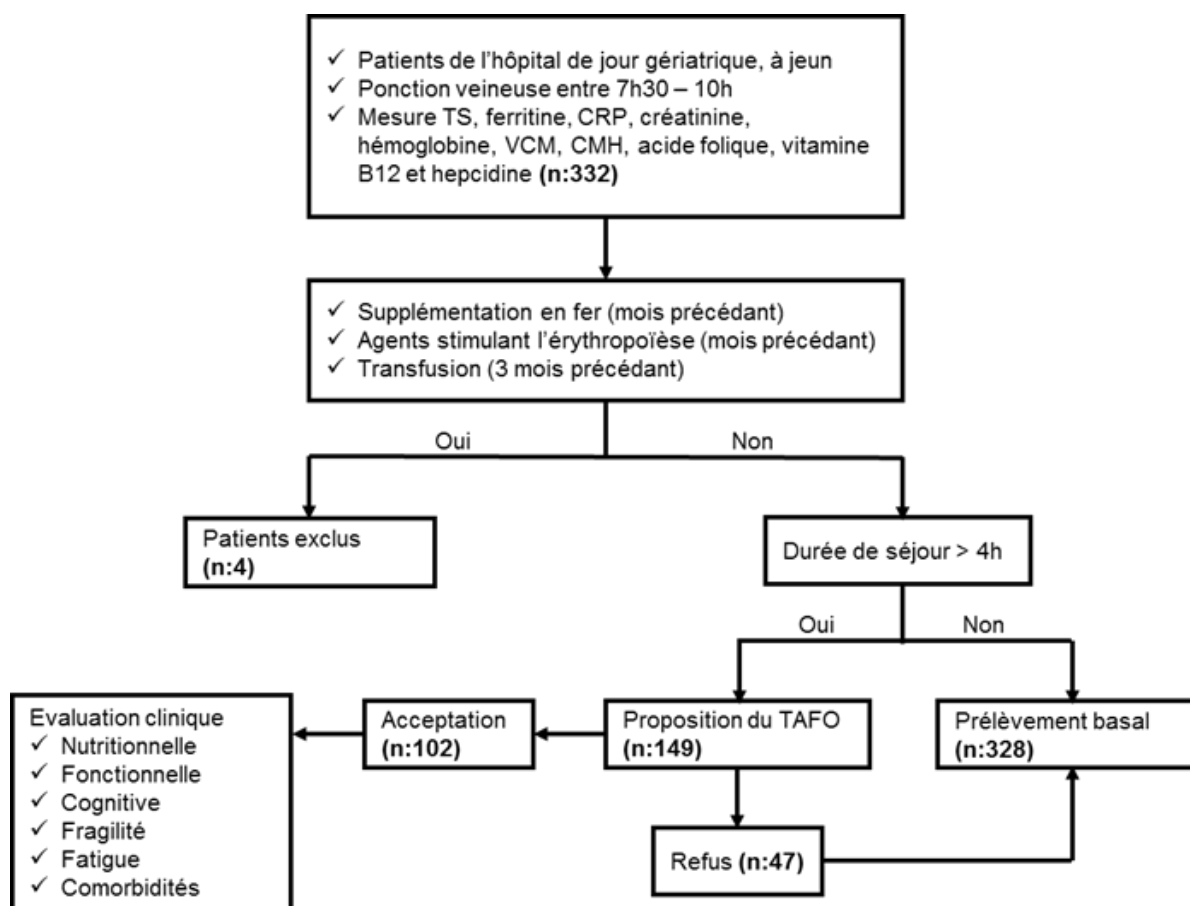


Figure 12 : Protocole de l'étude réalisée à l'hôpital de jour gériatrique de l'hôpital Erasme entre mai 2014 et décembre 2016. TS : saturation de la transferrine, CRP : protéine C-réactive, VCM : volume corpusculaire moyen, CMH : concentration moyenne en hémoglobine, TACO : test d'absorption en fer oral.

### 3.2.4.2 Classification des anémies

L'anémie a été définie selon les critères de l'organisation mondiale de la santé comme étant une concentration en Hb inférieure à 12 g/dL pour les femmes et inférieure à 13 g/dL pour les hommes (Nutritional anaemias, 1968). Les anémies (IDA, IDA/ACD, ACD) ont été différenciées sur base de critères cliniques et biochimiques (Tableau 2) définis par Theurl et al (Theurl et al. 2009), sur base de la concentration en ferritine en l'absence (Joosten et al. 1991) ou en présence d'un syndrome inflammatoire (Busti et al. 2014) et sur base du rapport entre la concentration en récepteur soluble de la transferrine et le logarithme du taux de ferritine (index sTfR/log ferritine) (Thomas et al. 2011).

Les patients avec anémie et présentant des paramètres biochimiques dans les valeurs de référence et sans signe clinique ou biochimique d'inflammation (CRP<5 mg/L) ont été classés dans le groupe des anémies inexpliquées. Une carence en fer latente (ID)



a été définie par un taux de ferritine inférieur à 50 µg/L sans anémie. Un déficit en vitamine B12 ou folates a été considéré pour des concentrations respectives inférieures à 180 ng/L et 4 µg/L (Joosten 2004). L'anémie liée à une maladie rénale chronique a été considérée pour un taux de filtration glomérulaire calculé sur base de la formule CKD-EPI (Ivey et al. 2009) inférieur à 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> et a été incluse dans le groupe ACD (Price et al. 2011).

Tableau 2 : Critères cliniques et biochimiques utilisés pour le diagnostic différentiel des anémies (anémie liée à une carence martiale : IDA, anémie liée à une maladie chronique : ACD, anémie combinée : IDA/ACD).

IDA	IDA/ACD	ACD
Ferritine < 50 µg/L Absence de signe biochimique (CRP < 5 mg/L) et clinique d'inflammation	CRP ≥ 5 mg/L Infection chronique, maladie auto-immune ou malignité et au moins 1 des 2 conditions suivantes : 1) Ferritine <100 µg/L 2) Ferritine >100 µg/L avec index sTfr/log ferritine >2	Ferritine >100 µg/L Index sTfr/log ferritine ≤2 CRP ≥ 5 mg/L Infection chronique, maladie auto-immune ou malignité

### 3.2.4.3 Mesure de l'hepcidine

La quantification de l'hepcidine plasmatique a été réalisée selon la même technique que celle décrite dans la deuxième partie du projet, à l'exception du calibrateur et STDI qui proviennent de la firme Peptide Institute. La détermination des transitions optimales pour le calibrateur et le STDI a été effectuée par infusion directe d'une solution à une concentration finale de 15000 nmol/L dans 50/50/0,1 (v/v/v) MeOH/eau/AF. Les transitions choisies pour la quantification de l'hepcidine et le STDI sont respectivement 698,1 → 354 (b3) et 703,1 → 354,1 (b3).

L'hepcidine présente une forme en épingle à cheveux stabilisée par 4 ponts disulfures (Hunter et al. 2002) dont la fragmentation peut être inefficace. Les ions produits choisis pour la quantification par spectrométrie de masse sont les résidus N-terminaux de

l'hepcidine, démontrés comme présentant la fragmentation la plus reproductible en cours de transition (Hwang et al. 2011).

La limite de quantification est de 0,4 nmol/L. La précision intermédiaire a été évaluée par analyse de pools patients normaux et élevés durant 10 jours. Le CV total obtenu est de 12,9% et 9,6% pour des concentrations moyennes respectives de 4,2 nmol/L et 14,4 nmol/L.

#### 3.2.4.4 Tests statistiques utilisés

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du programme GraphPad Prism, version 5.0 (La Jolla, USA). Les cinétique de la TS et de l'hepcidine observées pour les volontaires sains ayant ou n'ayant pas eu le test d'absorption en fer oral, ont été analysées par une analyse de variance pour mesures répétées, distribuées de manière gaussienne, avec un post test de Tukey. Les différences de taux d'hepcidine observées entre les sexes ont été investiguées à l'aide d'un test de Mann-Whitney (variables continues non paires non gaussiennes). Les analyses de régression linéaire multivariable ont été utilisées pour évaluer l'association entre la concentration basale en hepcidine et les paramètres hématologiques ainsi que biochimiques. Les coefficients  $\beta$  sont rapportés sous forme de moyenne et d'IC 95%. Les différences des taux d'hepcidine observés entre les groupes ont été analysées par un test d'analyse de variance pour données non paramétriques (Kruskal-Wallis) avec un post test de Dunns. Le coefficient de Spearman, rho, a été calculé pour évaluer les corrélations entre les données continues non-gaussiennes. L'efficacité diagnostique de l'hepcidinémie basale pour l'identification d'une carence martiale lors d'anémie a été évaluée par analyse ROC. La différence de l'augmentation relative de la TS, 4h après la dose de fer oral, entre les patients avec carence en fer et sans, a été déterminée à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

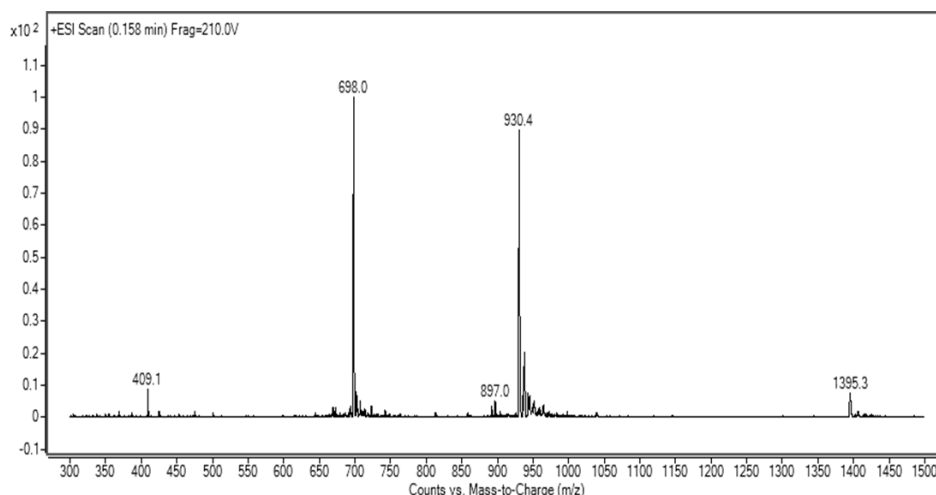
## 4 Résultats et discussion

### 4.1 Développement d'une technique de dosage de l'hepcidine sérique et urinaire : aspects pré-analytiques et analytiques

#### 4.1.1 Etablissement des transitions optimales et des paramètres du spectromètre pour la quantification par MS/MS

La quantification de l'hepcidine par spectrométrie de masse sur le 6460 triple quadropôle a été réalisée avec une source d'ionisation de type electrospray opérant en mode positif. La température de la source et le débit gazeux ont été placés à 325°C et 10 L/min, respectivement. La pression du nébuliseur était à 40 psi. La température du sheath gas et son débit étaient à 350°C et 9 L/min. En utilisant le mode « full scan », l'ion  $[M+4H]^{4+}$  pour un rapport  $m/z$  à 698, et l'ion  $[M+3H]^{3+}$ , pour un rapport  $m/z$  à 930,4, constituaient les ions précurseurs de l'hepcidine ayant l'intensité la plus élevée (Figure 13A). La transmission maximale des ions précurseurs, triplement et quadruplement chargés, a été observée pour un voltage du fragmenteur à 210 V. L'infusion de la solution aqueuse de l'hepcidine marquée aux isotopes a fourni des résultats similaires avec une prédominance de l'ion  $[M+4H]^{4+}$ , avec un rapport  $m/z$  à 701,7, et de l'ion  $[M+3H]^{3+}$ , avec un rapport  $m/z$  à 935,1 (Figure 13B). Les ions  $[M+3H]^{3+}$  pour l'hepcidine et son standard marqué ont été choisis comme « ions précurseurs » pour la quantification par spectrométrie de masse. Les énergies de collision ont ensuite été optimisées pour l'hepcidine et son standard marqué de manière à obtenir des fragments spécifiques. Cette sélection de l'énergie de collision optimale pour chaque ion parent a été réalisée en mode « product ion ». La fragmentation de l'ion  $[M+3H]^{3+}$  avec un  $m/z$  à 930,4 a donné naissance à divers ions « produits ». L'ion avec un rapport  $m/z$  à 1144,9 ( $y_{21}[2+]$ , figure 14) était le plus intense pour une énergie de collision fixée à 29 eV et, a été sélectionné pour la quantification de l'hepcidine (quantifier). Un ion produit moins abondant avec un  $m/z$  équivalent à 353,7 ( $b_3$ , figure 14) obtenu pour une énergie de collision à 33 eV, a été choisi pour augmenter la spécificité de la mesure de l'hepcidine (qualifier). Les transitions suivantes ont été utilisées pour la quantification (930,4→1144,9) ainsi que la qualification (930,5→353,7) de l'hepcidine et la quantification du STDI (935,1→1151,6).

A:



B:

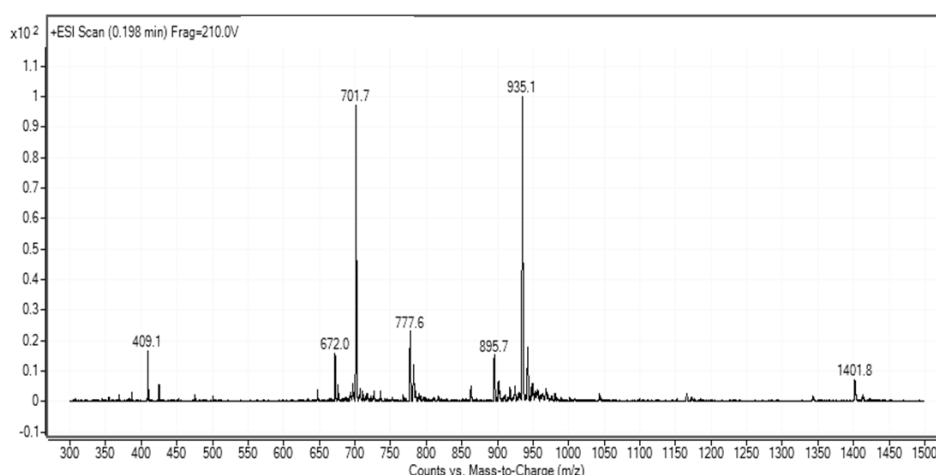


Figure 13 : Abondance relative des ions précurseurs obtenus pour l'hepcidine (A) et son STDI (B) en mode « full scan ». Les ions  $[M+4H]^{4+}$  et  $[M+3H]^{3+}$  présentaient l'intensité la plus importante.

#### 4.1.2 Impact de la nature du vial utilisé pour la réalisation des solutions de travail

L'intensité de la transition sélectionnée pour la quantification de l'hepcidine est diminuée lorsque les solutions aqueuses sont conservées dans des tubes en verre ou en plastique comparativement aux vials en polypropylène. Cette réduction de l'intensité de la transition mesurée est dépendante de la concentration de la solution de travail. En effet, des intensités comparables sont obtenues pour les solutions aqueuses 20/80/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/FA contenant 1000 nmol/L d'hepcidine que ces dernières soient placées dans un vial en polypropylène ou dans un tube en plastique. Une décroissance légère mais significative de l'intensité de la transition pour l'hepcidine (-4,9% ;  $\pm 1,2\%$ ) est objectivée pour les tubes en verre (test de Friedman,  $p < 0.05$ ).



Figure 14 : Fragmentation de l'hepcidine avec les ions produits mesurés (y21[2+] et b3)

Pour une solution de travail à 50 nmol/L d'hepcidine dans 20/80/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/FA, une forte décroissance du signal est mise en évidence pour le tube en verre (-88,3% ;  $\pm 1,8\%$ ) suivi du tube en plastique (-10,1% ;  $\pm 5,0\%$ ) par rapport aux vials en polypropylène (test de Friedman,  $p < 0.05$ ).

#### 4.1.3 Optimisation de la séparation chromatographique

La séparation a été réalisée sur une colonne X-Terra, fournissant la meilleure résolution chromatographique. Des bouchages fréquents ont été observés avec la colonne Zorbax ; ces obturations répétées pouvant être expliquées par la capacité d'adsorption importante de l'hepcidine et par la porosité plus faible de la colonne (80Å pour la Zorbax versus 125Å pour X-Terra). L'X-Terra est une colonne hybride, permettant une séparation adéquate pour les composés basiques. Dans notre méthode, la colonne a été thermostatée à 30°C, de façon à standardiser les conditions chromatographiques sans risquer de dégrader le peptide thermolabile. Les phases mobiles utilisées après dégazage, sont composées de 0,1% de FA dans l'eau (phase A) et de 0,1% de FA dans un mélange 90/10 (v/v) ACN/eau (phase B) et délivrées à un débit de 0,4 mL/min. Le gradient utilisé pour la séparation chromatographique a été modifié sur base du gradient initialement décrit par Houbart et al (Houbart et al. 2011) et est mentionné dans le tableau 3.

Tableau 3: Gradient utilisé pour la quantification de l'hepcidine avec la colonne X-Terra. Ce gradient, initialement décrit par Houbart et al (Houbart et al. 2011), a été adapté afin d'obtenir la meilleure résolution chromatographique.

<u>Temps</u>	<u>Phase A</u>	<u>Phase B</u>
<b>0 minute</b>	85	15
<b>5 minutes</b>	5	95
<b>10 minutes</b>	5	95
<b>11 minutes</b>	85	15
<b>14 minutes</b>	85	15

Le volume d'extrait injecté dans le système HPLC est de 25  $\mu$ L. L'aiguille de l'injecteur a été rincée durant 10 secondes avec une solution 60/40/0,1 (v/v/v) ACN/eau/TFA. Dans ces conditions de séparation chromatographique, le pourcentage de carry-over mesuré par analyses successives du standard de calibration à 100 nmol/L suivi du blanc, est de 0.3% ( $\pm 0.03\%$ ). L'hepcidine et son STDI présentent un temps de rétention de 3,51 minutes. Les figures 15B et 15D illustrent respectivement les chromatogrammes obtenus en mode MRM pour un standard de calibration urinaire et sérique enrichi avec 5 nmol/L d'hepcidine. L'absence d'hepcidine dans le pool urinaire (Figure 15A) et le pool sérique (Figure 15C) utilisés pour la constitution des SCs et VSs a été vérifiée par spectrométrie de masse.

#### 4.1.4 Rendement d'extraction

Les moyennes (déviations standard) des rendements d'extraction obtenus sur colonnes HLB sont respectivement 64,7% (4,4%) et 65,9% (2,9%) pour des pools sériques enrichis à 5 et 50 nmol/L et 21,3% (2,5%) et 22,6% (2,3%) pour des pools urinaires enrichis à 5 et 50 nmol/L.

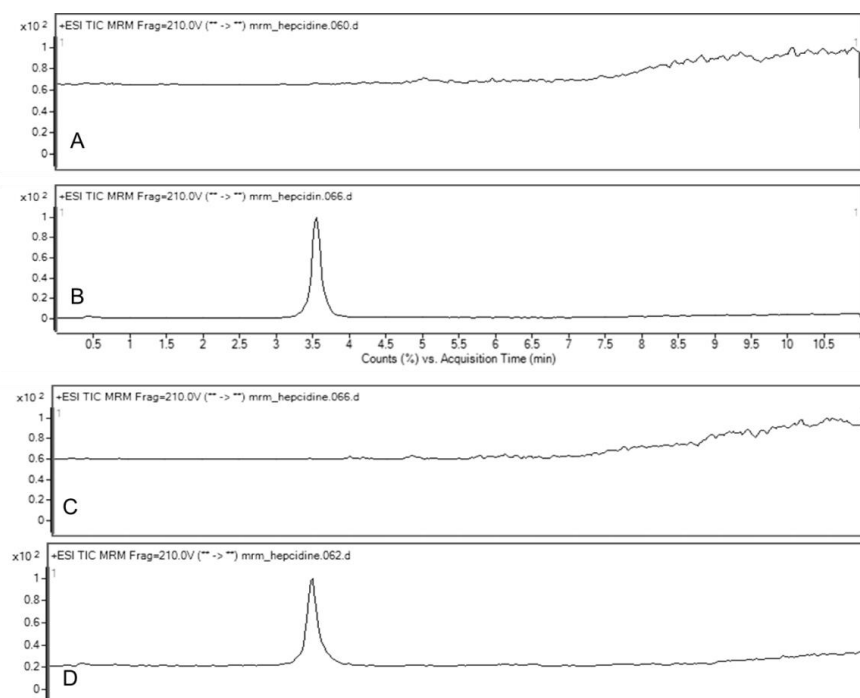


Figure 15 : Chromatogrammes obtenus en mode « multiple reaction mode». Les figures 15 A et C représentent respectivement le pool urinaire et sérique utilisés pour la constitution des standards de calibration et validation, avec absence de signal au temps de rétention correspondant à l'hepcidine et à son STDI. Les figures 15 B et D illustrent respectivement les chromatogrammes d'un pool urinaire et sérique enrichi avec 5 nmol/L d'hepcidine.

#### 4.1.5 Validation de la méthode

La méthode développée a permis de quantifier l'hepcidine avec la justesse et précision requises dans la gamme de concentrations suivante : entre 0,77 et 200 nmol/L pour la matrice urinaire et entre 0,48 et 100 nmol/L pour la matrice sérique.

Les résultats de la justesse, précision ainsi que de la linéarité sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Critères de performance analytique (justesse, précision et linéarité) obtenus sur matrice urinaire et sérique pour la mesure de l'hepcidine. Les standards de calibration ont été quantifiés à 7 concentrations différentes: 0,5, 1, 2, 5, 25, 100 et 200 nmol/L pour l'urine et 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 25 et 100 nmol/L pour le sérum. Les courbes de calibration ont été réalisées sur base d'une régression quadratique pondérée 1/x.

Urine					Sérum			
Concentration (nmol/L)	Moyenne (nmol/L)	Biais Relatif (%)	CV répétabilité (%)	CV précision intermédiaire (%)	Moyenne (nmol/L)	Biais Relatif (%)	CV répétabilité (%)	CV précision intermédiaire (%)
0,25	-	-	-	-	0,29	15	41,3	41,3
0,5	0,56	12,5	13,1	13,9	0,51	2,6	7,2	11
1	0,95	-5,4	7,6	9,4	0,98	-1,6	9,1	9,5
2	1,83	-8,3	6,9	7,6	2,04	2,1	6,5	7,7
5	4,46	-10,8	4,1	5,3	4,92	-1,6	5,7	6
25	21,01	-4	5,7	5,7	24,4	-2,6	7,4	7,4
100	92,99	-7	7,4	7,4	101,9	1,9	1,7	1,7
200	190,3	-4,9	5	5	-	-	-	-
	Pente		Intervalle de confiance à 95%		Pente		Intervalle de confiance à 95%	
	0,948		(0,935-0,962)		1,018		(1,012-1,025)	

#### 4.1.6 Etablissement de l'intervalle de référence

Parmi les 108 volontaires prélevés entre 8h00 et 11h00 pour établir les valeurs de référence de l'hepcidinémie, 18 ont été exclus pour une carence en fer absolue. Tous les volontaires sains inclus avaient un taux de filtration glomérulaire supérieur à 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Les résultats des paramètres hématologiques et biochimiques de la population (n=90, âge médian 48 ans, intervalle : 25-65, 65 femmes, 25 hommes) ayant servi à établir les valeurs de référence pour l'hepcidine sont décrits dans le tableau 5.

Tableau 5: Paramètres biologiques (hepcidine-25, ferritine, fer, transferrine, TS : saturation de la transferrine, CRP : protéine C-réactive et hémoglobine) obtenus pour les 90 volontaires sains. Les valeurs sont représentées sous forme de médiane, percentile 2,5 et 97,5.

Variables (Unités)	Hepcidine-25 (nmol/L)	Ferritine (µg/L)	Fer (µg/dL)	Transferrine (mg/dL)	TS (%)	CRP (mg/L)	Hémoglobine (g/dL)
<b>Médiane</b>	6,0	88	85	256	27	1,1	13,9
<b>Percentile 2.5</b>	1,5	33	47	201	13	0,2	12,1
<b>Percentile 97.5</b>	15,2	345	194	350	51	15	15,8

L'intervalle de référence à 95% calculé pour l'hepcidine est de 1,5 à 15,2 nmol/L. Une différence légère mais statistiquement significative a été observée entre les sexes avec des concentrations plus basses pour les femmes (5,5; 1,6-15,6 nmol/L) comparativement aux hommes (7,2; 2,1-15,1 nmol/L) (p<0,05, figure 16). En considérant une valeur seuil de 50 ans pour établir le statut ménopausal (Itkonen et al. 2012b, Galesloot et al 2008) aucune différence des taux d'hepcidine n'est objectivée entre les femmes d'un âge inférieur ou égal à 50 ans (5,4; 1,8-17,8 nmol/L; n : 46) et celles de plus de 50 ans (6,3; 1,5-13 nmol/L ; n : 19).



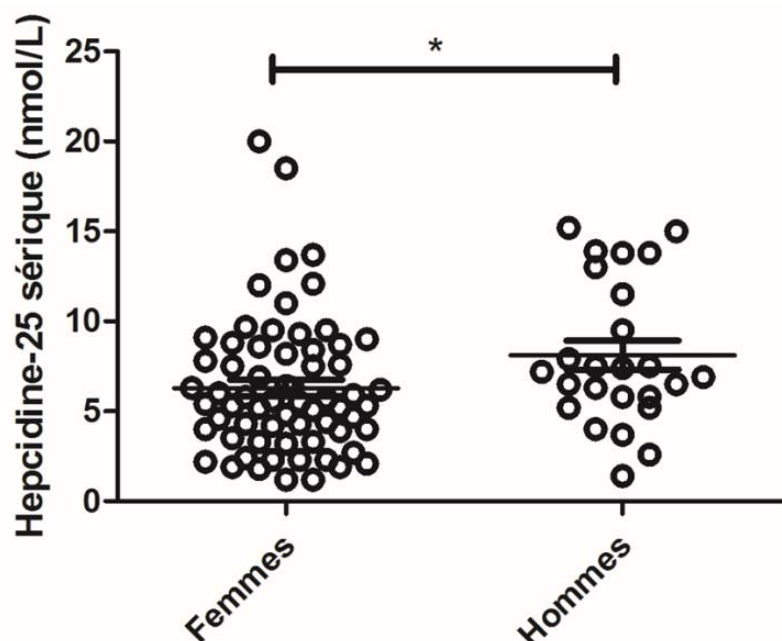
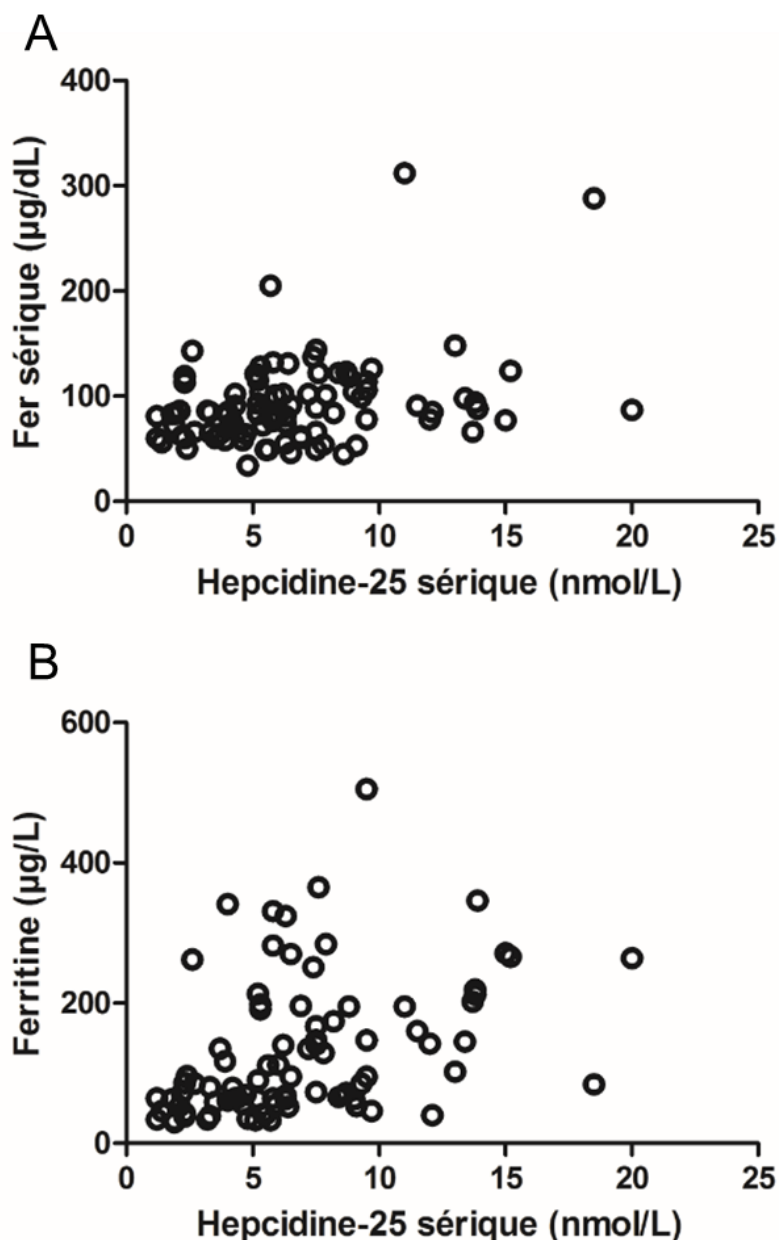


Figure 16 : Différences de concentrations sériques en hepcidine observées entre les volontaires de sexe féminin (5,5; 1,6-15,6 nmol/L) et masculin (7,2; 2,1-15,1 nmol/L), n :90.

#### 4.1.7 Paramètres biochimiques et hématologiques associés à l'hepcidinémie

Après analyse par régression linéaire univariable, les taux de créatinine, fer, ferritine, Hb ainsi que la TS sont associés positivement aux concentrations en hepcidine. Une association négative est mise en évidence pour la transferrine. Après analyse multivariable, seules les associations positives entre les concentrations en fer sérique et l'hepcidinémie [ $\beta_1=0,025$  (IC95% : 0,008 à 0,041;  $p < 0.05$ ), d'une part et les concentrations en ferritine et hepcidine [ $\beta_2=0,019$  (IC95% : 0,012 à 0,026;  $p < 0,0001$ ), d'autre part, ont été maintenues avec des coefficients respectifs de Spearman, rho, de 0,311 et 0,494 (Figures 17A et 17B).



Figures 17A et 17B : Corrélations obtenues entre les taux d'hepcidine et la concentration en fer sérique, d'une part (A) et la concentration en ferritine, d'autre part (B). Les coefficients de Spearman rho calculés sont respectivement de 0,311 et 0,494 (n :90).

#### 4.1.8 Calcul du coefficient d'excrétion rénale de l'hepcidine

Parmi les 48 paires urine-sérum collectées au même moment chez les volontaires sains, cinq ont été exclues pour carence martiale absolue. La médiane (P2,5-P97,5) obtenue pour l'hepcidine urinaire est de 2,1 (0,4-7,3) nmol/mmol de créatinine. Le coefficient d'excrétion rénale calculé pour l'hepcidine se situe entre 0,6 et 14,6% (P2,5-P97,5) avec une médiane à 2,3%, signifiant que l'hepcidine filtrée au niveau du glomérule pourrait être réabsorbée à 85,4-99,4%. Les taux d'hepcidine sérique étaient

significativement corrélés aux taux urinaires avec un coefficient de Spearman rho de 0,414 ( $p < 0,05$ , figure 18).

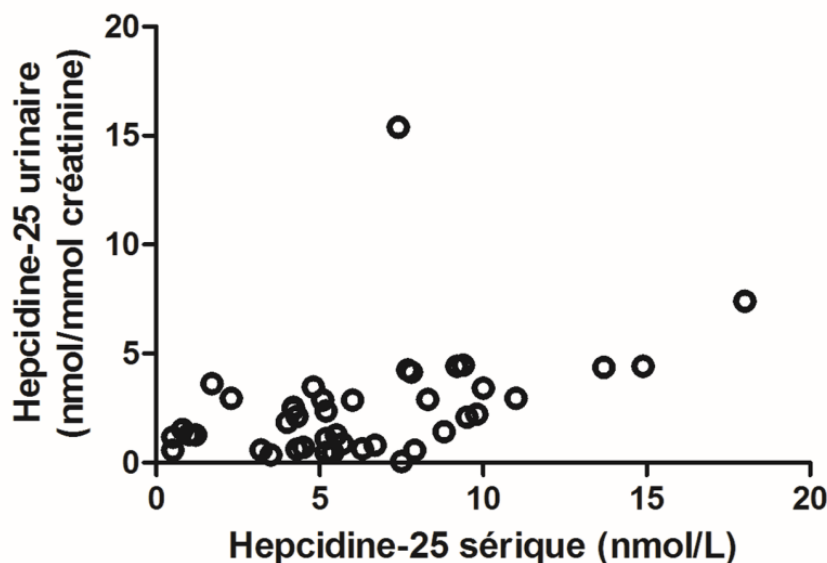


Figure 18 : Coefficient de Spearman rho, calculé à 0,414 entre les taux d'hepcidine sérique et urinaire,  $n : 43$ .

#### 4.1.9 Quantification de l'hepcidine dans la carence martiale absolue

Des valeurs d'hepcidinémie significativement plus basses sont observées pour les 29 individus présentant une carence martiale absolue, qu'elle soit associée ou pas à une anémie, par rapport aux 90 volontaires sains (test de Mann-Withney ;  $p < 0,0001$ , figure 19).

Des concentrations inférieures à la limite de quantification (0,48 nmol/L) ont été identifiées chez 18 de ces individus, les 11 autres présentant des concentrations en hepcidine oscillant entre 0,5 et 2 nmol/L.

#### 4.1.10 Etude des variables pré-analytiques sur la mesure de l'hepcidine sérique et urinaire

##### 4.1.10.1 Impact du tube primaire

Alors que les taux d'hepcidine sont identiques sur séra et plasmas héparinés ( $p > 0,05$ ,  $n : 15$ ), des concentrations en hepcidine significativement plus élevées sont obtenues sur plasmas EDTA avec des taux en moyenne augmentés de 10,5% par rapport au séra ( $p < 0,05$ ,  $n : 15$ ) et de 8,4% par rapport au plasmas héparinés (test d'analyse de variance pour mesures répétées ;  $p < 0,05$ ,  $n : 15$ ). Les concentrations en hepcidine ne sont pas significativement différentes sur sérum que ce dernier ait été prélevé avec ou sans gel séparateur (test de Student païré ;  $p > 0,05$ ,  $n : 10$ ).

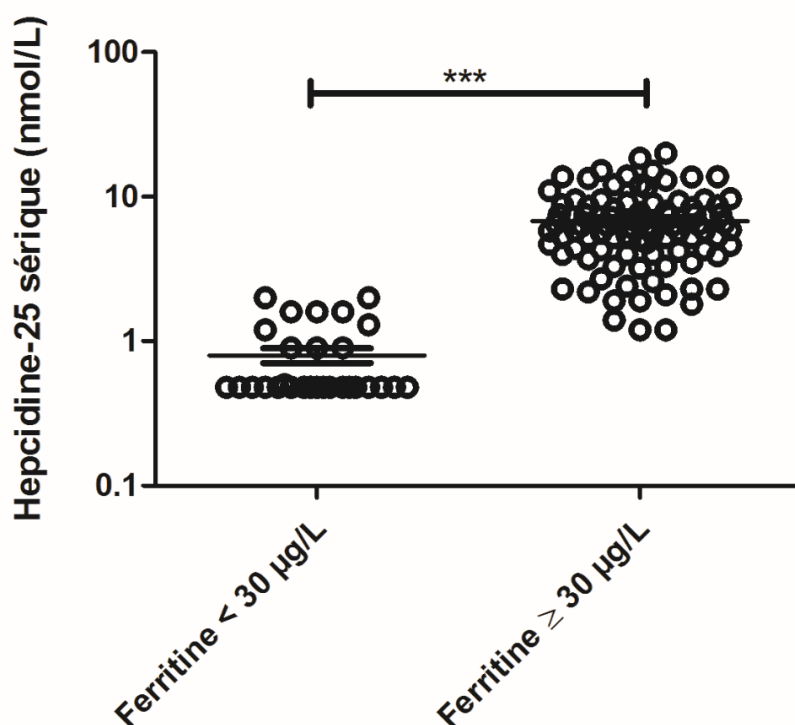


Figure 19 : Les individus avec une carence martiale (ferritine sérique < 30  $\mu\text{g/L}$ ) présentaient des concentrations en hepcidine sérique (1,3; 0,6-2 nmol/L, n :29) significativement plus basses par rapport aux volontaires sains (6; 1,5-15,2 nmol/L, n :90).

#### 4.1.10.2 Impact de l'aliquot secondaire

Le sérum peut être aliquoté secondairement dans un tube en plastique ou dans un tube en verre sans observer de différence significative au niveau des concentrations ( $p > 0,05$ , n :7). Par contre, lorsque l'urine est placée dans un tube en plastique avant congélation, une décroissance moyenne de 30,3% (déviation standard : 6,0%) est objectivée par rapport aux tubes en verre ( $p < 0,05$ , n :5).

#### 4.1.10.3 Impact de la température, de la durée de stockage du tube primaire et de l'aliquot secondaire

La concentration en hepcidine sur sérum reste stable sur aliquot secondaire en plastique durant 24h à  $T^\circ$  ambiante. Les taux d'hepcidine restent inchangés par rapport au prélèvement basal lorsque le tube primaire est conservé durant 3 jours ou 6 jours à  $4^\circ\text{C}$  (test de Friedman,  $p > 0,05$ ). L'impact de la température et de la durée de stockage sur les taux sériques d'hepcidine sont décrits dans la figure 20.

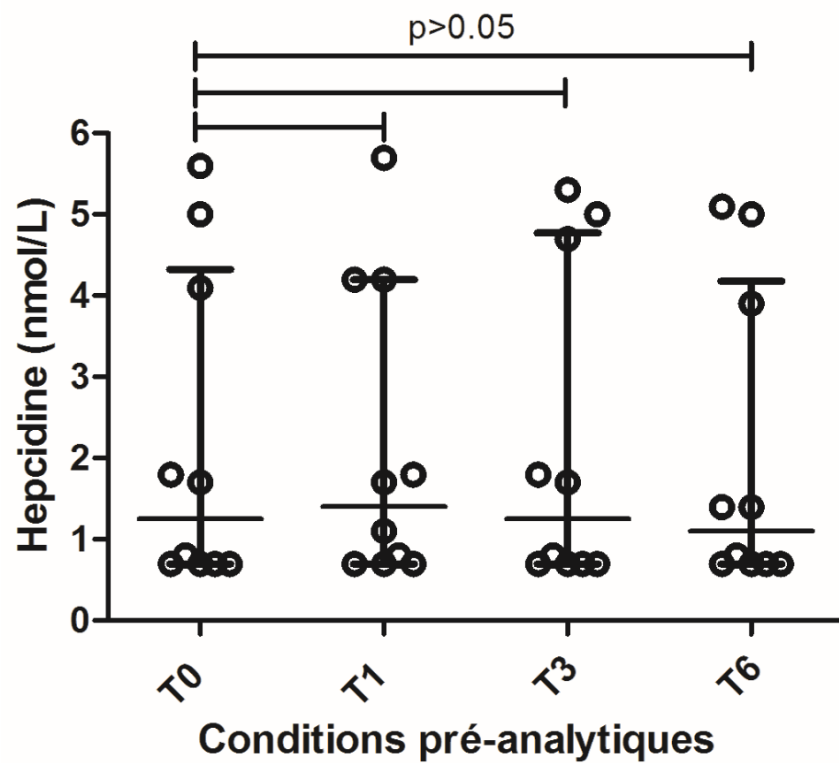


Figure 20 : Evolution des concentrations sérique en hepcidine selon les conditions pré-analytiques ; T0 : prélèvement basal, T1 : aliquot conservé à température ambiante durant 24 heures, T3 : tube primaire conservé à 4°C durant 3 jours, T6 : tube primaire conservé à 4°C durant 6 jours. Aucune différence significative n'est observée pour la concentration sérique en hepcidine quelles que soient les conditions pré-analytiques.

#### 4.1.11 Discussion

Dans la première partie de cette thèse, une méthode de quantification de l'hepcidine a été développée sur sérum et urine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La mise au point de cette technique est compliquée par la capacité du peptide à s'agréger et à s'adsorber sur divers matériaux. L'hepcidine est également sensible aux phénomènes d'oxydation (Abbas et al. 2018). Ces caractéristiques sont à l'origine d'un taux de récupération faible pour les procédures d'extraction ainsi qu'un risque élevé de carry-over (Hunter et al. 2002).

L'ion précurseur fournissant l'intensité la plus élevée a été sélectionné et les conditions de fragmentation de ce dernier, ajustées de manière à obtenir le signal le plus intense pour l'ion produit. Deux ions produits sont choisis pour la mesure de l'hepcidine ; celui présentant l'intensité la plus élevée est sélectionné pour la quantification ( $m/z$  : 1144,9), l'autre, d'intensité moindre, est choisi pour augmenter la spécificité de la mesure de l'hepcidine ( $m/z$  : 353,7). Les transitions ainsi utilisées pour la quantification de l'hepcidine et de son standard marqué sont respectivement 930,4→1144,9 et 935,1→1151,6. Les ions précurseurs décrits dans les différentes techniques utilisant la spectrométrie de masse sont les peptides chargés triplement  $[M+3H]^+$  (Kobold et al. 2008, Bansal et al. 2009, Abbas et al. 2018), quadruplement  $[M+4H]^+$  (Houbart et al. 2011, Hwang et al. 2011, Itkonen et al. 2012) ou quintuplement  $[M+5H]^+$  (Vialaret et al. 2018).

La nature du récipient utilisé pour la réalisation des solutions de travail impacte l'intensité de la transition sélectionnée pour la quantification de l'hepcidine. Une réduction significative du signal de l'hepcidine est observée lorsque les solutions aqueuses sont réalisées dans un tube en verre suivi du tube en plastique par rapport à un vial en polypropylène. Cette diminution du signal est dépendante de la concentration finale en hepcidine avec un impact nettement plus marqué pour les solutions diluées. Le polypropylène semble limiter la propension de l'hepcidine à s'adsorber. Ce type de vial a été utilisé de manière constante tout au long du développement de notre technique pour la réalisation des solutions stocks, des solutions de travail et des standards de calibration et de validation.

Différentes solutions (eau versus 20/80/0,1 (v/v/v) ACN/eau/FA) ont été testées pour la reconstitution de l'hepcidine lyophilisée lors de la réalisation des solutions stocks (résultats non décrits). Une décroissance moyenne de 50% est objectivée au niveau

des concentrations en hepcidine mesurées lorsque l'eau est utilisée comme liquide de reconstitution par rapport à la solution 20/80/0,1 (v/v/v) ACN/eau/FA. Des résultats similaires ont été décrits par plusieurs équipes. Ces dernières préconisent l'utilisation d'une solution aqueuse contenant un pourcentage d'ACN supérieur ou égal à 20% pour la reconstitution de l'hepcidine lyophilisée (Bansall et al. 2008, Laarakkers et al. 2013). Des solutions acides contenant un pourcentage d'au moins 20% de solvant organique sont optimales pour l'hepcidine : l'acidité permet d'augmenter la solubilité du peptide et son ionisation alors que le solvant organique permet de limiter les phénomènes d'adhésion (Abbas et al. 2018). La solution 20/80/0,1 (v/v/v) ACN/eau/FA a donc été utilisée pour la réalisation des solutions stocks et des solutions de travail aqueuses.

La composition des phases mobiles ainsi que le choix du gradient utilisés pour la séparation chromatographique se sont basés sur les résultats d'Houbart et al. Cet auteur a évalué l'impact d'une série de variables (nature du solvant organique, proportion initiale d'ACN, gradient et proportion d'acide formique ajouté) sur la qualité de la séparation chromatographique. Les conditions optimales pour obtenir l'aire maximale, la largeur de pic minimale ainsi que le risque de carry-over le plus faible, sont une proportion initiale d'ACN équivalente à 15%, une augmentation du taux d'ACN à 90% en 5 minutes ainsi que l'ajout de 0,1% d'AF dans les phases mobiles (Houbart et al. 2011). Ces conditions ont donc été sélectionnées pour initier notre séparation chromatographique. Une largeur de pic moindre est observée en augmentant la proportion d'ACN à 95% en 5 minutes au lieu de 90%. Notre gradient a été maintenu 5 minutes supplémentaires de manière à débarrasser la colonne des impuretés éventuelles et, a été suivi d'une phase de rééquilibration aux conditions initiales, de 3 minutes.

L'hepcidine présente un point isoélectrique de 8,2. Pour la séparation chromatographique, une colonne échangeuse ionique aurait pu être utilisée pour isoler un peptide basique comme l'hepcidine. Néanmoins la faible stabilité de ce type de colonne risquait l'altérer la robustesse de la méthode de quantification (Abbas et al. 2018). Notre choix s'est donc porté sur une colonne en phase inverse hybride, adaptée pour la séparation des bases faibles et permettant l'obtention d'une bonne résolution chromatographique.

Pour l'extraction des échantillons, plusieurs techniques ont été évaluées (résultats non présentés). La précipitation protéique par ACN suivie de la séparation et de l'évaporation du surnageant avec reconstitution du résidu sec avant injection dans le système chromatographique a été rapidement abandonné. En effet, des bouchages très fréquents de la colonne X-Terra ont été observés. Le protocole d'extraction décrit par l'équipe de Bansal et al. utilisant des particules magnétiques échangeuses cationiques a également été testé. Cette technique séparative nous a semblé laborieuse avec l'utilisation d'un séparateur magnétique unique ralentissant considérablement la procédure d'extraction. La séparation du sérum des particules magnétiques, préalablement activées, s'est avérée compliquée suite à la localisation latérale de l'aimant. Lors de l'aspiration du sérum, de nombreuses particules magnétiques étaient entraînées malgré les précautions prises pour limiter les turbulences. Lorsque notre choix s'est dirigé vers l'extraction en phase solide, nous avons eu l'occasion de tester 3 types de colonnes fournies par la firme Waters ; les colonnes MCX (support en mode mixte échange de cations / phase inverse pour bases) pour extraction de dérivés basiques avec pKa entre 2 et 10, les colonnes MAX (support en mode mixte échange d'anions / phase inverse pour les acides) pour extraction d'acides avec pKa compris entre 2 et 8 et finalement, les colonnes HLB. En utilisant le protocole d'extraction fourni par la firme, les meilleurs rendements de récupération ont été obtenus sur les colonnes HLB. Le protocole d'extraction a ensuite été amélioré sur base de la technique décrite par Li (Li et al. 2009). Les seuls paramètres modifiés ont été l'utilisation de macro-colonnes, à la place d'une plaque micro-élutive, la composition du solvant d'élution (méthanol avec 0,1% d'AF) ainsi que la composition du liquide de reprise du résidu sec (33,8/66,2/0,1 (v/v/v) d'ACN/eau/TFA). Pour un rendement d'extraction identique, une évaporation plus rapide a été atteinte en utilisant du méthanol contenant 0,1% d'AF. L'élution la plus efficiente a été obtenue après 3 passages de 400 µL de méthanol contenant 0,1% d'AF. La composition du liquide de reprise a été choisie sur base des résultats décrits par Houbart et al ayant démontré que l'ajout de TFA à 0,1% ainsi que la proportion d'ACN fixée à 33,8% permettaient l'obtention de l'aire de pic la plus intense et du risque de carry-over le plus faible (Houbart et al. 2011). Les rendements d'extraction ainsi obtenus via cette technique modifiée sont plus élevés que 64,7%, ceux-ci étant proches des taux de récupération supérieurs à 60,4% décrits par Li et al (Li et al. 2009).



Après optimisation de l'ensemble de ces paramètres, la validation de notre méthode pour une matrice urinaire et sérique s'est effectuée par l'utilisation des profils d'exactitude. Les critères de fiabilité analytique obtenus sont dans les limites d'acceptation préalablement fixées ( $\pm 30\%$ ). Les limites de quantification déterminées sur ces deux matrices (0,77 et 0,48 nmol/L, respectivement) sont comprises dans les limites rapportées par différents auteurs pour les techniques de spectrométrie de masse ; celles-ci oscillant entre 0,3 et 0,9 nmol/L (Kobold et al. 2008, Bansal et al. 2009, Hwang et al. 2011, Li et al. 2009, Itkonen et al. 2012b). Houbart et al a développé une technique de chromatographie nano-liquide couplée à la spectrométrie excessivement sensible pour la mesure de l'hepcidine sérique avec une limite de quantification à 0,03 nmol/L (Houbart et al. 2011).

Le choix d'un pool urinaire et sérique traité par charbon actif comme matrice de reconstitution pour les standards de calibration et de validation s'est basé sur la technique décrite par Bansal et al (Bansal et al. 2009, Bansal et al. 2010). L'absence d'hepcidine dans le pool urinaire et sérique a été vérifiée. D'autres matrices sont décrites dans la littérature pour la réalisation des standards de calibration lors du dosage de l'hepcidine sérique par spectrométrie de masse : sérum de lapin (Lefebvre et al. 2015) ou de chèvre (Vialaret et al. 2018). Certains auteurs critiquent le manque de reproductibilité des séra humains commerciaux (Lefebvre et al. 2015). En cours d'évolution de notre méthode, plusieurs calibrations ont été réalisées dans des pools sériques différents, traités au charbon actif, sans noter de différence notable au niveau des signaux mesurés pour l'hepcidine et son standard interne.

Vu la variation circadienne importante de l'hepcidine (Kroot et al. 2009), les heures de prélèvements pour l'établissement des valeurs de référence sur sera ont été standardisées entre 8h et 11h. Les volontaires présentant une carence martiale ou un syndrome inflammatoire ont été exclus étant donné l'impact de ces stimuli sur la transcription de l'hepcidine (Girelli et al. 2016). Les individus ayant une altération de la fonction glomérulaire n'ont pas été inclus non plus, compte tenu de la relation inverse rapportée entre les valeurs d'hepcidinémie et le taux de filtration glomérulaire (Troutt et al. 2013).

L'intervalle de référence calculé sur notre population locale est situé entre 1,5 et 15,2 nmol/L. Ces valeurs sont proches de celles rapportées par Itkonen et al, à savoir de 0,4 à 9,2 nmol/L pour des femmes âgées entre 18 et 50 ans et de 1,1 à 15,6 nmol/L

pour des hommes de plus de 18 ans (Itkonen et al. 2012b). Des valeurs de référence statistiquement plus élevées pour l'hepcidinémie ont été décrites par cette même équipe pour les femmes de plus de 50 ans (0,7 à 16,8 nmol/L) par rapport aux femmes de moins de 50 ans. Dans l'étude d'Itkonen, les prélèvements sanguins ont été réalisés avant 10h. Les paramètres du métabolisme ferrique n'ont, par contre, pas été mesurés. Il est donc tout à fait possible que certains volontaires présentant une carence martiale aient été inclus lors de l'établissement des valeurs de référence. De plus, le calibrateur utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse (Peptide Institute) était différent du nôtre (Eurogentec). Le choix de la firme produisant le calibrateur est connu pour impacter fortement les valeurs d'hepcidinémie (Kroot et al. 2012). Une autre étude a évalué les taux d'hepcidine dans une population de taille importante incluant 2998 individus sains et a obtenu une médiane à 4,1 nmol/L pour les femmes préménopausées et à 7,8 nmol/L pour les hommes (Galestoot et al. 2011) avec, également, mise en évidence d'une élévation significative des taux d'hepcidine chez la femme après la ménopause. La technique utilisée pour l'établissement des valeurs de référence par cette équipe était un test immunologique compétitif, pouvant présenter des réactions croisées avec les isoformes tronqués du côté N-terminal de l'hepcidine-25 (Kroot et al. 2011).

Dans cette première partie du projet, nous n'avons pas pu établir si le statut ménopausal impactait les concentrations en hepcidine, ne disposant pas de cette information sur le formulaire de renseignement clinique. En utilisant une valeur seuil à 50 ans pour définir le statut ménopausal, aucune différence significative pour l'hepcidinémie n'est objectivée entre les femmes d'un âge inférieur ou égal à 50 ans et les femmes d'un âge supérieur à 50 ans. Par contre, une différence significative des taux d'hepcidinémie selon le sexe est mise en évidence avec des valeurs plus élevées pour les individus de sexe masculin, cette donnée étant déjà rapportée par d'autres équipes (Swinkels et al. 2008, Galestoot et al. 2011). Cette variation des concentrations en hepcidine selon le sexe et le statut ménopausal peut être expliquée par les pertes menstruelles observées en période de reproduction. Ces dernières sont à l'origine d'une réduction des réserves en fer causant une diminution de la transcription du gène codant pour l'hepcidine.

Des taux significativement plus bas sont obtenus pour les individus présentant une carence en fer absolue par rapport aux volontaires sains. Après réalisation de l'analyse multivariable, les concentrations en hepcidine sont associées de manière significative

aux taux de ferritine et de fer sérique, confirmant la régulation de la transcription de ce peptide par les réserves en fer hépatique et les taux de fer circulants (Girelli et al. 2016).

La mesure des concentrations en hepcidine urinaire n'est pas recommandée suite à l'influence de la filtration glomérulaire, de la réabsorption tubulaire (Kroot et al. 2011) et de la production locale d'hepcidine par les cellules tubulaires (Kulaksiz et al. 2005). Le comportement rénal de l'hepcidine n'étant pas clairement élucidé, le coefficient d'excrétion rénale de l'hepcidine a été évalué en collectant des paires urine-sérum chez 43 volontaires sains. La médiane des valeurs d'hepcidinurie obtenue est de 2.1 nmol/mmol de créatinine. Ces valeurs absolues obtenues pour la mesure de l'hepcidine urinaire sont proches de celles décrites par Bansal et al ayant déterminé une moyenne de concentrations à 5,8 nmol/mmol de créatinine pour 12 volontaires sains prélevés entre 15h00 et 17h00 (Bansal et al. 2009). Sur base des 43 paires urine-sérum collectées, un coefficient d'excrétion rénale oscillant entre 0,6 et 14,6% a été obtenu. Ces résultats confortent ceux obtenus par Swinkels et al (Swinkels et al. 2008), Ganz et al (Ganz et al. 2008) et Peeters et al (Peeters et al. 2013) ayant démontré que 95 à 100% de l'hepcidine filtrée au niveau glomérulaire, est réabsorbé au niveau tubulaire. Dans les trois dernières études citées, les valeurs ont été déterminées sur un nombre plus faible de paires urine-sérum.

Une corrélation significative est établie entre les taux d'hepcidine sérique et urinaire avec une dispersion importante des valeurs. Des résultats similaires ont été décrits par Kroot et al attribuant cette dispersion à différentes causes à savoir ; la variation pré-analytique importante de l'hepcidine urinaire liée au phénomène d'agrégation et d'adhésion dans les milieux pauvres en protéines (Kroot et al. 2009) ainsi qu'à la sensibilité plus élevée de l'hepcidine urinaire à l'oxydation (Kroot et al. 2011).

Les conditions pré-analytiques que nous avons décidées d'investiguer devaient refléter ce qui se déroule en routine de laboratoire ; à savoir le type d'échantillons requis pour l'analyse (avec possibilité de tubes alternatifs), la stabilité des tubes primaires et des aliquots secondaires éventuellement réalisés. Toutes ces informations vont impacter le flux des échantillons pour nos centres d'activités internes et pour les laboratoires sous-traitants. Concernant les aspects pré-analytiques, une légère augmentation des taux d'hepcidine sur plasma EDTA par rapport au sérum ou plasma hépariné a été objectivée. Il est possible que des protéases calcium-

dépendantes soient inhibées par la chélation du calcium, néanmoins cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée. Cette augmentation des valeurs d'hepcidinémie lors de la collecte de sang total sur tube EDTA a déjà été décrite par l'équipe de Laarakkers et al. Cet auteur a démontré la prévention de la dégradation de l'hepcidine, en cours de stockage à température ambiante, par addition d'un inhibiteur de protéases à des plasmas héparinés (Laarakkers et al. 2013). En pratique, nous recommandons l'utilisation de sérum ou de plasma hépariné. Bien que les taux d'hepcidine mesurées sur plasma EDTA soient significativement plus élevés par rapport aux séra ou plasmas héparinés, les biais respectifs observés de 10.5% et de 8.4% restent acceptables compte tenu de l'erreur totale admissible pour la mesure de l'hepcidine (Van der Vorm et al. 2016).

Les taux d'hepcidine sériques restent stables sur aliquot réalisé dans un tube en plastique. Celui-ci peut rester à température ambiante durant 24 heures sans modification significative de l'hepcidinémie. La mesure de l'hepcidine peut se réaliser sur tube sec primaire, centrifugé, jusqu'à 6 jours après la prise de sang lorsque le prélèvement est conservé à 4°C. Des données de stabilité similaires sont rapportées dans la littérature (Itkonen et al. 2012b).

Les valeurs d'hepcidinurie sont nettement diminuées lorsque l'aliquot urinaire est réalisé dans un tube en plastique par rapport à un tube en verre. Cette observation pourrait être expliquée par la capacité d'adhésion importante de l'hepcidine sur divers matériaux dans un milieu tel que l'urine (Kroot et al. 2010). L'impact de l'aliquot secondaire sur les taux d'hepcidine urinaire conforte les données sur la variation pré-analytique élevée, observée pour la détermination de l'hepcidinurie (Kroot et al. 2009). La matrice sérique peut être transférée dans un aliquot secondaire en plastique ou en verre sans observer de variation significative au niveau des concentrations mesurées en hepcidine. Un ajout de protéines dans les urines émises, sous la forme d'ABS, pourrait donc être intéressant pour limiter les phénomènes d'agrégation et d'adhésion de ce peptide. Cette hypothèse sera testée dans la seconde partie de ce projet.

## 4.2 Etude des paramètres pré-analytiques et évaluation de l'efficacité diagnostique de l'hepcidine urinaire dans l'identification d'une carence martiale

### 4.2.1 Résultats de la population étudiée

Parmi les 35 volontaires ayant participé à cette étude, deux ont été exclus suite à une collecte urinaire incomplète de 24 heures. Les résultats biochimiques et hématologiques obtenus dans cette population de 33 volontaires sont décrits dans la Tableau 6. Tous présentent un taux de filtration glomérulaire supérieur à 90 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Les valeurs d'hepcidinémie varient de <0,28 (LoQ) à 13,2 nmol/L. Six volontaires ont une carence martiale absolue dont un présente une anémie microcytaire hypochrome associée.

Des résultats biochimiques compatibles avec une surcharge en fer (ferritine : 482 µg/L, TS : 87%) ont été mis en évidence chez un volontaire prélevé à 10h et ne présentant pas de syndrome inflammatoire. La mesure des taux sanguin et urinaire d'hepcidine montrait des concentrations paradoxalement basses (hepcidine plasmatique : 2,9 nmol/L, hepcidine sur échantillon d'urine stabilisé par 2,5 g/L d'ABS : 0,30 nmol/mmol créatinine), ne concordant pas avec les valeurs de ferritine et de TS. La recherche de mutations du gène codant pour la protéine HFE a permis de mettre en évidence la présence de la mutation C282Y à l'état homozygote, révélant une hémochromatose de type I. Une résonance magnétique nucléaire a confirmé la surcharge hépatique en fer avec un taux de fer hépatique à 240 µmol/g tissu (valeurs normales < 36 µmol/g).

### 4.2.2 Impact de l'ajout d'ABS sur les concentrations urinaires en hepcidine

Des taux d'hepcidine significativement plus bas ont été observés lorsque les échantillons d'urine sont collectés dans un pot en polypropylène ne contenant pas d'ABS (p<0,001). Par contre, aucune différence significative n'a pu être observée entre les urines collectées sur 2,5 g/L et 5 g/L d'ABS (analyse de variance pour mesures répétées non gaussiennes, post-test de Dunns ; p>0,05).

Les médianes (P2,5-P97,5) des concentrations obtenues sur échantillons urinaires dépourvus d'ABS, avec ABS à une concentration finale de 2,5 g/L, 5 g/L et sur collecte complète de 24 heures sont respectivement 0,59 (0,03-4,79), 0,68 (0,04-5,62), 0,67 (0,02-5,04) et 1,42 (0,08-5,04) nmol/mmol (Tableau 6).

Tableau 6: Résultats des paramètres biochimiques et hématologiques obtenus pour les 33 volontaires. La mesure du pH urinaire a été réalisée pour 23 échantillons. Les valeurs sont exprimées sous forme de médiane, P2,5 et P97,5.

Matrice	Plasma	Spots urinaires				Collecte 24h	Spots urinaires		Sérum				Sang total
		Sans ABS	2,5 g/L ABS	5 g/L ABS	Sans ABS		2,5 g/L ABS						
Param. (Unités)	Hepcidine (nmol/L)	Hepcidine (nmol/mmol créatinine)					pH (n = 23)		Ferritine (µg/L)	Fer (µg/dL)	TS (%)	CRP (mg/L)	Hb (g/dL)
Médiane	2,2	0,59	0,68	0,67	1,42		6,2	6,3	88	106	27	1,2	14
P2,5	0,28	0,03	0,04	0,02	0,08		5,4	5,4	16	43	9	0,6	11,9
P97,5	13,2	4,79	5,62	5,04	5,04		8	8	370	188	67	9,8	16

Après avoir exclu un échantillon présentant une valeur extrême d'hepcidinurie, la régression de Deming obtenue entre les concentrations en hepcidine mesurées sur échantillons urinaires avec 2,5 g/L et sans ABS a fourni une pente de 0,75 (IC95% : 0,70-0,80) et un intercept avec l'axe y de 0,08 (IC95% : 0,01-0,16, figure 21).

L'analyse de Bland-Altman a mis en évidence une sous-estimation quasi systématique des concentrations en hepcidine (biais moyen : -13,3%, déviation standard : 13,4%) lorsque l'urine est prélevée dans un pot ne contenant pas d'ABS par rapport à un échantillonnage avec ABS (Figure 22).

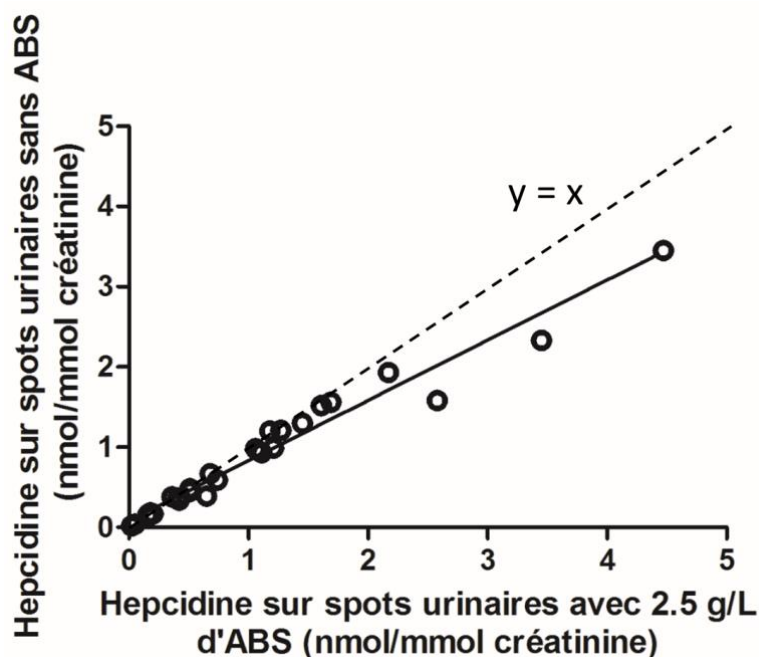


Figure 21 : Régression de Deming obtenue entre les taux d'hepcidine urinaire déterminés sur pot en polypropylène contenant 2,5 g/L d'ABS (x) et sans ABS (y) :  $y = 0,75 x + 0,08$  (n = 32).

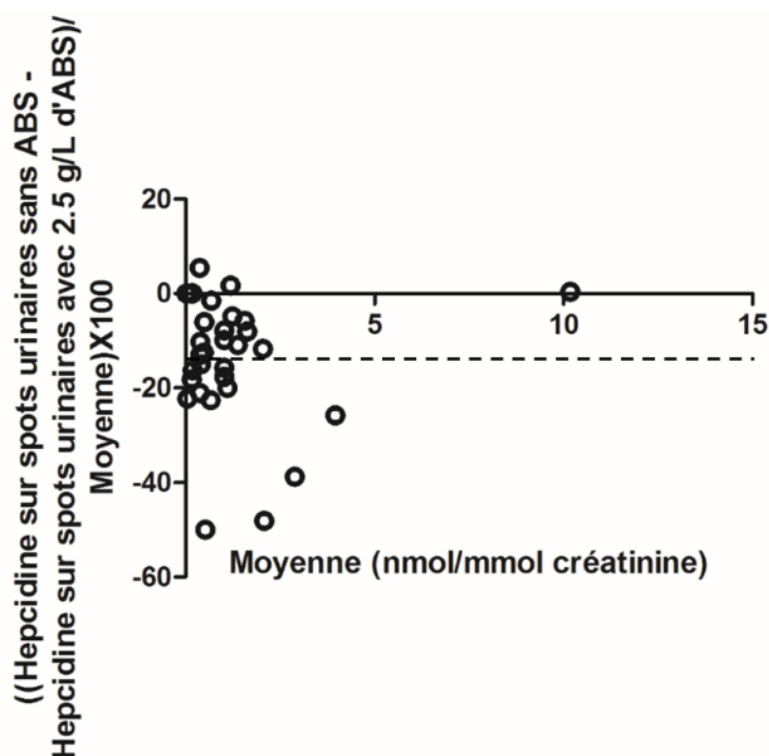


Figure 22 : Graphique de Bland-Altman représentant la différence en pourcentage entre les taux d'hepcidinurie obtenus sur pot sans ABS et avec 2,5 g/L d'ABS par rapport à la moyenne des concentrations urinaires. Un biais négatif est obtenu (-13,3%) avec une forte dispersion des résultats (déviations standard : 13,4%, n = 33).

Etant donné que le pourcentage de différence obtenu varie fortement d'un échantillon à l'autre (+5,4% à -50%), le pH a été mesuré pour 23 échantillons urinaires avec 2,5 g/L d'ABS et sans ABS. Aucune différence n'a été mise en évidence entre ces deux types d'échantillonnage ( $p > 0,05$ ). Aucune corrélation n'a été observée entre le pourcentage de décroissance des taux d'hepcidine calculé entre les 2 types d'échantillons et le pH de l'urine collectée (coefficient de Pearson : 0,0009 ;  $p > 0,05$ , figure 23).

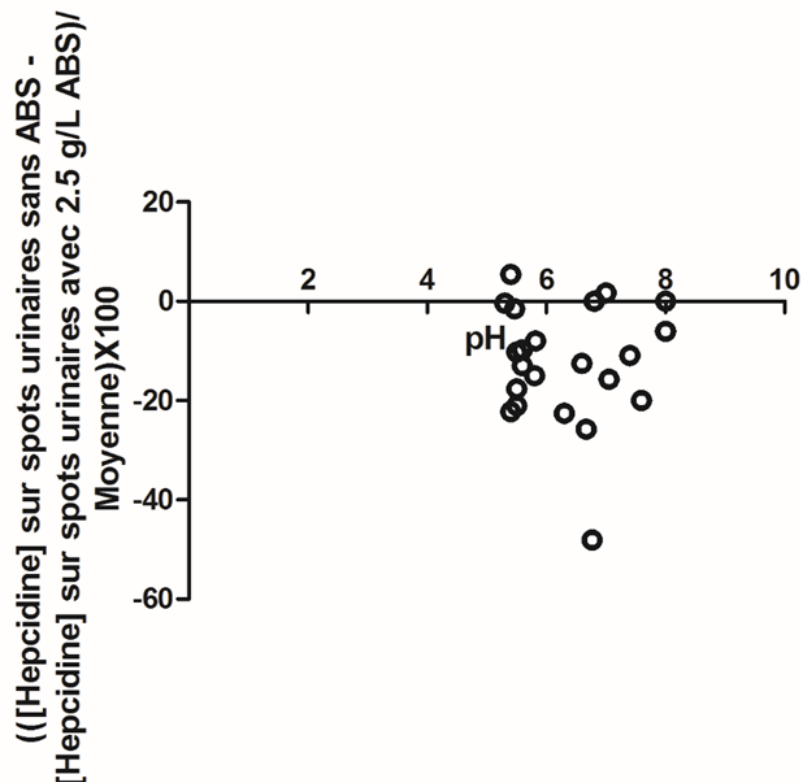


Figure 23 : Différence des concentrations en hepcidine observée entre l'échantillon urinaire sans ABS et l'échantillon comportant 2,5 g/L d'ABS par rapport au pH urinaire de l'échantillon sans ABS. Aucune corrélation significative n'a pu être observée avec un coefficient de Pearson de 0.0009 ( $p > 0,05$ ,  $n = 23$ ).

#### 4.2.3 Corrélation entre l'hepcidine urinaire et la ferritine

Les concentrations en hepcidine mesurées sur échantillon d'urine (2,5 g/L ABS) corrélaient légèrement mieux avec les taux d'hepcidinémie plasmatique (coefficient de Spearman rho : 0,88, IC95% : 0,77-0,94,  $p < 0,0001$ ) par rapport aux taux mesurés sur collecte de 24 heures (coefficient de Spearman rho: 0,78, IC95% : 0,61-0,89 ;  $p < 0,0001$ ,  $n = 33$ ). La corrélation entre les réserves en fer représentées par les taux de ferritine et les concentrations en hepcidine obtenus sur les différents échantillons a été évaluée sur 32 volontaires après avoir exclu le cas d'hémochromatose de type I. L'échantillon pour lequel les taux d'hepcidine sont les mieux corrélés aux valeurs de



ferritinémie est le plasma (coefficient de Spearman rho: 0,73, IC95% : 0,50-0,86 ;  $p < 0,0001$ ) suivi de la collecte de 24 heures (coefficient de Spearman rho: 0,67, IC95% : 0,41-0,83 ;  $p < 0,0001$ ) puis de l'échantillon contenant 2,5 g/L d'ABS (coefficient de Spearman rho : 0,63, IC95% : 0,35-0,81 ;  $p < 0,05$ , n :32).

#### 4.2.4 Evaluation de l'efficience diagnostique des taux d'hepcidine mesurés sur des échantillonnages différents pour l'identification de la carence martiale absolue

Les aires sous la courbe (AUC) (IC95%) calculées par courbe ROC sont respectivement 0,94 (0,86-1,02), 0,93 (0,84-1,02) et 0,86 (0,71-1,01) pour la mesure de l'hepcidine réalisée sur plasma, collecte urinaire de 24 heures et échantillons stabilisés par 2,5 g/L d'ABS (Figure 24). La meilleure efficience diagnostique de l'hepcidine plasmatique pour identifier une carence martiale absolue a été obtenue à une valeur seuil de 0,9 nmol/L avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 88,5%.

#### 4.2.5 Aspects pré-analytiques pour la mesure de l'hepcidine urinaire

La médiane des concentrations en hepcidine mesurée sur échantillon urinaire sans ABS, aliquoté immédiatement et stocké à -20°C est de 0,34 nmol/mmol. Cette médiane diminue significativement lorsque ces mêmes échantillons sont laissés 24 heures à température ambiante avant d'être aliquotés et stockés à -20°C (médiane : 0,27 nmol/mmol;  $p < 0,05$ , n = 9) avec une moyenne de décroissance des concentrations en hepcidine de 11,2%. A l'inverse, lorsque la récolte d'urine est réalisée dans un pot contenant 2,5 g/L d'ABS, les concentrations en hepcidine sont restées stables durant 24 heures de stockage à température ambiante, que ce soit pour des échantillons simples ( $p > 0,05$ , n = 9) ou des collectes de 24 heures ( $p > 0,05$ , n = 7).

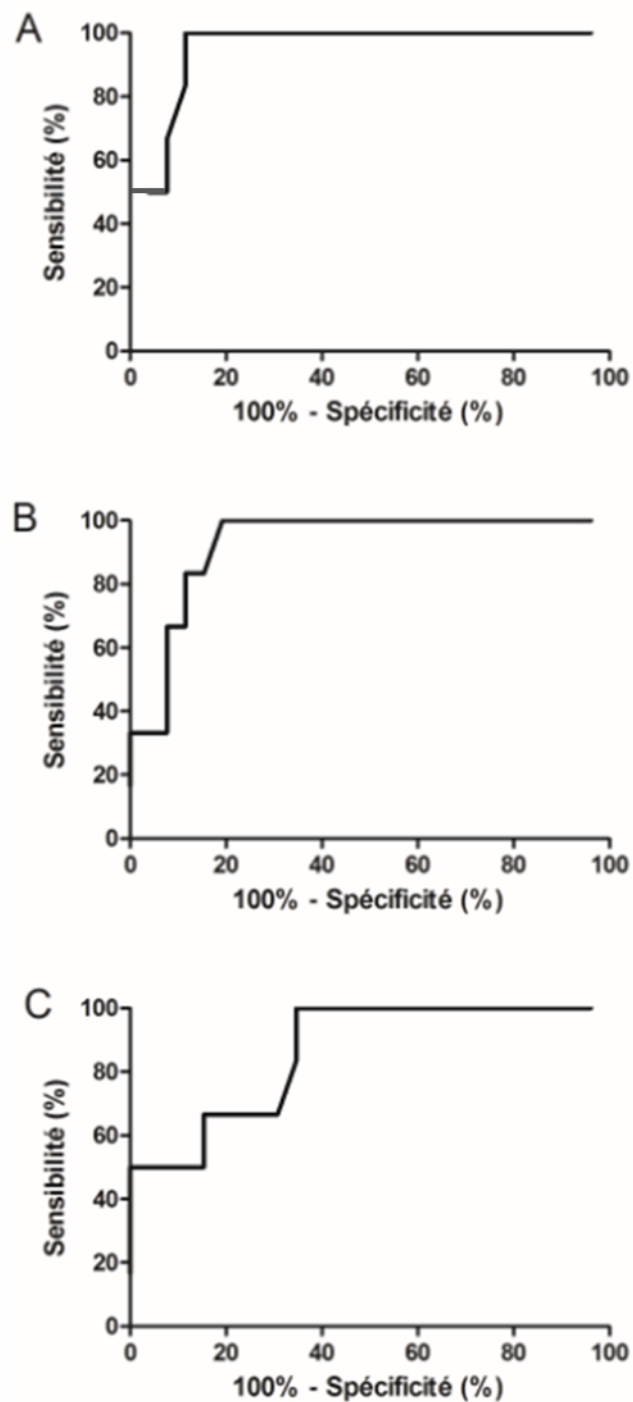


Figure 24 : Courbes ROC pour l'hepcidine déterminée sur plasma, collecte de 24h et échantillon avec 2,5 g/L d'ABS dans le diagnostic de la carence martiale absolue. A. Hepcidine plasmatique (AUC = 0,94), B. Hepcidine urinaire sur récolte de 24h (AUC = 0,93), C. Hepcidine urinaire sur spot + ABS (AUC = 0,86)

#### 4.2.6 Discussion

L'anémie touche un tiers de la population mondiale, environ la moitié des cas est attribuée à un déficit en fer. Dans les pays en voie de développement, la cause la plus fréquente d'anémie sur carence martiale est liée à des apports en fer insuffisants ou des pertes accrues lors d'infections parasitaires diverses. Alors que la réduction de l'absorption duodénale de fer et l'augmentation des pertes liées à des saignements digestifs sont le plus souvent associées à l'IDA dans les pays industrialisés (Camaschella 2019). Certaines populations sont particulièrement à risque de carence martiale comme les femmes en âge de procréer, suite aux pertes menstruelles, et les femmes enceintes ou les jeunes enfants, suite à l'augmentation des besoins. Des réserves suffisantes en fer sont requises durant l'enfance pour une croissance et un développement cognitif optimaux.

Il existe différentes stratégies pour la supplémentation en fer ; les traitements visant à corriger la carence martiale et les thérapies visant à prévenir un déficit dans les populations à risque (Lopez et al. 2016).

L'évaluation du statut ferrique avant l'administration de suppléments serait particulièrement utile dans les zones endémiques de malaria où une administration non ciblée pourrait favoriser la croissance de pathogènes latents (Ganz et al. 2015). La concentration de l'hepcidine sérique permettrait d'identifier une carence martiale et de prédire l'efficacité de l'absorption en fer oral dans une population pédiatrique issue de Gambie et de Tanzanie, deux régions à haute prévalence de malaria et d'autres infections parasitaires (Parischa et al. 2014).

L'utilité de la détermination de l'hepcidinurie est décrite dans diverses situations cliniques. Une faible concentration en hepcidine dans l'urine est associée à un risque accru d'apparition d'insuffisance rénale aiguë après chirurgie cardiaque nécessitant une circulation extra-corporelle (Prowle et al. 2015). L'hepcidinurie pourrait également être utilisée en tant que marqueur non invasif du statut ferrique chez les prématurés. En effet, une corrélation négative est mise en évidence entre les taux urinaires d'hepcidine et les besoins en fer pour l'érythropoïèse dans cette population particulière (Müller et al. 2012). Enfin, des hepcidinuries significativement abaissées sont mises en évidence chez les enfants IDA dans une population africaine à prévalence élevée d'IDA et d'infections parasitaires. Alors que les taux d'hepcidinurie corréleront avec les concentrations en ferritine, aucune association n'est mise en évidence avec les taux

circulants de cytokines ou les infections gastrointestinales parasitaires (Cherian et al. 2008).

Le dosage du peptide dans une matrice urinaire est néanmoins fortement controversé dans la littérature (Kroot et al. 2011). Les conditions pré-analytiques pour la mesure de l'hepcidine urinaire sont, en effet, difficiles à contrôler suite à la capacité du peptide à s'agréger et à adhérer à différents matériaux dans les matrices pauvres en protéines (Hunter et al. 2002). La variabilité pré-analytique de la mesure de l'hepcidine urinaire est élevée, dépassant la variabilité inter-individuelle (Kroot et al. 2009). Les concentrations en hepcidine dans l'urine sont également impactées par la fonction rénale de l'individu. Ce peptide est librement filtré au niveau du glomérule et est réabsorbé au niveau tubulaire par endocytose via un récepteur de type mégaline (Peters et al. 2013). Les cellules tubulaires peuvent produire localement de l'hepcidine (Kulaksiz et al. 2005). Malgré ces inconvénients, plusieurs études ont établi une corrélation significative entre les taux sanguins et urinaires du peptide (Ganz et al. 2008, Kroot et al. 2009, Müller et al. 2012).

Dans cette deuxième partie de projet, nous avons souhaité déterminer s'il était possible de limiter le risque d'agréation et d'adhésion de l'hepcidine en ajoutant différentes quantités d'ABS sur des échantillons urinaires, le but étant de limiter la variabilité pré-analytique de la mesure de l'hepcidinurie. Nous avons également évalué l'efficacité diagnostique de l'hepcidine pour la mise en évidence d'une carence martiale sur divers échantillons : échantillon urinaire avec ou sans ABS, échantillon plasmatique et récolte urinaire de 24 heures. En effet, l'hepcidine présente une variation circadienne importante. Les concentrations sériques et urinaires les plus basses sont observées en début de matinée et augmentent progressivement l'après-midi (Troutt et al. 2012, Kroot et al. 2009). Cette rythmicité est variable selon les individus et semble être moins prononcée lors d'IDA suite à la réduction de la transcription de l'hepcidine lors d'érythropoïèse déficiente en fer (Ganz et al. 2008). La mesure de l'hepcidine sur une collecte de 24 heures permettrait d'intégrer ces modifications diurnes et de mieux refléter le statut ferrique par rapport à un dosage sérique ou urinaire réalisé à un moment précis.

Les taux d'hepcidine plasmatique obtenus sur les 33 volontaires oscillent entre  $<0,28$  et  $13,2$  nmol/L. Six volontaires de sexe féminin (6/33) présentent une carence martiale, ces résultats ne sont pas étonnants compte tenu de la haute prévalence du déficit en

fer, particulièrement pour les jeunes femmes en âge de procréer (Lopez et al. 2016). Une hémochromatose est suspectée pour un des volontaires, présentant des taux d'hepcidine sérique et urinaire anormalement bas pour les valeurs de TS et de ferritine plasmatique mesurées. En effet, un taux d'hepcidine bas, inappropriée en regard de la surcharge martiale, est une caractéristique des hémochromatoses de type I, IIa, IIb et III suite à l'altération de la synthèse de protéines intervenant dans la régulation positive de l'hepcidine (Pietrangelo 2010). L'analyse du gène HFE a mis en évidence la présence de la mutation C282Y à l'état homozygote et l'imagerie a confirmé une surcharge en fer hépatique importante. Les résultats de ce volontaire ont été exclus pour évaluer l'efficacité diagnostique de l'hepcidine, mesurée sur différents échantillons, dans l'identification de la carence martiale.

Les taux d'hepcidine urinaire sont significativement plus bas lorsque l'échantillon d'urine est collecté sans ABS, avec un pourcentage moyen de décroissance de 13,3%. Une très faible quantité d'ABS semble être suffisante pour limiter le phénomène d'adhésion et/ou d'agrégation. En effet, aucune différence significative n'est observée entre les échantillons présentant une concentration finale en ABS de 2,5 g/L versus 5 g/L. La différence des concentrations en hepcidine entre les échantillons urinaires ne contenant pas d'ABS et ceux avec 2,5 g/L d'ABS, est très variable d'un échantillon à l'autre. Certains prélèvements ont un taux d'hepcidine qui ne semble pas être affecté, d'autres voient leur concentration diminuer de 50% en l'absence d'ABS. L'hepcidine est un peptide comportant un contenu élevé en acides aminés basiques, lui conférant une charge positive à pH neutre, avec un point isoélectrique à 8,2 (Abbas et al. 2018). Nous avons souhaité évaluer si ce pourcentage de décroissance de l'hepcidinurie en l'absence d'ABS pourrait être relié au pH urinaire. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le pourcentage de diminution de l'hepcidinurie observé en absence d'ABS et le pH des différents échantillons. Cette hétérogénéité du comportement de l'hepcidine urinaire vis-à-vis de la présence ou de l'absence d'ABS pourrait s'expliquer par une différence de composition des urines impactant le risque d'adhésion du peptide. Malheureusement, la quantité de prélèvement était insuffisante pour pouvoir quantifier d'autres paramètres tels que les protéines ou les ions.

Lorsque les échantillons urinaires sont stockés 24h à température ambiante, les concentrations en hepcidine restent stables en présence d'ABS (2,5 g/L) alors qu'elles diminuent significativement, en moyenne de 11,2%, sur les échantillons collectés sans ABS. Les collectes urinaires complètes, réalisées en présence d'ABS, restent

également stables durant au moins les 24 heures suivant la fin de la collecte, confirmant le rôle stabilisateur joué par l'ABS dans un environnement pauvre en protéines. En corrélant les concentrations d'hepcidine obtenues sur les différents spécimens (plasma, échantillons et urine de 24h stabilisés par ABS), une meilleure corrélation est observée entre les taux quantifiés sur plasma et échantillons urinaires (2,5 g/L) qu'entre les niveaux mesurés sur plasma et collecte de 24h. Ces résultats pourraient être expliqués par la variation circadienne de l'hepcidine ; les concentrations plasmatiques les plus basses sont observées tôt le matin puis augmentent progressivement en cours de journée (Troutt et al. 2012). La même tendance est observée pour l'hepcidine urinaire mais avec des valeurs qui restent plus stables en cours de matinée (Kroot et al. 2009). La mesure de l'hepcidine sur collecte de 24h intègre ces variations. Un dosage isolé sur plasma et échantillon urinaire est impacté par cette rythmicité. Une meilleure corrélation est donc observée entre ces deux types d'échantillons qui ont été collectés à un moment précis de la journée.

L'efficacité diagnostique de la mesure de l'hepcidine sur différents prélèvements pour la mise en évidence d'une carence martiale est investiguée à l'aide de courbes ROC. La mesure de l'hepcidine plasmatique et de l'hepcidinurie sur collecte de 24h présentent une efficacité diagnostique comparable avec une AUC de 0,94 et 0,93, respectivement. Une sensibilité de 100% et une spécificité de 88,5% sont obtenues pour une valeur d'hepcidinémie inférieure à 0,9 nmol/L. Les taux d'hepcidine mesurés sur échantillons urinaires stabilisés par ABS (2,5 g/L) ont une efficacité moindre pour identifier une carence martiale avec une AUC de 0,86.

Le choix de l'échantillonnage optimal pour évaluer le statut ferrique dépend des variations pré-analytique, analytique et biologique associées au dosage de l'hepcidine. Alors que la mesure de l'hepcidine plasmatique présente une variabilité pré-analytique moindre comparativement à la mesure des taux urinaires, le plasma est plus sensible aux variations de l'hepcidine qui peuvent apparaître sur de courtes périodes (Kroot et al. 2009). Les résultats de cette deuxième partie de projet suggèrent que la collecte de 24h, en intégrant la variation diurne de l'hepcidine, pourrait mieux refléter les stocks ferriques par rapport à un échantillon urinaire prélevé à un moment précis.

#### 4.3 Mesure de l'hepcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé et étude de sa corrélation avec l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après un test de surcharge en fer oral

##### 4.3.1 Temps de prélèvement optimal pour la réalisation du test d'absorption en fer oral

L'évolution de la TS et de la concentration en hepcidine ont été évalués chez 12 volontaires sains (âge médian : 69 ans, intervalle : 36-85 ans, 8 femmes et 4 hommes). Six volontaires ont ingéré 160 mg de fer ferreux immédiatement après la première prise de sang. Les résultats des paramètres ferriques, biochimiques et hématologiques obtenus à 8h00, 12h00 (TS et concentration en hepcidine) et 15h30 (TS et concentration en hepcidine) sont décrits dans le tableau 7. La médiane de la TS reste constante au cours du temps pour le groupe de volontaires n'ayant pas réalisé le TAFO (8h00 : 35% (30-36%) ; 12h00 : 32% (21-41%) ; 15h30 : 29% (21-40%)). Par contre, elle augmente significativement dans le groupe ayant ingéré le fer, 4 heures après la dose (8h00 : 24% (16-34%) ; 12h00 : 47% (26-54%) ;  $p < 0,05$ ) pour revenir à sa valeur basale à 15h30 (30% (20-43%) ;  $p > 0,05$  par rapport aux valeurs de 8h00). Une augmentation significative des concentrations en hepcidine est observée à 12h00 et 15h30 dans les deux groupes ( $p < 0,05$ ). Le temps optimal choisi pour la réalisation du prélèvement lors du TAFO a donc été fixé à 4h après administration de fer oral, vu l'augmentation significative de l'hepcidine et de la TS.

##### 4.3.2 Effizienz diagnostique de l'hepcidinémie basale dans le diagnostic différentiel des anémies

Parmi les 332 patients gériatriques inclus pour un dosage d'hepcidinémie basale entre 7h30 et 10h00, quatre ont été exclus de l'étude. Trois étaient sous supplémentation en fer et un a reçu une transfusion dans les trois semaines précédant l'étude. Les données démographiques, hématologiques et biochimiques obtenues pour ces 328 patients sont détaillées dans le tableau 8. Cent-treize patients sur les trois cent vingt-huit (34,5%) inclus sont de sexe masculin. Aucune différence significative pour l'hepcidinémie n'est observée entre les femmes et les hommes (3,1, <0,4-12,2 versus 3,0, <0,4-16,9 nmol/L, test de Mann-Whitney ;  $p > 0,05$ ).

Tableau 7 : Résultats des paramètres hématologiques, biochimiques obtenus pour les 12 volontaires sains. Six d'entre eux ont réalisé le test d'absorption en fer oral (TAFO). Les valeurs sont exprimées sous forme de médiane (P2,5-P97,5).

Paramètres	TAFO	Pas de TAFO
<b>Nombre</b>	6	6
<b>Age (années)</b>	80 (36-85)	66 (36-72)
<b>Hémoglobine (g/dL)</b>	13.5 (12-13.9)	13.5 (12.7-14.5)
<b>VCM (fL)</b>	90.7 (89.4-99.9)	93.2 (88.1-98.5)
<b>CMH (pg)</b>	31.1 (29.8-33.1)	31.8 (29.8-33)
<b>Créatinine (mg/dL)</b>	0.8 (0.8-1.3)	0.9 (0.6-1.4)
<b>CRP (mg/L)</b>	1 (0.5-3)	3 (0.7-7.7)
<b>Vitamine B12 (ng/L)</b>	443 (304-639)	591 (315-745)
<b>Folates (µg/L)</b>	8.1 (6.6-10.2)	7.3 (6.4-12.8)
<b>Ferritin (µg/L)</b>	79 (50-218)	245 (50-427)
<b>TS (%) à 8h00</b>	24 (16-34)	35 (30-36)
<b>TS (%) à 12h00</b>	47* (26-54)	32 (21-41)
<b>TS (%) à 15h30</b>	30 (20-43)	29 (21-40)
<b>Hepcidin (nmol/L) à 8h00</b>	2 (0.7-4,3)	2,9 (1,2-5,6)
<b>Hepcidin (nmol/L) à 12h00</b>	3.9* (1,9-8,7)	5,6* (3,4-8,6)
<b>Hepcidin (nmol/L) à 15h30</b>	6,6* (3,3-12,4)	6,9* (3-10,9)

\*valeurs statistiquement différentes de celles obtenues pour le prélèvement à 8h00.

Les valeurs des concentrations en hepcidine observées pour les 218 patients non anémiques oscillent de 0,6 à 10,6 avec une médiane à 3,4 nmol/L. Parmi les 328 patients, 78 (23,8%) présentent une anémie ; 13 (4,0%), 19 (5,8%), 27 (8,2%) et 19 (5,8%) patients ont respectivement une IDA, IDA/ACD, ACD et UA. Une carence en folates et/ou vitamine B12, que celle-ci soit associée au pas à une anémie, est observée pour 16 (4,9%) et 12 (3,7%) patients, respectivement. Un déficit en folates ou vitamine B12, expliquant à elle seule l'anémie, n'est rencontrée pour aucun patient. Une carence en fer latente est décrite chez 32 (9,8%) patients. Concernant les données cliniques des patients appartenant au groupe ACD (n :27) : neuf patients ont une tumeur solide (prostate, sein, colon, foie et mélanome), quatre souffrent d'une pathologie hématologique (myélome multiple, lymphome ou leucémie), huit présentent



un taux de filtration glomérulaire <30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, quatre ont une pathologie inflammatoire chronique (intestinale ou rhumatismale) et enfin, deux patients présentent une élévation chronique de la CRP (>5 mg/L) d'origine indéterminée.

Tableau 8: Caractéristiques démographiques, hématologiques et biochimiques des 328 patients de l'hôpital de jour gériatrique pour lesquels un dosage de l'hepcidinémie basale a été réalisé. Les valeurs sont exprimées sous forme de médiane et d'intervalle (P2,5-P97,5).

Paramètres	ID	IDA	IDA/ACD	ACD	UA	Absence d'anémie
<b>Nombre de patients</b>	32	13	19	27	19	218
<b>TAFO</b>	7/23	2/13	3/19	7/27	6/19	77/218
<b>Age (années)</b>	82 (74-91)	79 (76-89)	86 (75-90)	84 (73-96)	82 (70-96)	85 (72-93)
<b>Hb (g/dL)</b>	13,4 (12,1-15,1)	10,6 (8,7-12,0)	10,8 (9,1-12,8)	11,3 (9,6-12,8)	11,8 (9,3-12,9)	13,9 (12,3-17,5)
<b>VCM (fL)</b>	90,3 (81,5-100,4)	84 (62,3-93,2)	90,9 (70,6-104,7)	93,0 (78,3-105,2)	94,7 (82,8-101,3)	94,0 (83,9-103)
<b>CMH (pg)</b>	30,3 (26,6-33,3)	27,1 (18,8-30,3)	29,1 (22,3-34,5)	31,4 (25,5-35,1)	31,6 (27,2-33,5)	31,6 (27,7-35)
<b>Créatinine (mg/dL)</b>	0,9 (0,6-1,5)	1,0 (0,7-1,5)	1,0 (0,6-1,8)	1,0 (0,6-2,6)	1,0 (0,7-1,5)	0,9 (0,7-1,5)
<b>CRP (mg/L)</b>	2,4 (0,5-13,3)	1,7 (0,5-4,7)	13,0 (2,9-88)	11,0 (0,7-126,8)	1,5 (0,5-4,3)	2,1 (0,5-16)
<b>TS (%)</b>	20 (9-45)	9 (2-27)	12 (5-23)	21 (10-36)	27 (19-36)	29 (14-49)
<b>Ferritine (µg/L)</b>	36 (17-48)	16 (7-38)	45 (14-134)	307 (107-1051)	150 (68-560)	159 (56-539)
<b>Vitamine B12 (ng/L)</b>	323 (172-691)	272 (150-642)	408 (224-963)	388 (222-1247)	328 (196-652)	366 (151-1148)
<b>Folates (µg/L)</b>	9,4 (3,7-19)	9,8 (4,7-18,5)	9,0 (3-19)	8,6 (3,6-19)	7,2 (4,1-19)	7,4 (3,4-19)
<b>sTfR/Ft Index</b>	-	5,3 (2,0-21,3)	2,8 (1,4-9,3)	1,3 (0,7-2)	1,1 (0,9-1,9)	-
<b>Hepcidine (nmol/L)</b>	1,2 (<0,4-3,3)	<0,4 (<0,4-1,6)	1,7 (<0,4-7,4)	7,4 (1,7-31,1)	3,3 (1,4-11,6)	3,4 (0,6-10,6)

Parmi les patients ayant une anémie combinée (IDA/ACD), cinq présentent une tumeur solide (prostate, sein, colon), deux souffrent d'une hémopathie maligne (lymphome), trois ont une pathologie rénale, sept présentent une pathologie intestinale ou rhumatismale chronique et un patient a, de manière chronique, une élévation de la CRP.

Après analyse multivariable, il s'avère que l'hepcidinémie basale est associée significativement à la créatininémie [ $\beta_1 = 0,995$  (IC95%: 0,382 à 1,608);  $p < 0,01$ ], au taux de CRP [ $\beta_2 = 0,035$  (IC95%: 0,022 à 0,047);  $p < 0,0001$ ] et de ferritine [ $\beta_3 = 0,009$  (IC95%: 0,008 à 0,010);  $p < 0,0001$ ].

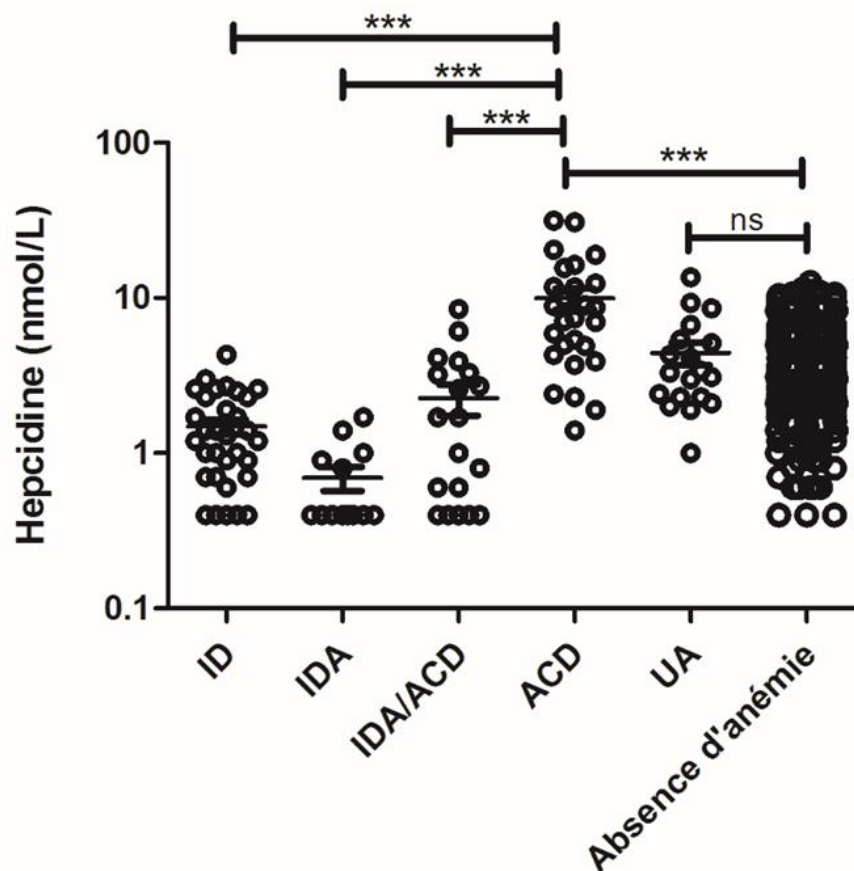


Figure 25 : Concentrations en hepcidine obtenues pour les patients avec carence latente en fer (ID, n=32), avec anémie sur carence martiale (IDA, n=13), avec anémie combinée (IDA/ACD, n=19), avec anémie liée à une maladie chronique (ACD, n=27), avec anémie inexpliquée (UA, n=19) et sans anémie (n=218). Les valeurs basales sont significativement plus basses chez les patients avec carence martiale (ID, IDA, IDA/ACD) comparativement aux patients ACD ( $p < 0,0001$ ) et aux patients non anémiques ( $p < 0,01$ ). Aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence entre les patients avec anémie inexpliquée et les patients non anémiques ( $p > 0,05$ ).

Les concentrations en hepcidine observées pour les différents groupes de patients sont représentées à la figure 25. Des valeurs d'hepcidinémie significativement plus basses par rapport au groupe non anémique (3,4, 0,6-10,6 nmol/L ;  $p < 0,01$ ) sont observées pour les patients présentant une carence martiale latente (1,2,  $< 0,4$ -3,3 nmol/L), une IDA ( $< 0,4$ ,  $< 0,4$ -1,6 nmol/L) et une IDA/ACD (1,7,  $< 0,4$ -7,4 nmol/L). Les patients ACD (7,4, 1,7-31,1 nmol/L ;  $p < 0,0001$ ) ont des taux d'hepcidine significativement augmentés par rapport au groupe non anémique. Enfin, aucune différence n'est observée entre le groupe non anémique (3,4, 0,6-10,6 nmol/L) et le groupe UA (3,3, 1,4-11,6 nmol/L) ( $p > 0,05$ ).

Pour évaluer l'efficacité diagnostique de l'hepcidinémie basale dans l'identification d'une carence martiale chez les patients anémiques, deux groupes (IDA, IDA/ACD ;  $n : 32$  versus ACD, UA ;  $n : 46$ ) ont été analysés par courbe ROC. L'AUC calculée (IC95%) est de 0,90 (0,83-0,97). La meilleure efficacité diagnostique est obtenue pour une valeur seuil de 1,8 nmol/L avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 96%. Un taux d'hepcidine inférieur à 1 nmol/L (spécificité de 100%) permet de confirmer une carence en fer alors qu'un taux supérieur à 8,6 nmol/L (sensibilité de 100%) permet de l'exclure.

#### 4.3.3 Corrélation entre la valeur d'hepcidinémie basale et l'augmentation relative de la saturation de la transferrine après de test de surcharge

Cent-deux patients se présentant à l'hôpital de jour gériatrique ont accepté la participation à l'épreuve de surcharge en fer oral. Aucun effet délétère n'a été rapporté chez ces patients. Les résultats de l'évaluation clinique de ces 102 patients ainsi que les paramètres hématologiques et biochimiques sont décrits dans le tableau 9. Après analyse multivariable, les taux d'hepcidine basale sont associés à ceux de la CRP [ $\beta_1 = 0,078$  (IC95% : 0,054 à 0,102) ;  $p < 0,0001$ ], de la ferritine [ $\beta_2 = 0,0046$  (IC95% : 0,0027 à 0,0065) ;  $p < 0,0001$ ], au Delta TS [ $\beta_3 = -0,0071$  (IC95% : -0,0041 à -0,0100) ;  $p < 0,0001$ ] ainsi qu'au Delta hepcidine [ $\beta_4 = -0,0067$  (IC95% : -0,0032 à -0,0102) ;  $p < 0,0001$ ]. Les coefficients de Spearman, rho, obtenus entre les taux d'hepcidine basale et le Delta TS, d'une part, et le Delta hepcidine, d'autre part, sont respectivement de -0,742 ( $p < 0,0001$ , figure 26A) et -0,228 ( $p < 0,05$ , figure 26B).

Tableau 9: Résultats de l'évaluation médicale et des données biologiques obtenues pour les 102 patients de l'hôpital de jour gériatrique ayant accepté la participation au test de surcharge en fer oral (TAFO). Les données sont rapportées sous forme de médiane et d'intervalle (P2,5-P97,5).

Paramètres	Médiane (P2,5-P97,5)
Nombre	102
Age (années)	83 (72-93)
MNA	13 (7-14)
Echelle de Katz	6 (6-10)
MMSE	26 (13-30)
Score ISAR	2 (0-4)
Score CIRS	2 (1-4)
Score FACIT	41 (14-52)
Hb (g/dL)	13,5 (10,5-15,9)
VCM (fL)	94 (81,2-102,6)
CMH (pg)	31,6 (26,1-36,1)
Créatinine (mg/dL)	0,9 (0,6-1,7)
CRP (mg/L)	2,9 (0,4-35,4)
Vitamine B12 (ng/L)	371 (172-920)
Folate (µg/L)	7,9 (2,9-19)
Ferritine (µg/L)	139 (20-578)
TS (%), valeur basale	26 (9-52)
TS (%) 4 h après le TAFO	39 (15-78)
Hepcidine (nmol/L), valeur basale	3 (<0,4-11,4)
Hepcidine (nmol/L) 4 h après le TAFO	4.7 (<0,4-14,6)

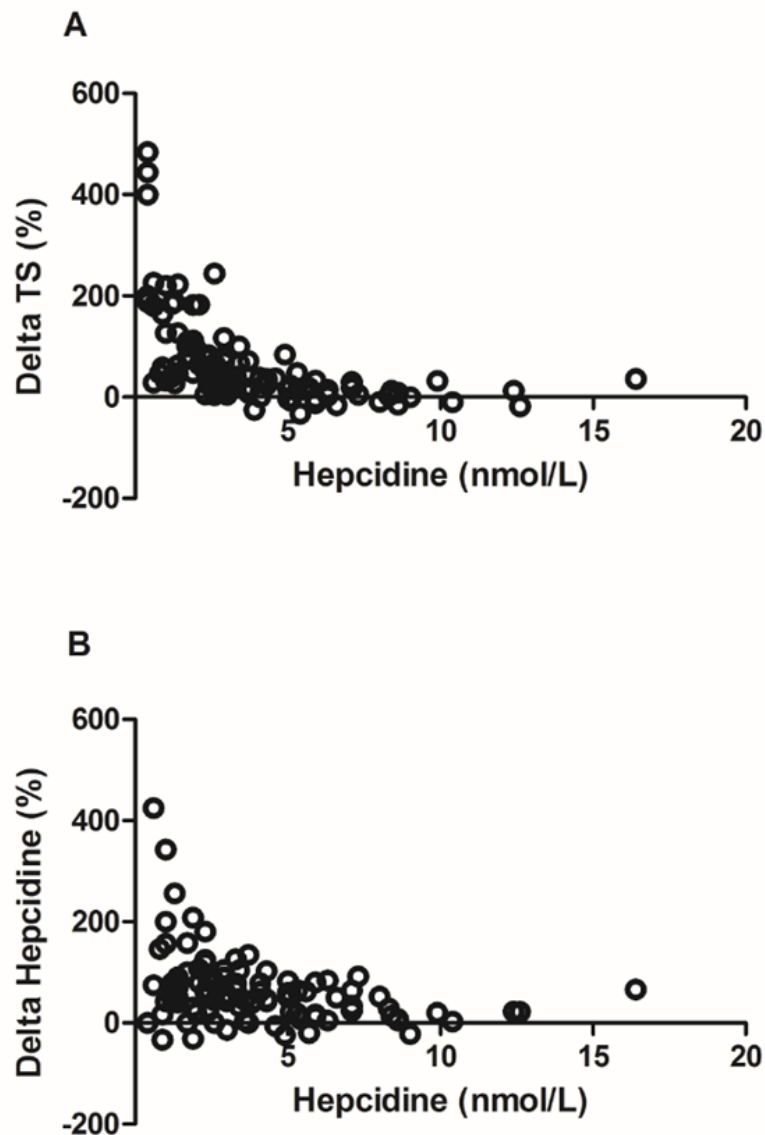


Figure 26 : Corrélations obtenues entre les valeurs d'hépcidinémie basale et le Delta TS (A) ainsi que le Delta hépcidine (B). Les coefficients de Spearman rho obtenus sont respectivement de -0,742 ( $p < 0,0001$ ) et de -0,228 ( $p < 0,05$ ).

L'absorption du fer oral, représentée par le Delta TS, est significativement plus élevée dans le groupe latent ID, IDA et IDA/ACD ( $n = 12, 194, -25-444$ ) que dans le groupe ACD/UA ( $n = 13, 22, -14-85$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figure 27). Une augmentation relative de la TS supérieure à 106%, 4h après l'administration orale de fer, permet de confirmer la présence d'une carence martiale chez les patients (spécificité : 100%, sensibilité : 83%). Deux patients, l'un avec une ID latente, l'autre avec une IDA/ACD, présentent respectivement une élévation relative de la TS, 4h après le TAFO, égale à 43% et -25%.

Le premier patient présente des ulcères gastriques avec carence en fer sans anémie associée. Le deuxième souffre d'une pathologie inflammatoire rhumatismale chronique (ténosynovite). Un taux basal d'hepcidine particulièrement élevé est mesuré pour ces deux patients, très peu ou non répondeur à l'administration de fer oral, avec des concentrations évaluées à 1,8 nmol/L et 2,7 nmol/L, respectivement.

Aucune différence n'est observée entre le groupe latent ID, IDA et IDA/ACD versus le groupe ACD/UA pour le Delta hepcidine.

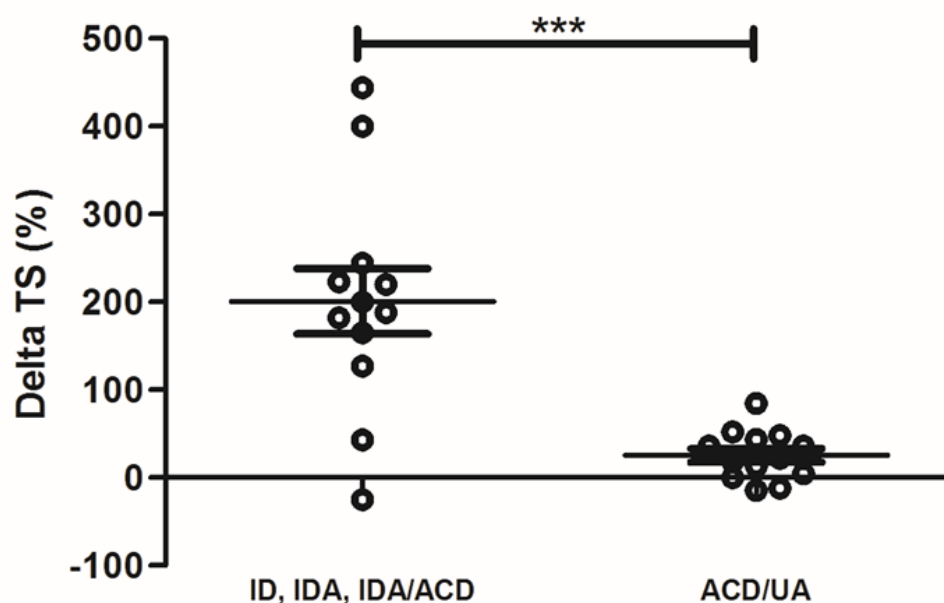


Figure 27 : Augmentation relative de la saturation de la transferrine 4h après le test de surcharge en fer oral. Les valeurs de Delta TS sont significativement plus élevées dans le groupe avec carence martiale (ID, IDA, IDA/ACD, n=12) comparativement au groupe de patients anémiques sans déficit en fer (ACD/UA, n=13 ;  $p < 0,0001$ ).

Sur base des résultats obtenus pour la valeur d'hepcidinémie basale et du test d'absorption en fer oral, l'algorithme suivant est proposé pour l'identification d'une carence martiale chez le sujet âgé anémique (Figure 28).

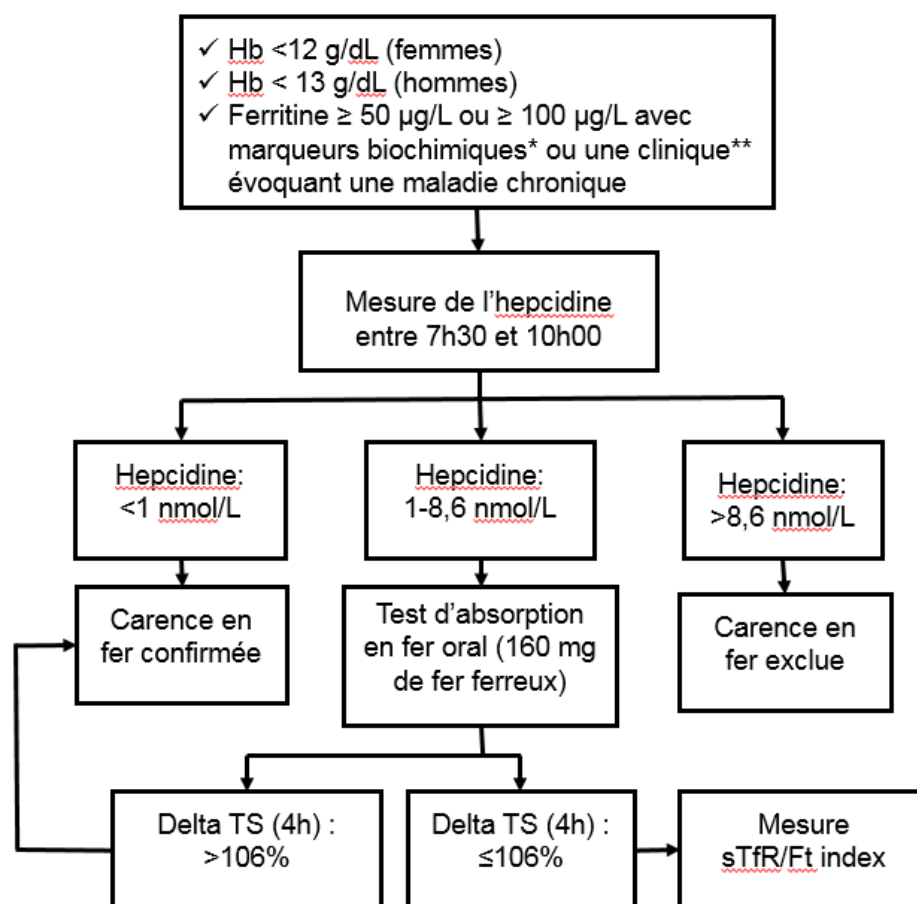


Figure 28 : Algorithme proposé pour la mise en évidence d'une carence martiale chez le sujet âgé anémique. Une mesure de l'hepcidine entre 7h30 et 10h peut être réalisée chez un patient anémique présentant un taux de ferritine supérieur ou égal à 50 µg/L. Cette valeur seuil pour la ferritine peut être augmentée à 100 µg/L lorsqu'un marqueur biochimique (\*CRP ≥ 5 mg/L) ou la clinique (\*\*Infection chronique, maladie autoimmune ou malignité) évoquent une maladie chronique (Theurl et al. 2009). Un taux d'hepcidine inférieur à 1 nmol/L permet de confirmer une carence en fer alors qu'un taux supérieur à 8.6 nmol/L permet de l'exclure. Pour des taux compris entre ces deux valeurs, un test d'absorption en fer oral, basé sur l'administration de 160 mg de fer ferreux avec mesure de la saturation de la transferrine, 4 heures après, peut être réalisé. Une élévation relative de la saturation de la transferrine (Delta TS) supérieure à 106% permet de confirmer un déficit en fer. Pour les patients avec Delta TS inférieur ou égal à 106%, une mesure du rapport de la concentration en récepteurs solubles sur le logarithme de la ferritine peut être proposée en dernier recours comme méthode non invasive pour évaluer le statut en fer, avant la réalisation d'une ponction médullaire.

#### 4.3.4 Discussion

Après 85 ans, l'anémie touche un individu sur cinq (Guralnik et al. 2004). L'anémie est donc un problème de santé fréquent dans la population vieillissante. Bien que l'anémie du sujet âgé soit généralement légère et bien tolérée, compte tenu d'une installation progressive, elle peut avoir diverses conséquences : augmentation de la mortalité, aggravation d'une pathologie cardiovasculaire pré-existante, déclin de la fonction cognitive, diminution de la mobilité par diminution de la force musculaire, diminution de la densité minérale osseuse (Busti et al. 2014, Andrès et al. 2013). L'anémie ne doit pas être considérée comme une conséquence inévitable du vieillissement, son origine doit être identifiée afin de permettre un traitement adapté quand cela est possible.

La baisse de la concentration en hémoglobine est souvent multifactorielle chez le sujet âgé avec une association fréquente entre carence en fer et processus inflammatoire chronique (Petrosyan et al. 2012). L'issue la plus importante au niveau clinique n'est pas de différencier l'IDA, l'IDA/ACD et l'ACD mais de pouvoir identifier une carence martiale en présence d'un phénomène inflammatoire concomittant. Une thérapie de supplémentation en fer oral ou parentéral sera réalisée lors de mise en évidence de déficit martial avec recherche de l'origine de cette carence. L'administration de suppléments ferriques chez un patient présentant une ACD isolée n'est, par contre, pas recommandée (Chua et al. 2013, Theurl et al. 2009).

Les paramètres biochimiques classiques pour évaluer le statut ferrique, tels que la ferritine et la TS, ont isolément une efficience diagnostique faible pour identifier une carence martiale chez le patient ACD. Par contre, l'index sTfR/Ft semble avoir de bonnes performances diagnostiques dans cette situation clinique. Dans une étude prospective réalisée chez des patients de plus de 80 ans, cet index a permis d'identifier une carence martiale avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 93% alors que les marqueurs biochimiques classiques comme la TS et la ferritine n'ont permis l'identification d'un déficit en fer que chez 16% des patients investigués (Rimon et al. 2002).

La ponction médullaire est considérée comme la technique gold standard pour l'évaluation du statut ferrique. Elle est néanmoins très peu utilisée dans cette indication chez le patient âgé. La fragilité d'une telle population est, en effet, importante. On



considère qu'une ponction médullaire peut être réalisée lorsque la durée de vie estimée du patient est supérieure à trois mois (Stauder et al. 2018).

L'hépcidine est un candidat potentiel pour identifier un déficit en fer lors de maladie chronique, compte tenu de son rôle essentiel dans la régulation systémique du fer et de son évolution opposée lors de syndromes inflammatoires et de carence martiale (Girelli et al. 2016). En plus de ce comportement variable selon les stimuli, il semble exister une hiérarchie entre les différents signaux impactant la transcription de l'hépcidine, avec un effet négatif dominant de la carence martiale par rapport à l'effet positif de l'inflammation (Darshan et al. 2010). Les patients IDA/ACD pourraient répondre à l'administration de fer oral. En effet, les taux d'hépcidine sérique sont bas chez les patients IDA/ACD avec une expression élevée de la ferroportine duodénale (Theurl et al. 2009). Enfin, il est suggéré que la réponse de l'hépcidine à un test de surcharge en fer oral pourrait constituer un marqueur de choix pour évaluer le statut ferrique d'un individu (Kroot et al. 2011).

Dans cette troisième partie du projet, nous avons évalué si l'hépcidinémie basale pourrait être un outil intéressant dans l'identification d'une carence en fer chez un sujet âgé anémique présentant un syndrome inflammatoire concomittant.

Les concentrations médianes en hépcidine ne sont pas significativement différentes entre les hommes et femmes pour les 328 patients ayant eu un dosage basal de ce peptide. Ces résultats rejoignent ceux de den Elzen et al n'ayant mis en évidence aucune différence significative au niveau des taux d'hépcidine selon le sexe pour 490 individus de 85 ans (den Elzen et al. 2013). Des taux d'hépcidine plus bas sont décrits chez la femme avant la ménopause, ces valeurs étant significativement diminuées par rapport aux individus de sexe masculin. Cette différence selon le sexe s'atténue avec l'âge. Lors de la ménopause, les taux d'hépcidine s'élèvent suite à l'arrêt des pertes sanguines menstruelles, avec augmentation progressive des taux de ferritine (Galesloot et al. 2011).

Le pourcentage de patients anémiques retrouvés dans notre cohorte de patients se présentant à l'hôpital de jour pour un bilan gériatrique est de 23,8%. Il est similaire à celui rapporté (23,3%) dans une étude néerlandaise chez des individus âgés de 85 ans et non hospitalisés (den Elzen et al. 2013).

Après analyse multivariable, la ferritine, la CRP et la créatinine sont associées de manière indépendante aux valeurs basales d'hepcidine. Les stimuli connus pour affecter la transcription du peptide, tels que le statut ferrique et l'inflammation (Girelli et al. 2016), semblent donc être maintenus en cours de vieillissement. L'association obtenue entre l'hepcidinémie et la créatinine sérique pourrait être expliquée par l'augmentation des concentrations en hepcidine observée lors de la diminution du taux de filtration glomérulaire. En effet, l'hepcidine est un petit peptide, librement filtré au niveau glomérulaire puis réabsorbé par les tubules rénaux (Kroot et al. 2011).

Une élévation des concentrations en hepcidine est décrite lors de progression d'une maladie rénale chronique (Troutt et al. 2013). Cette association inverse entre, d'une part, les taux d'hepcidine et, d'autre part, le taux de filtration glomérulaire reste néanmoins à éclaircir. En effet, les résultats de l'étude de Troutt et al ainsi que Goyal et al sont basés sur un dosage immunologique d'hepcidine, connu pour présenter des réactions croisées avec les isoformes tronqués du côté N-terminal et non actifs au niveau du métabolisme ferrique (Troutt et al. 2013, Goyal et al. 2017).

En analysant les taux d'hepcidine entre les groupes de patients, des concentrations significativement plus basses de ce peptide ont été identifiées chez les patients avec carence latente en fer, IDA et IDA/ACD par rapport aux patients ACD, UA et non anémiques. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par l'équipe de Thomas et al qui n'a pas objectivé de différence significative entre la population de patients IDA/ACD et les patients avec ACD isolée. Ces discordances au niveau des résultats peuvent être attribuées au type de population investiguée ainsi qu'aux critères utilisés pour la classification des anémies. Thomas et al ont stratifié les patients anémiques sur base de l'index sTfR/Ft et sur base du contenu en hémoglobine réticulocytaire ; certains patients ont été considérés comme souffrant d'anémie inflammatoire avec un taux de ferritine sérique à 26 µg/L (Thomas et al. 2011).

Dans notre étude, les patients avec ACD ont des taux d'hepcidine statistiquement augmentés par rapport aux patients non anémiques. Cette tendance est déjà bien décrite dans la littérature (den Elzen et al. 2013), l'hepcidine jouant un rôle essentiel dans l'anémie des maladies inflammatoires chroniques (Nemeth et al. 2004b).

Différentes équipes ont décrit des taux d'hepcidine plus élevés chez les patients âgés avec anémie d'origine indéterminée par rapport aux sujets non anémiques. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence d'une inflammation chronique à bas

bruit chez les patients UA. Celle-ci s'accompagnerait du relargage de diverses cytokines qui stimuleraient la transcription d'hépcidine. L'augmentation de l'hépcidinémie pourrait alors induire une carence en fer fonctionnelle altérant une érythropoïèse optimale (den Elzen et al. 2013, Price et al. 2011). Price et al a mis en évidence des taux plus élevés d'hépcidine et de ferritine chez les patients UA versus non anémiques (groupe contrôle). De manière paradoxale, les concentrations en IL-6, un régulateur positif puissant de la transcription de l'hépcidine (Nemeth et al. 2004b), étaient identiques entre les deux groupes. Les taux d'hépcidine plus élevés observés pour les patients UA, semblent être plutôt expliqués par la différence de statut ferrique entre les deux groupes. En effet, les patients avec carence en fer latente n'ont pas été exclus du groupe contrôle. Une autre explication à ces résultats différents est la technique immunologique utilisée par l'équipe de Price, pouvant reconnaître d'autres isoformes que l'hépcidine-25 (Price et al. 2011). A l'heure actuelle, le rôle de l'hépcidine dans le développement de l'anémie inexpliquée du sujet âgé est minimisé (Busti et al. 2014). Dans notre étude, aucune différence significative des taux d'hépcidine n'a pu être objectivée entre les patients non anémiques et les patients avec une anémie d'origine indéterminée.

L'efficience diagnostique de l'hépcidine basale dans le diagnostic différentiel des anémies (IDA, IDA/ACD et ACD) est sujette à controverse dans la littérature. Les résultats diffèrent selon les critères hématologiques et biochimiques utilisés pour stratifier les populations ainsi que selon la technique de dosage utilisée pour la quantification de l'hépcidine (Kroot et al. 2012). Dans la troisième partie de notre projet, la classification des patients anémiques a été réalisée sur des critères cliniques, la CRP, la ferritine et l'index sTfR/Ft. Nous avons démontré que la concentration basale en hépcidine pour un prélèvement standardisé entre 7h30 et 10h00, constituait un marqueur utile pour identifier une carence martiale en présence d'une pathologie inflammatoire chronique. En utilisant une valeur seuil inférieure à 1,8 nmol/L, une sensibilité de 75% et une spécificité de 96% sont atteintes. Ces résultats confortent ceux publiés par l'équipe de van Santen et al ayant étudié l'utilité de l'hépcidinémie dans l'identification de la carence martiale chez les patients anémiques présentant une arthrite rhumatoïde et une inflammation active. Une valeur d'hépcidine sérique inférieure à 2,4 nmol/L a permis de discriminer les patients IDA et IDA/ACD, des patients présentant une ACD isolée avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 88% (van Santen et al. 2011). L'utilité de l'hépcidine dans cette même indication

clinique a été décrite chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques intestinales par l'équipe de Bergamaschi et al. En utilisant une concentration en hepcidine inférieure à 2 nmol/L, 85% des patients avec carence martiale ont pu être différenciés des patients ACD (Bergamaschi et al. 2013). L'absence de matériel de référence pour le dosage de l'hepcidine complique néanmoins l'application à grande échelle de ces valeurs seuils. Karlsson et al ont étudié l'efficacité de différents marqueurs du métabolisme ferrique dans le diagnostic différentiel des anémies du sujet âgé. Le gold standard utilisé pour la classification des patients était l'absence de fer colorable au frottis médullaire. L'auteur a conclu à l'absence de supériorité de l'hepcidine, que cette dernière soit quantifiée par technique immunologique (Karlsson 2017) ou par spectrométrie de masse (Karlsson 2015) par rapport au taux de ferritine, dans l'identification d'une carence martiale en présence d'un syndrome inflammatoire. L'auteur n'a cependant pas précisé si les prélèvements sanguins pour la mesure de l'hepcidinémie avaient été standardisés pour une tranche horaire particulière. Dans notre étude, l'efficacité diagnostique de la ferritine n'a pas pu être évaluée étant donné que ce paramètre biochimique a été utilisé pour catégoriser les patients anémiques.

La dose de fer ferreux choisie pour le test de surcharge en fer oral a été sélectionnée sur base des résultats de la littérature. Des doses de fer ferreux équivalentes à 65 mg (Ganz et al. 2008, Girelli et al. 2011), 100 mg (Kobune et al. 2011) et 130 mg (Hwang et al. 2011) ont été utilisées par différentes équipes pour les tests d'absorption en fer oral. Une dose de fer ferreux de 160 mg a été choisie dans notre étude afin d'augmenter les chances d'obtenir un impact sur la TS et l'hepcidinémie. En effet, l'équipe de Ganz et al a évalué la cinétique de réponse du fer sérique et de l'hepcidinémie après administration de 65 mg de fer ferreux chez trois volontaires sains et a montré que certains contrôles ne répondaient qu'à une dose de 130 mg (Ganz et al. 2008).

Le choix du temps de prélèvement, c'est-à-dire 4h après la dose de fer ferreux, est basé sur les résultats du TAFO réalisés chez les volontaires sains. Alors que la valeur de la TS reste constante chez les volontaires n'ayant pas ingéré le fer ferreux, elle augmente significativement chez les contrôles ayant réalisé le TAFO, 4 heures après la prise, pour revenir à sa valeur basale après 7h30. Cette élévation de la TS à 4 heures est le résultat de l'absorption de fer au niveau intestinal. En effet, l'augmentation du fer sérique après administration orale corrèle avec la quantité de fer

absorbée réellement par le tractus digestif (Hoppe & Hulthén 2006). Ces résultats confirment ceux obtenus dans la littérature. Hwang et al. ont suivi l'évolution de la TS chez des volontaires, 1, 2, 4 et 8 heures après une dose de 130 mg de fer. L'augmentation relative de TS la plus importante a été observée 4h après la dose de fer oral avec un pourcentage d'élévation plus conséquent pour les volontaires présentant un déficit martial (Hwang et al. 2011).

L'hepcidine augmente progressivement, 4 heures et 7 heures et demie après administration de la dose, pour les volontaires ayant et n'ayant pas ingéré le fer ferreux. Cette élévation significative de l'hepcidinémie dans les deux groupes semble être plutôt reliée à la variation circadienne du peptide plutôt qu'à la stimulation de sa production hépatique suite à la dose de fer ingérée. La cinétique des taux d'hepcidine post-prise de fer est impactée par la dose avec un pic d'élévation 12 heures après prise de 65 ou 130 mg de fer ferreux (Ganz 2008). Zimmermann et al ont mis en évidence une élévation significative de l'hepcidinémie 6 heures après l'administration de 60 mg de fer ferreux chez des volontaires sains (Zimmermann et al. 2009). Le temps de prélèvement choisi pour le test d'absorption en fer oral réalisé dans cette troisième partie du projet a donc été fixé à 4h afin de pouvoir bénéficier à la fois de l'augmentation significative de la TS et de l'hepcidinémie. Cet intervalle de réalisation pour le prélèvement veineux est optimal au niveau logistique. En effet, la plupart des patients qui viennent pour un bilan gériatrique, arrivent à l'hôpital de jour entre 7h30 et 9h et sont disponibles sur le temps de midi.

Les valeurs d'hepcidinémie basale corrélaient négativement avec le Delta TS ainsi que le Delta hepcidine et, positivement avec la ferritine et la CRP après analyse multivariable. L'augmentation relative de la TS, représentée par le Delta TS, est significativement plus importante chez les patients présentant une carence martiale (ID, IDA, IDA/ACD) comparativement aux patients anémiques (UA/ACD). Les patients avec déficit en fer ont les taux d'hepcidine les plus bas et montrent l'absorption de fer la plus intense, 4h après le test de surcharge. En utilisant une valeur seuil supérieure à 106% pour l'élévation relative de la TS, 83% des patients présentant un déficit martial sont identifiés. Ces résultats confortent ceux obtenus dans des modèles murins où il a été démontré que la carence en fer altère la stimulation de la transcription de l'hepcidine après injection de LPS (Darshan et al. 2013). D'autres études utilisant des préparations isotopiques de fer, ont mis en évidence une corrélation inverse significative entre les valeurs d'hepcidine et l'absorption de fer duodénal (Roe et al.

2009, Young et al. 2009). Les taux d'hepcidine basale ont également été identifiés comme marqueur de réponse au fer oral chez les patients IDA (Bregman et al. 2013).

Malgré l'absence de différence significative pour le Delta hepcidine entre les patients présentant une carence martiale (ID, IDA et IDA/ACD) et les patients anémiques sans déficit martial (ACD et UA), les valeurs basales d'hepcidine corrélaient négativement avec le Delta hepcidine. Les patients présentant un phénomène inflammatoire ont des taux élevés d'hepcidine et ne semblent ne pas montrer d'augmentation de la concentration de ce peptide, 4 heures après la dose de fer ferreux.

En conclusion de cette troisième partie du projet, nous avons démontré que la mesure de l'hepcidine basale, standardisée entre 7h30 et 10h00, est un outil intéressant pour identifier la carence martiale chez le patient anémique. Les résultats obtenus pour ce prélèvement basal et sur base du test d'absorption en fer oral, ont mis en évidence que les patients avec anémie combinée (IDA/ACD) semblent se comporter comme les patients IDA. Ils présentent des concentrations basses d'hepcidine et ont une augmentation relative de la saturation de la transferrine après réalisation du TAFO, plus élevée par rapport aux patients anémiques sans carence martiale. La corrélation négative obtenue entre les valeurs basales d'hepcidine et l'augmentation relative de la TS après test de surcharge suggèrent que l'hepcidinémie pourrait prédire la probabilité d'absorption de fer duodénal chez les patients âgés après avoir exclu toutes les causes associées à un phénomène de malabsorption (infection à *Helicobacter pylori*, gastrite atrophique, maladie coeliaque) et permettre une optimisation personnalisée de la supplémentation (Busti et al. 2014). Cette hypothèse doit être néanmoins confirmée par des études prospectives incluant une large cohorte.

Cette troisième partie du projet présente quelques limitations. Tout d'abord, la classification des anémies ne s'est pas réalisée sur base du gold standard qu'est la ponction médullaire. Une forte hétérogénéité des concentrations en hepcidine est rapportée entre les différentes techniques analytiques permettant sa quantification, cette disparité étant principalement expliquée par l'absence de matériel de référence (van der Vorm et al. 2016). Ces différences compliquent fortement la généralisation des valeurs seuils publiées dans la littérature. Les résultats de cette troisième partie ont été établis sur base d'un calibrateur provenant de la firme Peptide Institute, largement utilisé dans les techniques de spectrométrie de masse pour la quantification de l'hepcidine (Itkonen et al. 2012b, Lefebvre et al. 2015, van der Vorm et al. 2016).

La réalisation du TAFO et l'utilisation de l'augmentation relative de la TS, après administration de fer ferreux, pour évaluer le statut en fer doivent être confirmées sur une population de patients plus étendue. En effet, seuls 12 patients présentant une carence en fer et 13 patients avec anémie inflammatoire ou inexpliquée ont été inclus.

Les points forts de notre étude sont le nombre élevé de patients inclus pour la mesure de l'hepcidinémie basale, le caractère prospectif de l'étude, la standardisation des heures de prélèvement, ainsi que la mesure de l'hepcidine par spectrométrie de masse.

## 5 Discussion générale.

Le premier objectif de notre projet a été de développer une méthode spécifique et sensible pour la quantification de l'hepcidine dans une matrice sérique et urinaire. Une série de précautions ont été prises lors de la mise au point de notre technique pour limiter les phénomènes d'agrégation et d'adsorption de l'hepcidine. Nous avons démontré l'importance de la nature du liquide utilisé pour la reconstitution de l'hepcidine lyophilisée ainsi que l'impact du type de vial requis pour la préparation des solutions stocks et des solutions de travail aqueuses.

La méthode décrite présente des critères de fiabilité analytique conformes aux objectifs préalablement fixés, à savoir une erreur totale inférieure à 30%.

Une série d'améliorations ont été apportées en cours d'utilisation de cette technique; le premier changement étant le passage à une technique de microélution, plus rapide, plus facile à automatiser et surtout, permettant de limiter les transferts successifs dans différents vials. Ce dernier phénomène est source d'erreur et s'accompagne d'un risque d'adsorption et donc de pertes de l'hepcidine. La deuxième modification concerne le recours à un spectromètre de masse plus sensible avec un abaissement de la limite de quantification de 0,48 nmol/L à 0,28 nmol/L pour une matrice sérique. Le troisième changement implique le calibrateur, initialement produit par Eurogentec. En effet, en cours de développement, des variations importantes ont été observées au niveau de la production du peptide tels que le changement fréquent de contenant (verre versus polypropylène), les modifications des sites de liaison entre les différentes cystéines, et enfin, une concentration en hepcidine variable selon le lot de production. Notre choix final s'est donc porté sur un calibrateur synthétique produit par la firme Peptide Institute. Ce dernier présente une stabilité de production constante d'un lot à l'autre et est fréquemment utilisé comme calibrateur pour les différentes méthodes décrites dans la littérature (van der Vorm et al. 2016). Le quatrième changement concerne la matrice de reconstitution utilisée pour la droite de calibration avec un passage à l'utilisation d'un sérum de chèvre plutôt qu'un pool sérique humain traité au charbon actif. L'utilisation de cette matrice a permis d'avoir une procédure plus standardisée et de gagner du temps par rapport à la préparation du pool humain. Les différentes étapes d'évolution de la technique LC-MS/MS au cours des années pour le dosage de l'hepcidine sérique sont décrites dans le tableau 10.



Tableau 10 : Différents modifications apportées au cours des années par rapport à la méthode décrite initialement (Wolff et al. 2013).

Année	Calibreur-Liquide de reprise	Matrice de reconstitution des calibrateurs	Standard interne marqué / liquide de reprise	Extraction des échantillons	Spectro. de masse	Transitions de l'hepcidine	Transition de l'hepcidine marquée	LoQ	CV % (précision intermédiaire) Moyenne de conc.	Biais % Moyenne de conc.
<b>2011-2014</b>	Eurogentec - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	Pool sérique traité par charbon actif	Eurogentec [DTHFPI( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>1</sub> )Cl( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>1</sub> )FCCGCCHR SKCGMCCCKT-OH] - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	Cartouche d'extraction en phase solide HLB 3cc/60 mg	6460, Agilent Technologies	930.4→1144.9 (y21[2+] quantifier) 930.5→353.7 (b3 qualifier)	935.1→1151.6 (y21[2+])	0.48 nmol/L	9.5% (1 nmol/L) 6% (5 nmol/L) 7.4% (25 nmol/L)	-1.6% (1 nmol/L) -1.6% (5 nmol/L) -2.6% (25 nmol/L)
<b>2014-2016</b>	Eurogentec - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	Pool sérique traité par charbon actif	Eurogentec - [DTHFPI( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>1</sub> )Cl( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>1</sub> )FCCGCCHR SKCGMCCCKT-OH] - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	plaque microéluvative Oasis HLB	6490 Agilent Technologies	930.4→1144.9 (y21[2+] quantifier) 930.5→353.7 (b3 qualifier)	935.1→1151.6 y21[2+]	0.28 nmol/L	5.7% (0.5 nmol/L) 5.8% (2 nmol/L) 7.2% (10 nmol/L)	-3.1% (0.5 nmol/L) 1.5% (2 nmol/L) 0.1% (10 nmol/L)
<b>2016-2017</b>	Peptide Institute - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	Pool sérique traité par charbon actif	Peptide Institute [DTH( <sup>13</sup> C <sub>9</sub> , <sup>15</sup> N)FP ICI( <sup>13</sup> C <sub>9</sub> , <sup>15</sup> N)FCC( <sup>15</sup> N)GCCHRSKC GMCCCKT] - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	plaque microéluvative Oasis HLB	6490 Agilent Technologies	698.1→354 (b3 quantifier) 698.1→501.2 (b4 qualifier)	703.1 → 354.1 (b3)	0.4 nmol/L	12.9% (4.2 nmol/L) 9.6% (14.4 nmol/L)	-
<b>2018-2019</b>	Peptide Institute - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	Sérum de chèvre	Peptide Institute [DTH( <sup>13</sup> C <sub>9</sub> , <sup>15</sup> N)FP ICI( <sup>13</sup> C <sub>9</sub> , <sup>15</sup> N)FCC( <sup>15</sup> N)GCCHRSKC GMCCCKT] - Eau/ACN/AF 80/20/0.1 (v/v/v)	plaque microéluvative Oasis HLB	6490 Agilent Technologies	698.1→354 (b3 quantifier) 698.1→501.2 (b4 qualifier)	703.1 → 354.1 (b3)	0.4 nmol/L	-	-

ACN : acétonitrile, AF : acide formique

Les concentrations en hepcidine diffèrent fortement selon les études et les techniques utilisées, cette hétérogénéité pouvant s'expliquer par l'absence de méthode de référence et surtout de matériel primaire de référence (Kroot et al. 2012). La valeur assignée pour la concentration en hepcidine peut varier de 20% selon la firme produisant ce peptide (Abbas et al. 2018, Laarakkers et al. 2013) ; ce phénomène peut être dû à la configuration de l'hepcidine, qui peut ne pas se trouver dans son état natif circulant, ainsi qu'à un degré d'impuretés variable (van der Vorm et al. 2016). Cette variation des taux d'hepcidine rend difficilement transposables les valeurs décisionnelles retrouvées dans la littérature (Kroot et al. 2012).

De nombreux efforts sont actuellement mis en place pour la standardisation du dosage de l'hepcidine avec définition d'un matériel primaire de référence traçable vis-à-vis de l'International System of Units, la détermination d'une méthode de référence et d'un matériel de référence secondaire commutable. Concernant ce dernier point, le choix semble se porter sur un plasma natif lyophilisé avec ajout d'un agent cryolyoprotecteur plutôt qu'un plasma enrichi en hepcidine synthétique. Ce matériel de référence permettrait de réduire les variations inter-méthodes de 75%. Après cette harmonisation, 7,7% de la variation observée pourrait être encore être expliquée par l'hétérogénéité des méthodes, cette variation étant tout à fait permise compte tenu des limites cliniquement acceptables maximales recommandées pour la quantification de l'hepcidine (van der Vorm et al. 2016).

Le deuxième objectif de notre projet a été d'identifier un agent stabilisateur pour la mesure de l'hepcidine urinaire et d'évaluer l'efficacité diagnostique de l'hepcidinurie sur collecte de 24h pour l'identification d'une carence martiale.

L'albumine bovine sérique peut être considérée comme un agent stabilisateur potentiel pour la quantification de l'hepcidine dans des échantillons urinaires. Elle limite la propension de l'hepcidine à s'adsorber sur divers matériaux dans les milieux pauvres en protéines et permet d'augmenter la stabilité du peptide lorsque l'urine est conservée à température ambiante durant 24h. Utilisée sous forme solide, elle ne cause pas de problème lié à une dilution éventuelle.

La mesure de l'hepcidine sur collecte de 24h stabilisée présente une meilleure efficacité diagnostique pour l'identification d'une carence martiale, par rapport à un échantillon urinaire collecté à un moment déterminé. Même si la collecte de 24h est impactée par des difficultés logistiques et un risque de collecte incomplète, ce type

d'échantillonnage pourrait constituer un outil non invasif intéressant pour évaluer le statut martial dans une population pédiatrique. Bien que l'excrétion urinaire de l'hepcidine soit impactée par les fonctions glomérulaire et tubulaire (Kroot et al. 2011), de telles dysfonctions rénales restent rares dans la population pédiatrique.

Une supplémentation arbitraire en fer est proposée dans les zones géographiques à haute prévalence d'anémie sur carence martiale. Cette stratégie de supplémentation systématique est fortement controversée dans les régions concernées à la fois par une prévalence élevée d'IDA et d'infections parasitaires diverses dont la malaria. En effet, diverses études épidémiologiques ont démontré l'effet protecteur de la carence martiale quant à la virulence du parasite de type Plasmodium. Une supplémentation en fer pourrait donc favoriser la croissance parasitaire (Camaschella 2019).

Une identification du statut martial par une mesure de l'hepcidine urinaire sur collecte de 24h permettrait de cibler les enfants nécessitant une supplémentation ferrique. Dans les régions endémiques de Malaria, un traitement anti-malarique devrait être administré conjointement à la complémentation en fer pour éviter la croissance de pathogènes latents.

Le troisième objectif de notre projet a concerné l'utilité de l'hepcidinémie dans la différenciation des anémies du sujet âgé ainsi l'évaluation de la corrélation entre les valeurs basales d'hepcidine et la réponse aiguë après administration de fer oral.

La concentration en hepcidine est impactée par une série de stimuli incluant les réserves en fer, l'inflammation, l'activité érythropoïtique (Girelli et al. 2016). Le résultat du dosage de l'hepcidine intègre toutes ces variations et présente un avantage par rapport aux algorithmes compliqués utilisés pour identifier une carence martiale en présence d'un syndrome inflammatoire concomitant. Ces algorithmes font intervenir la détermination de plusieurs paramètres tels que la ferritine, la CRP, le rapport entre la concentration en récepteur soluble de la transferrine et le logarithme du taux de ferritine, le contenu en hémoglobine réticulocytaire avec des seuils décisionnels qui peuvent être variables et également une absence de standardisation pour certains marqueurs (Harms & Kaiser 2015).

Dans cette troisième partie de projet, nous avons démontré que l'hepcidine pourrait être un marqueur intéressant dans cette indication clinique. Etant donné l'absence de remboursement actuel pour le dosage de ce peptide, la détermination de l'hepcidine

doit être réservée aux cas ambigus ; c'est-à-dire aux patients âgés présentant une anémie avec un taux de ferritine supérieur à 50 µg/L. Cette valeur seuil peut être augmentée à 100 µg/L lors de maladie chronique.

La cinétique de l'hepcidine et/ou de la saturation en fer en réponse à l'administration de fer oral pourrait être évaluée en tant que marqueur de choix pour identifier une carence martiale lors de maladie chronique (Kroot et al. 2011).

Les premiers tests de surcharge en fer oral, réalisés pour identifier une malabsorption intestinale, impliquaient l'administration de solutions isotopiques avec mesure du degré d'incorporation de l'isotope dans les érythrocytes, 2 semaines après. Ces tests de surcharge en fer, présentaient l'inconvénient d'être lourds, difficiles à réaliser en pratique clinique et d'exposer le patient à des isotopes. Les tests de surcharge en fer oral non marqué sont plus faciles à réaliser logistiquement. Une administration de 50 à 60 mg de fer ferreux avec mesure de la concentration en fer sérique 1 à 2h post-dose est souvent décrite dans la littérature pour identifier une malabsorption intestinale (Lopez et al. 2016, Camaschella 2017). Néanmoins, le protocole de réalisation de ces tests présente une variabilité importante tant au niveau de la dose de fer à administrer et de la formulation du fer (sulfate, fumarate), que du temps après lequel les prélèvements pour la mesure de la saturation de la transferrine doivent être effectués. A l'heure actuelle, il n'existe aucun test d'absorption en fer oral validé prospectivement pour confirmer ou exclure une malabsorption en fer (Kloepfer et al. 2015). Malgré tous ces inconvénients, ce test pourrait s'avérer utile pour identifier les patients répondeurs à l'administration de fer oral et pour mettre en évidence une carence martiale chez un patient présentant une maladie chronique. En effet, l'équipe de Kobune et al a démontré que l'absorption de fer oral, évaluée sur base de l'augmentation relative de la TS, était augmentée chez les patients ACD, diminuée chez les patients IDA et intermédiaire chez les sujets sains (Kobune et al. 2011).

Dans notre troisième partie de projet, une relation significative est identifiée entre l'hepcidinémie basale et la réponse aiguë au fer oral.

## 6 Conclusions et perspectives

Le développement de la méthode de dosage de l'hepcidine sérique nous a permis de proposer ce test en routine dans le laboratoire, avec maîtrise des conditions pré-analytiques. Il est impératif que la prise de sang soit effectuée dans une tranche horaire standardisée, équivalente à celle ayant été adoptée pour l'établissement des valeurs de référence. Diverses informations sont requises telles que le taux d'hémoglobine, le VCM, la TS, les valeurs des concentrations en CRP et en ferritine pour une évaluation optimale des résultats. Dans le futur, nous souhaiterions déterminer des intervalles de référence basés sur des tranches horaires spécifiques pour faciliter l'interprétation de la concentration en hepcidine lorsque le prélèvement sanguin n'est pas réalisé entre 8h00 et 11h00.

Dans le cadre du groupe de travail français sur l'hepcidine impliquant les universités de Montpellier, Rennes, Bordeaux, Paris Diderot et Bruxelles, une uniformisation des méthodes utilisées dans ces différents sites pour la quantification de l'hepcidine est en voie de finalisation. Le matériel de référence sélectionné est le calibrateur de la firme Peptide Institute reconstitué dans une matrice unique, adaptée pour limiter les phénomènes d'adsorption. Les différentes étapes de cette uniformisation ont permis d'évaluer les origines de la variation inter-méthode, s'expliquant surtout par la nature du matériel de calibration et, dans une moindre mesure, la matrice de reconstitution du calibrateur.

L'utilisation d'ABS est proposée comme outil efficace et peu coûteux pour limiter la variabilité pré-analytique urinaire de la mesure de l'hepcidine. L'efficacité diagnostique de l'hepcidinurie sur urine de 24h stabilisée, pour la mise en évidence d'une carence martiale est équivalente à celle mesurée sur plasma pour une population adulte. Une perspective serait de comparer les résultats d'hepcidine sérique et urinaire sur collecte de 24h dans une plus grande population et de se centrer sur la population infantile vu la haute prévalence de la carence martiale (Lopez et al. 2016). La concentration en ferritine, reflétant les réserves en fer tissulaire ainsi que celle de la zinc-protoporphyrine, permettant l'identification d'une érythropoïèse déficiente en fer, pourraient être mesurées conjointement dans cette population particulière pour une interprétation correcte du statut fer. Le comportement rénal (Peeters et al. 2013) et la variation pré-analytique importante pour la mesure de l'hepcidine urinaire (Kroot et al. 2009) compliquent l'interprétation de l'hepcidinurie. Grâce à l'ajout d'un agent stabilisateur, comme l'albumine bovine lyophilisée, l'hepcidinurie déterminée sur

collecte de 24h, pourrait s'avérer intéressante pour évaluer un déficit en fer dans une population pédiatrique où la prévalence des dysfonctions rénales (glomérulaire et/ou tubulaire) reste très faible

L'hepcidine sérique et le TAFO sont des outils intéressants pour identifier une carence martiale chez le sujet âgé présentant une baisse de la concentration en hémoglobine. Sur base des résultats obtenus, un algorithme décisionnel est proposé dans cette indication.

Les valeurs basales d'hepcidine sont corrélées avec la réponse aiguë après administration de fer oral. Une perspective future serait d'évaluer si la valeur d'hepcidinémie basale et la réponse aiguë au test d'absorption au fer oral pourraient prédire la réponse optimale en fer oral à long terme, caractérisée par une augmentation du taux d'hémoglobine de plus de 2 g/dL après 3 semaines de traitement (Girelli et. 2018). Pour évaluer cette hypothèse, un nouveau projet d'étude sera initié très prochainement. La cohorte de patients étudiés sera une population dans laquelle le risque de co-morbidités et de médicaments multiples sera minimisé. Elle inclura des jeunes femmes présentant une anémie sur carence martiale. Celles-ci seront référées au service de gynécologie pour évaluation de saignements menstruels importants et placées sous supplémentation en fer per os. Nous établirons si l'hepcidinémie basale pourra être prédictive d'une réponse ou d'une absence de réponse au fer oral. En effet, les traitements de supplémentation en fer oral sont réalisés durant une période de trois mois minimum et peuvent s'accompagner d'effets indésirables tels que troubles digestifs et perturbation du microbiote (Girelli et al. 2018). Parmi les patientes adressées en consultation d'hématologie pour mise au point de saignements menstruels abondants, il est estimé que 38% d'entre elles sont réfractaires au traitement per os en fer (Hershko & Camaschella 2014). En mesurant précocement un biomarqueur prédictif d'une absence de réponse au fer oral, un passage immédiat à une forme parentérale pourra être proposé pour améliorer de la qualité de vie de ces patientes.

## 7 Bibliographie:

- Abbas IM, Hoffmann H, Montes-Bayón M, Weller MG. Improved LC-MS/MS method for the quantification of hepcidin-25 in clinical samples. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(16):3835-3846.
- Abbas IM, Vranic M, Hoffmann H, El-Khatib AH, Montes-Bayón M, Möller HM, Weller MG. Investigations of the Copper Peptide Hepcidin-25 by LC-MS/MS and NMR. *Int J Mol Sci*. 2018;2;19(8).
- Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Sly WS, Fleming RE. Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3):361-6.
- Anderson DS, Kirchner M, Kellogg M, Kalish LA, Jeong JY, Vanasse G, Berliner N, Fleming MD, Steen H. Design and validation of a high-throughput matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry method for quantification of hepcidin in human plasma. *Anal Chem*. 2011;1;83(21):8357-62.
- Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(Suppl 6):1559S-1566S.
- Andrès E, Serraj K, Federici L, Vogel T, Kaltenbach G. Anemia in elderly patients: new insight into an old disorder. *Geriatr Gerontol Int*. 2013;13(3):519-27.
- Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, Vieth KR, Jung G, Casu C, Rivella S, Jormakka M, Mackenzie B, Ganz T, Nemeth E. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood*. 2018;22;131(8):899-910.
- Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FW, Chapman R, Maxwell PH, Choi P. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. 2010;95(3):505-8.
- Bansal SS, Halket JM, Bomford A, Simpson RJ, Vasavda N, Thein SL, Hider RC. Quantitation of hepcidin in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2009;15;384(2):245-53.
- Bansal SS, Abbate V, Bomford A, Halket JM, Macdougall IC, Thein SL, Hider RC. Quantitation of hepcidin in serum using ultra-high-pressure liquid chromatography and a linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24(9):1251-9.
- Barron BA, Hoyer JD, Tefferi A. A bone marrow report of absent stainable iron is not diagnostic of iron deficiency. *Ann Hematol*. 2001;80:166-9.
- Bayele HK, McArdle H, Srai SK. Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor. *Blood*. 2006;15;108(13):4237-45.
- Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):9-22.
- Benyamin B, Ferreira MA, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RP, McEvoy BP, Hottenga JJ, Henders AK, Campbell MJ, Wallace L, Frazer IH, Heath AC, de Geus EJ, Nyholt DR, Visscher PM, Penninx BW, Boomsma DI, Martin NG, Montgomery GW, Whitfield JB. Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nat Genet*. 2009;41(11):1173-5.
- Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Costanzo F, Guerci M, Masotti M, Pasini A, Massari A, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, Corazza GR. Serum hepcidin in inflammatory bowel diseases: biological and clinical significance. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:2166-72.
- Bhatia P, Singh A, Hegde A, Jain R, Bansal D. Systematic evaluation of paediatric cohort with iron refractory iron deficiency anaemia (IRIDA) phenotype reveals multiple TMPRSS6 gene variations. *Br J Haematol*. 2017;177(2):311-318.
- Braga F, Infusino I, Dolci A, Panteghini M. Soluble transferrin receptor in complicated anemia. *Clin Chim Acta*. 2014;20;431:143-7.

- Bregman DB, Morris D, Koch TA, He A, Goodnough LT. Hepcidin levels predict nonresponsiveness to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol*. 2013;88:97-101.
- Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):403-10.
- Brissot P, Cavey T, Ropert M, Guggenbuhl P, Loréal O. Genetic hemochromatosis: Pathophysiology, diagnostic and therapeutic management. *Presse Med*. 2017;46(12 Pt 2):e288-e295.
- Brissot P, Bernard DG, Brissot E, Loréal O, Troadec MB. Rare anemias due to genetic iron metabolism defects. *Mutat Res*. 2018;777:52-63.
- Brissot P, Troadec MB, Loréal O, Brissot E. Pathophysiology and classification of iron overload diseases; update 2018. *Transfus Clin Biol*. 2019;26(1):80-88.
- Butterfield AM, Luan P, Witcher DR, Manetta J, Murphy AT, Wroblewski VJ, Konrad RJ. A dual-monoclonal sandwich ELISA specific for hepcidin-25. *Clin Chem*. 2010;56(11):1725-32.
- Busti F, Campostrini N, Martinelli N, Girelli D. Iron deficiency in the elderly population, revisited in the hepcidin era. *Front Pharmacol*. 2014;5:83.
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*. 2000;25(1):14-5.
- Camaschella C. Iron-Deficiency Anemia. *N Engl J Med*. 2015;30;373(5):485-6.
- Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev*. 2017;31(4):225-233.
- Camaschella C, Pagani A. Advances in understanding iron metabolism and its crosstalk with erythropoiesis. *Br J Haematol*. 2018;182(4):481-494.
- Camaschella C. Iron deficiency. *Blood* 2019;133(1):30-39.
- Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Core AB, Wang CY, Nairz M, Bouley R, Swirski FK, Babitt JL. Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. *Blood*. 2017;26;129(4):405-414.
- Casanovas G, Vujić Spasic M, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, Muckenthaler MU. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. 2013;98(3):444-7.
- Cherian S, Forbes DA, Cook AG, Sanfilippo FM, Kemna EH, Swinkels DW, Burgner DP. An insight into the relationships between hepcidin, anemia, infections and inflammatory cytokines in pediatric refugees: a cross-sectional study. *PLoS One* 2008;3:e4030.
- Chua AC, Klopčič BR, Ho DS, Fu SK, Forrest CH, Croft KD, Olynyk JK, Lawrance IC, Trinder D. Dietary iron enhances colonic inflammation and IL-6/IL-11-Stat3 signaling promoting colonic tumor development in mice. *PLoS One*. 2013;11:e78850.
- Clark RJ, Tan CC, Preza GC, Nemeth E, Ganz T, Craik DJ. Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem Biol*. 2011;25;18(3):336-43.
- Coffey R, Ganz T. Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. *J Biol Chem*. 2017;292(31):12727-12734.
- Cotton F, Thiry P, Boeynaems J. Measurement of soluble transferrin receptor by immunoturbidimetry and immunonephelometry. *Clin Biochem*. 2000;33(4):263-7.
- Cui Y, Wu Q, Zhou Y. Iron-refractory iron deficiency anemia: new molecular mechanisms. *Kidney Int*. 2009;76(11):1137-41.



Daher R, Lefebvre T, Puy H, Karim Z. Extrahepatic hepcidin production: The intriguing outcomes of recent years. *World J Clin Cases*. 2019;7(15):1926-1936.

Darshan D, Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene *Hamp* and pro-inflammatory cytokines to lipopolysaccharide. *Haematologica*. 2010;95:1660-7.

Daru J, Colman K, Stanworth SJ, De La Salle B, Wood EM, Pasricha SR. Serum ferritin as an indicator of iron status: what do we need to know? *Am J Clin Nutr*. 2017;106(Suppl 6):1634S-1639S.

De Falco L, Silvestri L, Kannengiesser C, Morán E, Oudin C, Rausa M, Bruno M, Aranda J, Argiles B, Yenicesu I, Falcon-Rodriguez M, Yilmaz-Keskin E, Kocak U, Beaumont C, Camaschella C, Iolascon A, Grandchamp B, Sanchez M. Functional and clinical impact of novel *TMPRSS6* variants in iron-refractory iron-deficiency anemia patients and genotype-phenotype studies. *Hum Mutat*. 2014;35(11):1321-9.

Dendukuri N, McCusker J, Belzile E. The identification of seniors at risk screening tool: further evidence of concurrent and predictive validity. *J Am Geriatr Soc*. 2004;52(2):290-6.

den Elzen WP, de Craen AJ, Wiegerinck ET, Westendorp RG, Swinkels DW, Gussekloo J. Plasma hepcidin levels and anemia in old age. The Leiden 85-Plus Study. *Haematologica*. 2013;98:448-54.

Diepeveen LE, Laarakkers CM, Peters HPE, van Herwaarden AE, Groenewoud H, Int'Hout J, Wetzels JF, van Swelm RPL, Swinkels DW. Unraveling Hepcidin Plasma Protein Binding: Evidence from Peritoneal Equilibration Testing. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(3).

Donker AE, Schaap CC, Novotny VM, Smeets R, Peters TM, van den Heuvel BL, Raphael MF, Rijnveld AW, Appel IM, Vlot AJ, Versluijs AB, van Gelder M, Granzen B, Janssen MC, Rennings AJ, van de Veerdonk FL, Brons PP, Bakkeren DL, Nijziel MR, Vlasveld LT, Swinkels DW. Iron refractory iron deficiency anemia: a heterogeneous disease that is not always iron refractory. *Am J Hematol*. 2016;91(12):E482-E490.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):776-81.

Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab*. 2015;22(5):777-87.

Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, Khovananth K, Mudd S, Mann N, Moresco EM, Beutler E, Beutler B. The serine protease *TMPRSS6* is required to sense iron deficiency. *Science*. 2008;320(5879):1088-92.

European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol*. 2010;53(1):3-22.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13(4):399-408.

Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14025-8.

Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, Mayo MM, Samuel SM, Strouse JJ, Markianos K, Andrews NC, Fleming MD. Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*. 2008;40(5):569-71.

Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood*. 2010;115(18):3817-26.

Folgueras AR, de Lara FM, Pendás AM, Garabaya C, Rodríguez F, Astudillo A, Bernal T, Cabanillas R, López-Otín C, Velasco G. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*. 2008;112(6):2539-45.

Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, Wetzels JF, Kiemeny LA, Sweep FC, den Heijer M, Swinkels DW. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*. 2011 Jun;117(25):e218-25.

Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10):4292-7.

Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1721-41.

Ganz T. Hepcidin and the global burden of iron deficiency. *Clin Chem* 2015;61:577-8.

Ganz T. Erythropoietic regulators of iron metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2018: S0891-5849(18)31188-2.

Garbowski MW, Ma Y, Fucharoen S, Srichairatanakool S, Hider R, Porter JB. Clinical and methodological factors affecting non-transferrin-bound iron values using a novel fluorescent bead assay. *Transl Res*. 2016;177:19-30.e5.

Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C, Stremmel W. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood*. 2003;102(1):371-6.

Girelli D, Trombini P, Busti F, Campostrini N, Sandri M, Pelucchi S, Westerman M, Ganz T, Nemeth E, Piperno A, Camaschella C. A time course of hepcidin response to iron challenge in patients with HFE and TFR2 hemochromatosis. *Haematologica*. 2011;96:500-6.

Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood*. 2016;127(23):2809-13.

Girelli D, Ugolini S, Busti F, Marchi G, Castagna A. Modern iron replacement therapy: clinical and pathophysiological insights. *Int J Hematol*. 2018;107(1):16-30.

Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):188-202.

Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB; British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut*. 2011;60(10):1309-16.

Goyal H, Mohanty S, Sharma M, Rani A. Study of anemia in nondialysis dependent chronic kidney disease with special reference to serum hepcidin. *Indian J Nephrol*. 2017;27(1):44-50.

Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, Kroot JJ, den Heijer M, Tjalsma H, Swinkels DW, Sweep FG. High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol*. 2009;146(3):317-25.

Gunshin H, Starr CN, Drenth C, Fleming MD, Jin J, Greer EL, Sellers VM, Galica SM, Andrews NC. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*. 2005;106(8):2879-83.

Guralnik JM, Eisenstaedt RS, Ferrucci L, Klein HG, Woodman RC. Prevalence of anaemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anaemia. *Blood*. 2004;104:2263-8.

Guyatt G. Transferrin as a predictor of iron deficiency. *Am J Med*. 1992;92(4):453.

Hamdi A, Roshan TM, Kahawita TM, Mason AB, Sheftel AD, Ponka P. Erythroid cell mitochondria receive endosomal iron by a "kiss-and-run" mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(12):2859-2867.

Harms K, Kaiser T. Beyond soluble transferrin receptor: old challenges and new horizons. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29:799-810.

Hawkins RC. Total iron binding capacity or transferrin concentration alone outperforms iron and saturation indices in predicting iron deficiency. *Clin Chim Acta.* 2007;380(1-2):203-7.

Heeren TJ, Lagaay AM, von Beek WC, Rooymans HG, Hijmans W. Reference values for the Mini-Mental State Examination (MMSE) in octo- and nonagenarians. *J Am Geriatr Soc.* 1990;38:1093-6.

Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood.* 2014;123(3):326-33.

Hoppe M, Hulthén L. Validation of the clinical approach of using the induced serum iron increase after 1h as a measure of iron absorption. *Clin Nutr.* 2006;25(1):163-5.

Houbart V, Cobraiville G, Lecomte F, Debrus B, Hubert P, Fillet M. Development of a nano-liquid chromatography on chip tandem mass spectrometry method for high-sensitivity hepcidin quantitation. *J Chromatogr A.* 2011;1218(50):9046-54.

Huang ML, Austin CJ, Sari MA, Rahmanto YS, Ponka P, Vyoral D, Richardson DR. Hepcidin bound to  $\alpha$ 2-macroglobulin reduces ferroportin-1 expression and enhances its activity at reducing serum iron levels. *J Biol Chem.* 2013;288(35):25450-65.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I, *J Pharm Biomed Anal* 2004;36:579-86.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45:70-81.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45:82-96.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. *J Pharm Biomed Anal* 2008;48:760-71.

Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002;277:37597-603.

Hwang SI, Lee YY, Park JO, Norton HJ, Clemens E, Schrum LW, Bonkovsky HL. Effects of a single dose of oral iron on hepcidin concentrations in human urine and serum analyzed by a robust LC-MS/MS method. *Clin Chim Acta.* 2011;412(23-24):2241-7.

Itkonen O, Stenman UH, Parkkinen J, Soliymani R, Baumann M, Hämäläinen E. Binding of hepcidin to plasma proteins. *Clin Chem.* 2012;58(7):1158-60.

Itkonen O, Parkkinen J, Stenman UH, Hämäläinen E. Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method. *Clin Chim Acta.* 2012;413:696-701.

Joosten E, Hiele M, Ghooys Y, Pelemans W, Boogaerts MA. Diagnosis of iron-deficiency anemia in a hospitalized geriatric population. *Am J Med.* 1991;90:653-4.

Joosten E. Strategies for the laboratory diagnosis of some common causes of anaemia in elderly patients. *Gerontology.* 2004;50(2):49-56. Review.

- Joosten E. Iron deficiency anemia in older adults: A review. *Geriatr Gerontol Int*. 2018;18(3):373-379.
- Karlsson T. Mass spectrometry evaluation of the hepcidin-25 assay in the differential diagnosis of iron deficiency anaemia with concurrent inflammation and anaemia of inflammation in elderly patients. *Eur J Haematol*. 2015;95:467-71.
- Karlsson T. Evaluation of a competitive hepcidin ELISA assay in the differential diagnosis of iron deficiency anaemia with concurrent inflammation and anaemia of inflammation in elderly patients. *J Inflamm (Lond)*. 2017;14:21.
- Katsarou A, Pantopoulos K. *Hepcidin Therapeutics*. Pharmaceuticals (Basel). 2018;11(4).
- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. 2014;46(7):678-84.
- Kautz L. Erythroferrone, an erythroid regulator of iron metabolism. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(10):834-6.
- Kloepfer K, Schmid P, Willemin WA, Rüfer A. Reference values for oral iron absorption of bivalent iron in healthy volunteers. *Swiss Med Wkly*. 2015;145:w14063.
- Kobold U, Dülffer T, Dangl M, Escherich A, Kubbies M, Röddiger R, Wright JA. Quantification of hepcidin-25 in human serum by isotope dilution micro-HPLC-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008;54(9):1584-6.
- Kobune M, Miyanishi K, Takada K, Kawano Y, Nagashima H, Kikuchi S, Murase K, Iyama S, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Establishment of a simple test for iron absorption from the gastrointestinal tract. *Int J Hematol*. 2011;93:715-9.
- Koliaraki V, Marinou M, Vassilakopoulos TP, Vavourakis E, Tsochatzis E, Pangalis GA, Papatheodoridis G, Stamoulakatou A, Swinkels DW, Papanikolaou G, Mamalaki A. A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS One*. 2009;4(2):e4581.
- Konz T, Montes-Bayón M, Vaultont S. Hepcidin quantification: methods and utility in diagnosis. *Metallomics*. 2014;6(9):1583-90.
- Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000;480(2-3):147-50.
- Kroot JJ, Hendriks JC, Laarakkers CM, Klaver SM, Kemna EH, Tjalsma H, Swinkels DW. (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: implications for clinical studies. *Anal Biochem*. 2009;389(2):124-9.
- Kroot JJ, Kemna EH, Bansal SS, Busbridge M, Campostrini N, Girelli D, Hider RC, Koliaraki V, Mamalaki A, Olbina G, Tomosugi N, Tselepis C, Ward DG, Ganz T, Hendriks JC, Swinkels DW. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica*. 2009;94(12):1748-52.
- Kroot JJ, Laarakkers CM, Geurts-Moespot AJ, Grebenchtchikov N, Pickkers P, van Ede AE, Peters HP, van Dongen-Lases E, Wetzels JF, Sweep FC, Tjalsma H, Swinkels DW. Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem*. 2010;56(10):1570-9.
- Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem*. 2011;57:1650-69.
- Kroot JJ, van Herwaarden AE, Tjalsma H, Jansen RT, Hendriks JC, Swinkels DW. Second round robin for plasma hepcidin methods: first steps toward harmonization. *Am J Hematol*. 2012;87(10):977-83.
- Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, Stremmel W. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*. 2004;53(5):735-43.

- Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, Cetin Y, Stremmel W. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 2005;184:361-70.
- Laarakkers CM, Wiegerinck ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AM, Tjalsma H, Swinkels DW. Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: detection and characterization of a novel hepcidin isoform. *PLoS One*. 2013;8(10):e75518.
- Lefebvre T, Dessendier N, Houamel D, Ialy-Radio N, Kannengiesser C, Manceau H, Beaumont C, Nicolas G, Gouya L, Puy H, Karim Z. LC-MS/MS method for hepcidin-25 measurement in human and mouse serum: clinical and research implications in iron disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:1557-67.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3<sup>rd</sup>, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150:604-12.
- Li H, Rose MJ, Tran L, Zhang J, Miranda LP, James CA, Sasu BJ. Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009;59(3):171-80.
- Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(37):13612-7.
- Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*. 2016;387(10021):907-16.
- Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem*. 1998;44:45-51.
- Matthes T, Aguilar-Martinez P, Pizzi-Bosman L, Darbellay R, Rubbia-Brandt L, Giostra E, Michel M, Ganz T, Beris P. Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene. *Blood*. 2004;104(7):2181-3.
- Melino S., Garlando, L., Patamia, M., Paci, M, Petruzzelli, R. A metal-binding site is present in the amino- terminal region of the bioactive iron regulator hepcidin-25. *J. Peptide Res.*, 2006, 66 (Suppl. 1), 65–71.
- Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011;437 :41-53.
- Miller MD, Paradis CF, Houck PR, Mazumdar S, Stack JA, Rifai AH, Mulsant B, Reynolds CF 3<sup>rd</sup>. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res*. 1992;41:237-48.
- Moretti D, Goede JS, Zeder C, Jiskra M, Chatzinakou V, Tjalsma H, Melse-Boonstra A, Brittenham G, Swinkels DW, Zimmermann MB. Oral iron supplements increase hepcidin and decrease iron absorption from daily or twice-daily doses in iron-depleted young women. *Blood*. 2015;126(17):1981-9.
- Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest*. 2001;108(4):619-23.
- Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*. 2017;168(3):344-361.
- Müller KF, Lorenz L, Poets CF, Westerman M, Franz AR. Hepcidin concentrations in serum and urine correlate with iron homeostasis in preterm infants. *J Pediatr* 2012;160:949-53
- Murao N, Ishigai M, Yasuno H, Shimonaka Y, Aso Y. Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(24):4033-8.

- Murphy AT, Witcher DR, Luan P, Wroblewski VJ. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1048-54.
- Nai A, Pagani A, Silvestri L, Camaschella C. Increased susceptibility to iron deficiency of Tmprss6-haploinsufficient mice. *Blood*. 2010;116(5):851-2.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-3.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1271-6.
- Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*. 2005;105(4):1803-6.
- Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*. 2006;107(1):328-33.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8780-5.
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4596-601.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110 :1037-44.
- Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1968;4055-37.
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*. 2006;108(4):1388-94.
- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006;108(12):3730-5.
- Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012;51(29):5705-24.
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004;36(1):77-82.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;202(2):199-211.
- Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005;105(10):4103-5.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-10.
- Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooze M, Abitbol V, Leblanc S, Prat F, Chaussade S. Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis*. 2013;45(10):803-9.

Pasricha SR, Atkinson SH, Armitage AE, Khandwala S, Veenemans J, Cox SE, Eddowes LA, Hayes T, Doherty CP, Demir AY, Tijhaar E, Verhoef H, Prentice AM, Drakesmith H. Expression of the iron hormone hepcidin distinguishes different types of anemia in African children. *Sci Transl Med*. 2014;6(235):235re3.

Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E, Huang ML, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR, Vyoral D. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*. 2009;113(24):6225-36.

Peters HP, Laarakkers CM, Pickkers P, Masereeuw R, Boerman OC, Eek A, Cornelissen EA, Swinkels DW, Wetzels JF. Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25. *BMC Nephrol* 2013;14:70.

Petrosyan I, Blaison G, Andrès E, Federici L. Anaemia in the elderly: an aetiologic profile of a prospective cohort of 95 hospitalised patients. *Eur J Intern Med*. 2012;23:524-8.

Pfeiffer CM, Cook JD, Mei Z, Cogswell ME, Looker AC, Lacher DA. Evaluation of an automated soluble transferrin receptor (sTfR) assay on the Roche Hitachi analyzer and its comparison to two ELISA assays. *Clin Chim Acta*. 2007;382(1-2):112-6.

Pfeiffer CM, Looker AC. Laboratory methodologies for indicators of iron status: strengths, limitations, and analytical challenges. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(Suppl 6):1606S-1614S.

Pietrangelo A, Caleffi A, Henrion J, Ferrara F, Corradini E, Kulaksiz H, Stremmel W, Andreone P, Garuti C. Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. *Gastroenterology* 2005;128(2):470-9.

Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis : pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 2010;139:393-408.

Pietrangelo A. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica*. 2017;102(12):1972-1984.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol Chem* 2001;276 :7811-9.

Poggiali E, Andreozzi F, Nava I, Consonni D, Graziadei G, Cappellini MD. The role of TMPRSS6 polymorphisms in iron deficiency anemia partially responsive to oral iron treatment. *Am J Hematol*. 2015;90(4):306-9.

Porto G, Brissot P, Swinkels DW, Zoller H, Kamarainen O, Patton S, Alonso I, Morris M, Keeney S. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur J Hum Genet*. 2016;24(4):479-95.

Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, Sharma S, Waring A, Ganz T, Nemeth E. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4880-8.

Price EA, Mehra R, Holmes TH, Schrier SL. Anemia in older persons: etiology and evaluation. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;46:159-65.

Prowle JR, Calzavacca P, Licari E, Ligabo EV, Echeverri JE, Bagshaw SM, Haase-Fielitz A, Haase M, Ostland V, Noiri E, Westerman M, Devarajan P, Bellomo R. Combination of biomarkers for diagnosis of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Ren Fail*. 2015;37(3):408-16.

Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez MJ, Ganz T, Nemeth E. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab*. 2012;15(6):918-24.

Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006;127(5):917-28.

- Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, Minchinela J, Perich C, Simón M. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(7):491-500.
- Ridefelt P, Larsson A, Rehman JU, Axelsson J. Influences of sleep and the circadian rhythm on iron-status indices. *Clin Biochem*. 2010;43(16-17):1323-8.
- Rimon E, Levy S, Sapir A, Gelzer G, Peled R, Ergas D, Sthoeger ZM. Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly by transferrin receptor-ferritin index. *Arch Intern Med*. 2002;162:445-9.
- Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? *Pharmacol Ther*. 2015;146:35-52.
- Roe MA, Collings R, Dainty JR, Swinkels DW, Fairweather-Tait SJ. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:1088-91.
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;33(1):21-2.
- Schaap CC, Hendriks JC, Kortman GA, Klaver SM, Kroot JJ, Laarakkers CM, Weigerinck ET, Tjalsma H, Janssen MC, Swinkels DW. Diurnal rhythm rather than dietary iron mediates daily hepcidin variations. *Clin Chem* 2013;59 :527-35.
- Sham RL, Phatak PD, Nemeth E, Ganz T. Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood*. 2009;114(2):493-4.
- Shawki A, Knight PB, Maliken BD, Niespodzany EJ, Mackenzie B. H(+)-coupled divalent metal-ion transporter-1: functional properties, physiological roles and therapeutics. *Curr Top Membr*. 2012;70:169-214.
- Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1347-59.
- Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008;8(6):502-11.
- Silvestri L, Nai A, Dulja A, Pagani A. Hepcidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitam Horm*. 2019;110:71-99.
- Stauder R, Valent P, Theurl I. Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management. *Blood*. 2018;131(5):505-514.
- Suominen P, Punnonen K, Rajamäki A, Irjala K. Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem*. 1997;43(9):1641-6.
- Swinkels D, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem*. 2006;52(6):950-68.
- Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Camprotrini N, Kemna EH, Tjalsma H. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. Pathways for the regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *PLoS One*. 2008;3(7):e2706.
- Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, Sonnweber T, Eberwein L, Witcher DR, Murphy AT, Wroblewski VJ, Wurz E, Datz C, Weiss G. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 2009;113:5277-86.



Theurl I, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Theurl M, Sonnweber T, Kulaksiz H, Weiss G. Pathways for the regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *Haematologica*. 2011;96(12):1761-9.

Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int J Lab Hematol*. 2011;33:187-93.

Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood*. 2006;108(4):1381-7.

Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002;99(10):3505-16.

Troutt JS, Rudling M, Persson L, Ståhle L, Angelin B, Butterfield AM, Schade AE, Cao G, Konrad RJ. Circulating human hepcidin-25 concentrations display a diurnal rhythm, increase with prolonged fasting, and are reduced by growth hormone administration. *Clin Chem* 2012;58:1225-32.

Troutt JS, Butterfield AM, Konrad RJ. Hepcidin-25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(6):504-10.

Vallet N; Club du Globule Rouge et du Fer. [The role of erythroferrone in iron metabolism: From experimental results to pathogenesis]. *Rev Med Interne*. 2018;39(3):178-184.

Vanasse GJ, Berliner N. Anemia in elderly patients: an emerging problem for the 21st century. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:271-5.

van der Vorm LN, Hendriks JC, Laarakkers CM, Klaver S, Armitage AE, Bamberg A, Geurts-Moespot AJ, Girelli D, Herkert M, Itkonen O, Konrad RJ, Tomosugi N, Westerman M, Bansal SS, Campostrini N, Drakesmith H, Fillet M, Olbina G, Pasricha SR, Pitts KR, Sloan JH, Tagliaro F, Weykamp CW, Swinkels DW. Toward Worldwide Hepcidin Assay Harmonization: Identification of a Commutable Secondary Reference Material. *Clin Chem*. 2016;62:993-1001.

van Santen S, van Dongen-Lases EC, de Vegt F, Laarakkers CM, van Riel PL, van Ede AE, Swinkels DW. Hepcidin and hemoglobin content parameters in the diagnosis of iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. *Arthritis Rheum*. 2011;63:3672-80.

Vialaret J, Picas A, Delaby C, Bros P, Lehmann S, Hirtz C. Nano-flow vs standard-flow: Which is the more suitable LC/MS method for quantifying hepcidin-25 in human serum in routine clinical settings? *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018;1086:110-117.

Virtanen M, Siimes MA, Krusius T, Pettersson T, Teppo AM, Viinikka L. Evaluation of an ELISA test for determination of the serum transferrin receptor. Demonstration of discordance between results obtained with two methods. *Scand J Clin Lab Invest*. 1998;58(7):561-7.

Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 2007;24:1962-73.

Wang CY, Babitt JL. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):189-97.

Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005;2(6):399-409.

Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(8):760-9.

Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 2002;100(10):3776-81.

- Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-23.
- Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood*. 2019;133(1):40-50.
- Wolff F, Deleers M, Melot C, Gulbis B, Cotton F. Hepcidin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Clin Chim Acta*. 2013;423:99-104.
- Wolff F, Gentelet M, Gulbis B, Cotton F. Hepcidin on 24-hour urine collection: preanalytical aspects and correlation with ferritin levels. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016 Oct;76(6):454-9.
- Wolff F, De Breucker S, Pepersack T, Compté N, Mélot C, Gulbis B, Cotton F. Baseline hepcidin measurement in the differential diagnosis of anaemia for elderly patients and its correlation with the increment of transferrin saturation following an oral iron absorption test. *Clin Chem Lab Med*. 2018;57(2):250-258.
- Wyman S, Simpson RJ, McKie AT, Sharp PA. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1901-6.
- Young MF, Glahn RP, Ariza-Nieto M, Inglis J, Olbina G, Westerman M et al. Serum hepcidin is significantly associated with iron absorption from food and supplemental sources in healthy young women. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:533-8.
- Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4(1):33-41.
- Zimmermann MB, Troesch B, Biebinger R, Egli I, Zeder C, Hurrell RF. Plasma hepcidin is a modest predictor of dietary iron bioavailability in humans, whereas oral iron loading, measured by stable-isotope appearance curves, increases plasma hepcidin. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:1280-7.