

# Hepcidine

## aspects analytiques et intérêts cliniques

F. Wolff

Chimie Médicale, Hôpital Erasme - ULB

Corata . Nancy, 25/09/2013



- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Heparidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Heparidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

**LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity<sup>1</sup>**

Alexander Krause, Susanne Neitz<sup>2</sup>, Hans-Jürgen Mägert, Axel Schulz, Wolf-Georg Forssmann, Peter Schulz-Knappe<sup>2</sup>, Knut Adermann\*

Krause A, FEBS Letters 2000

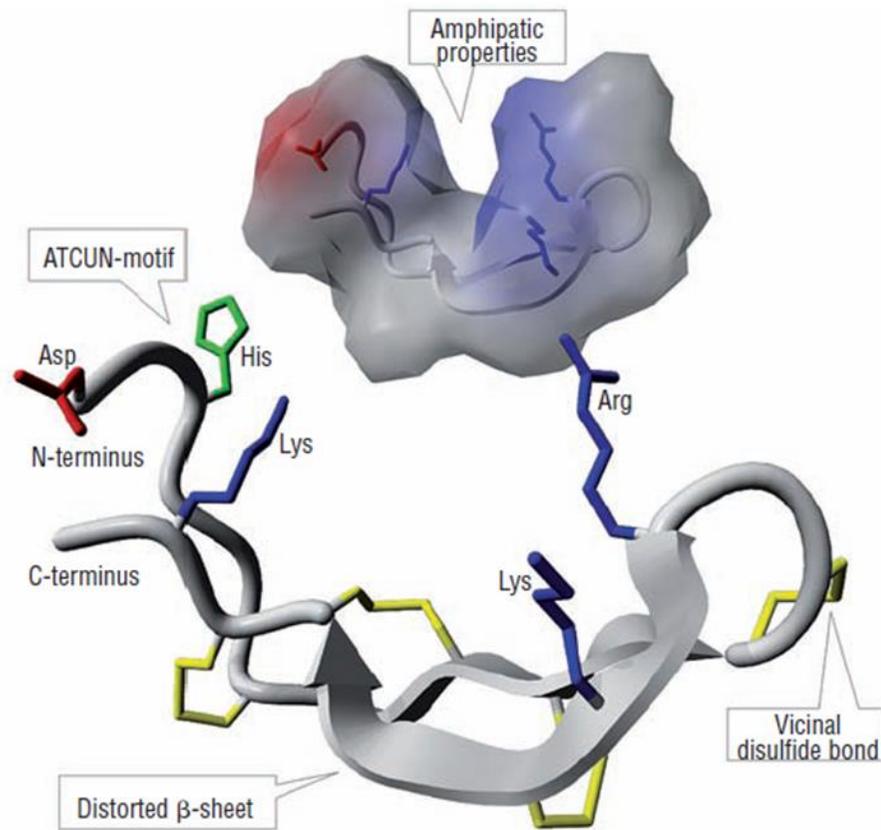
**Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver\***

Received for publication, September 29, 2000, and in revised form, November 9, 2000  
Published, JBC Papers in Press, December 11, 2000, DOI 10.1074/jbc.M008922200

Christina H. Park‡, Erika V. Valore‡, Alan J. Waring§, and Tomas Ganz‡¶

Park CH, J Biol Chem 2001

# 1. Structure



- 25 acides aminés
- 2789 Da
- 4 ponts disulfures

- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Heparidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Heparidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

## 2. Rôle de l'hépcidine

**Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (*USF2*) knockout mice**

Gaël Nicolas\*, Myriam Bennoun\*, Isabelle Devaux†, Carole Beaumont†, Bernard Grandchamp†, Axel Kahn\*, and Sophie Vaulont\*\*†

Nicolas G, Proc Natl Acad Sci USA 2001

## 2. Rôle de Hépécidine

### Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin

Gaël Nicolas\*, Myriam Bennoun\*, Arlette Porteu\*, Sandrine Mativet\*, Carole Beaumont†, Bernard Grandchamp†, Mario Sirtio‡, Michèle Sawadogo‡, Axel Kahn\*, and Sophie Vaulont\*§

Nicolas G, Proc Natl Acad Sci USA 2002

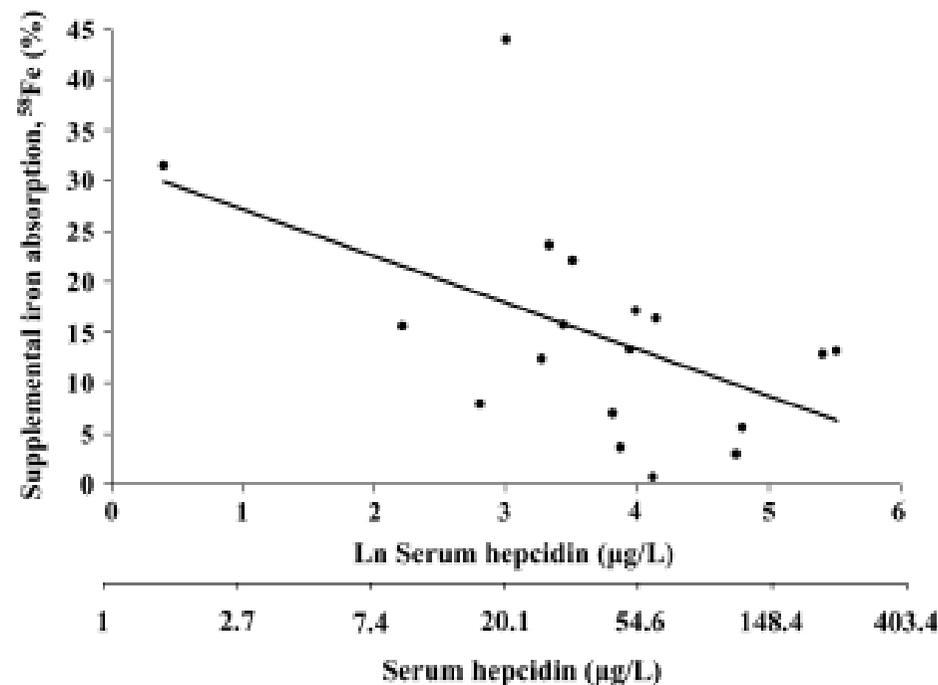


## 2. Rôle de Hhepcidine

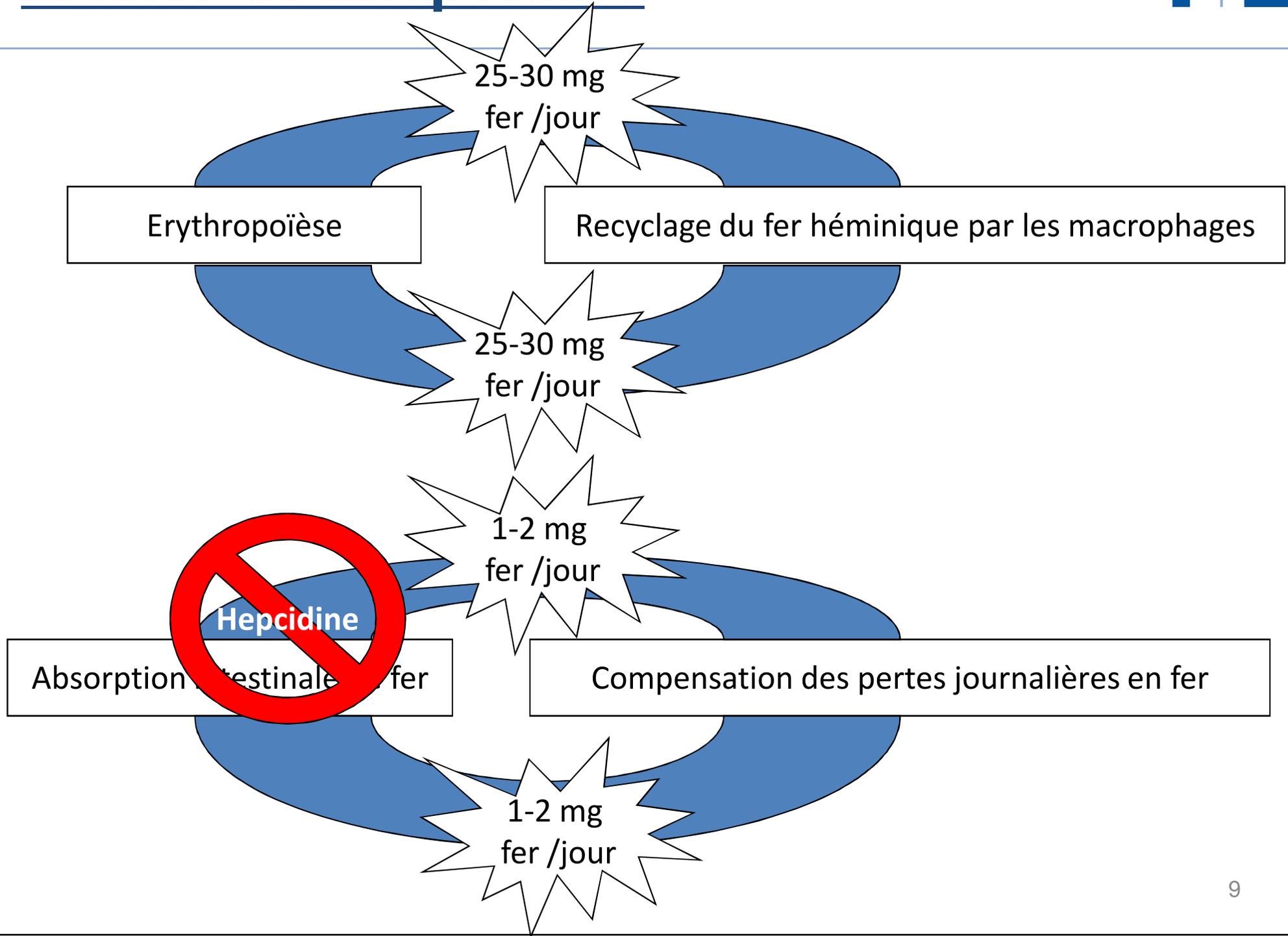
Serum hepcidin is significantly associated with iron absorption from food and supplemental sources in healthy young women<sup>1-3</sup>

*Melissa F Young, Raymond P Glahn, Magnolia Ariza-Nieto, Jeremy Inglis, Gordana Olbina, Mark Westerman, and Kimberly O O'Brien*

Young MF, Am J Clin Nutr 2009

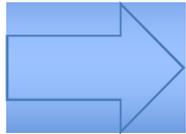


## 2. Rôle de l'hepcidine



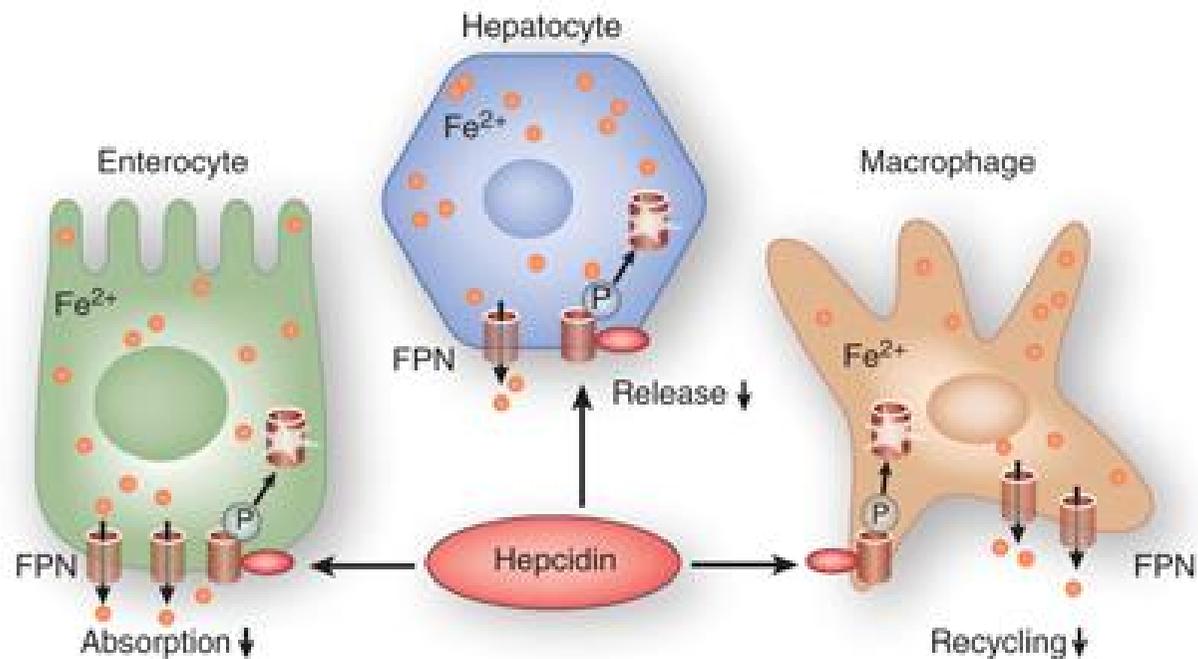
## 2. Rôle de l'hepcidine

- Liaison à la ferroportine, formation d'un complexe internalisé et dégradé



Réduction de l'absorption duodénale de fer, diminution de l'export de fer des hépatocytes et macrophages

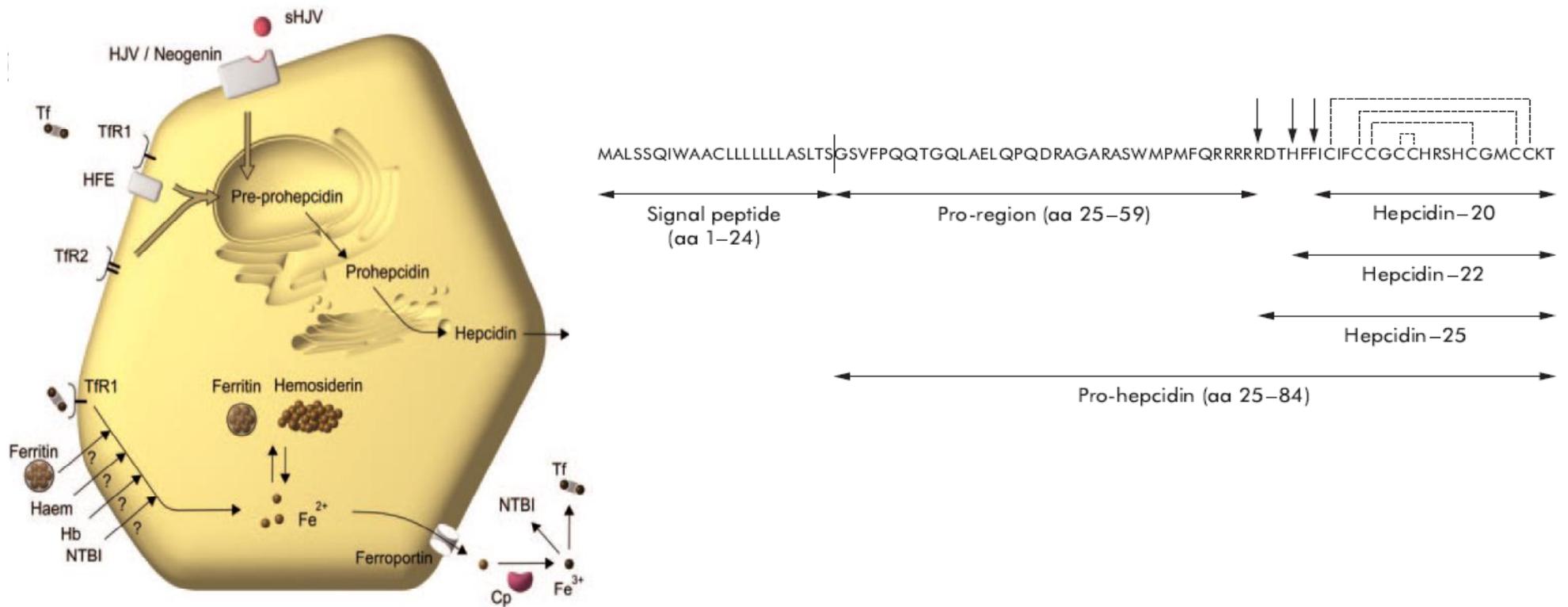
## 2. Rôle de ~~H~~epcidine



- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthode de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Hpcidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Hpcidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

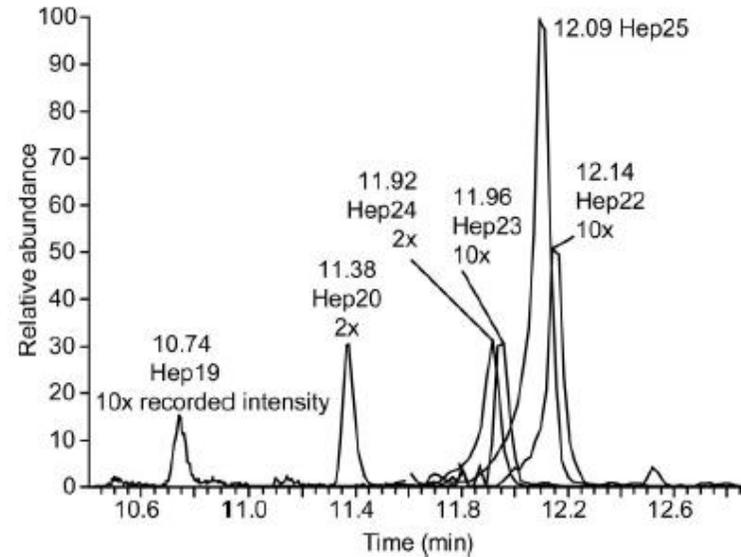
# 3. Synthèse

- Gène HAMP situé sur le chromosome 19q13.1 → pré-prohepcidine (84 aa)
- Production de la prohepcidine (60 aa)
- Libération de l'hepcidine mature et biologiquement active (25 aa)



# 3. Synthèse

- Isoformes 20 et 22 non impliqués dans le métabolisme ferrique
- Découverte récente des isoformes 19, 23 et 24 dont le rôle n'est pas encore établi (Moe MK, Clin Chem 2013)

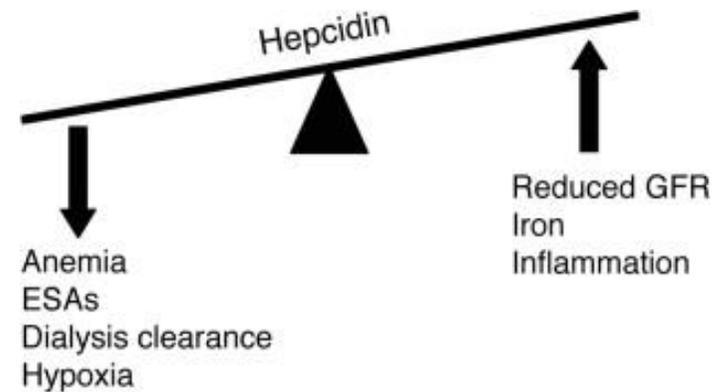


# 3. Synthèse

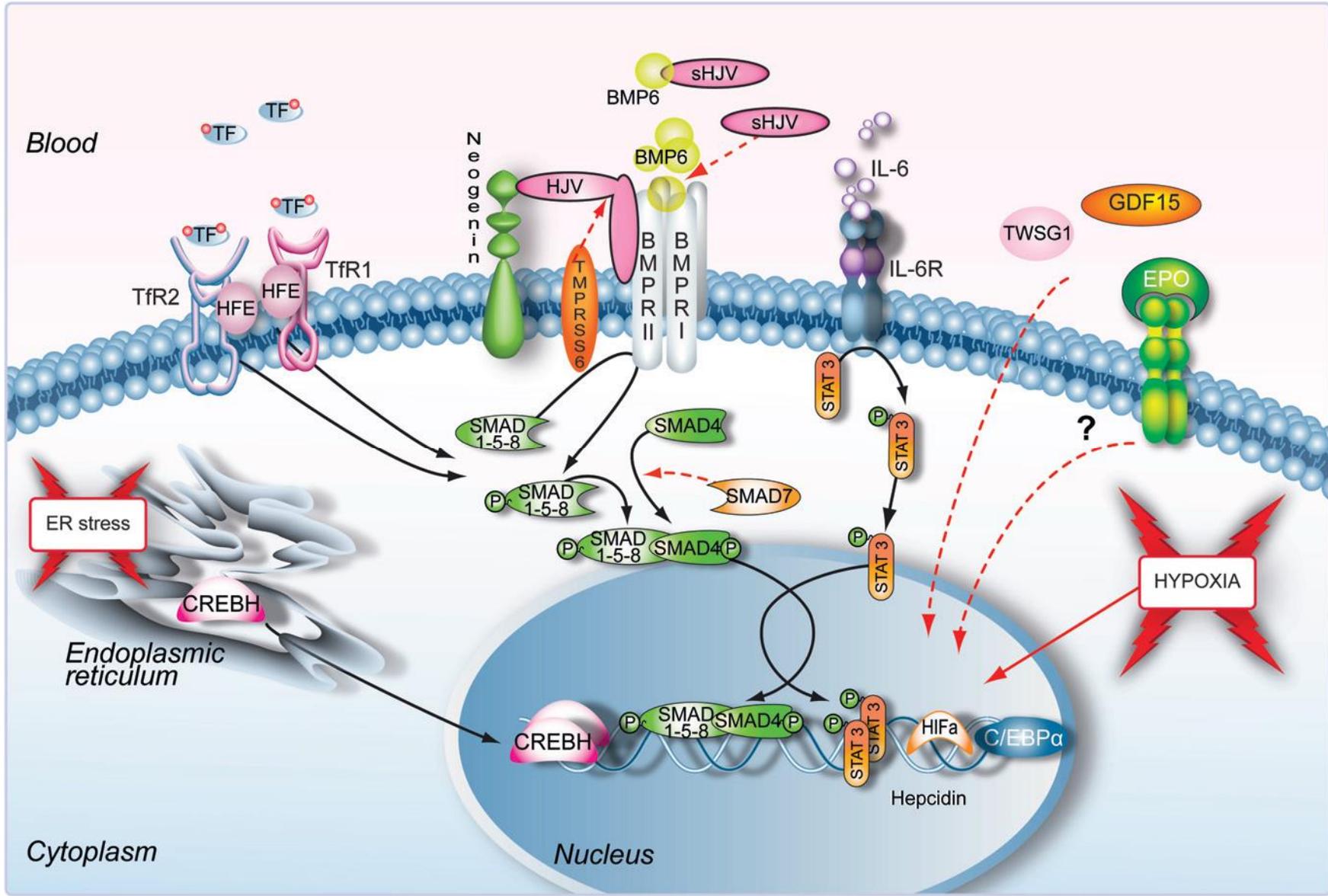
- Synthèse prédominante par les hépatocytes
- Autres cellules (tubules rénaux, cœur, rétine, monocytes, neutrophiles, adipocytes)

# 3. Régulation

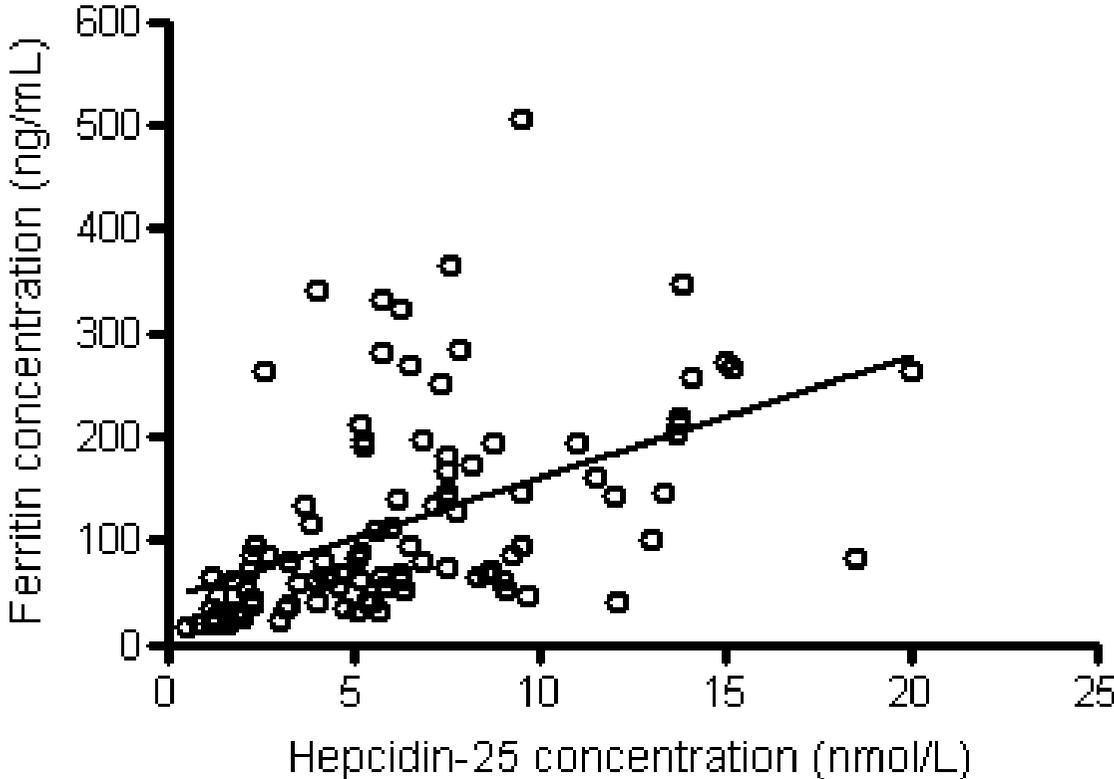
- Réserves en fer (réserves en fer IC et taux de fer circulant)
  - Surcharge en fer ↑
  - Carence en fer ↓
- Activité érythropoïétique/hypoxie ↓
- Inflammation ↑



# 3. Régulation



# 3. Régulation





- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Heparidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Heparidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

# 4.1. Liaison

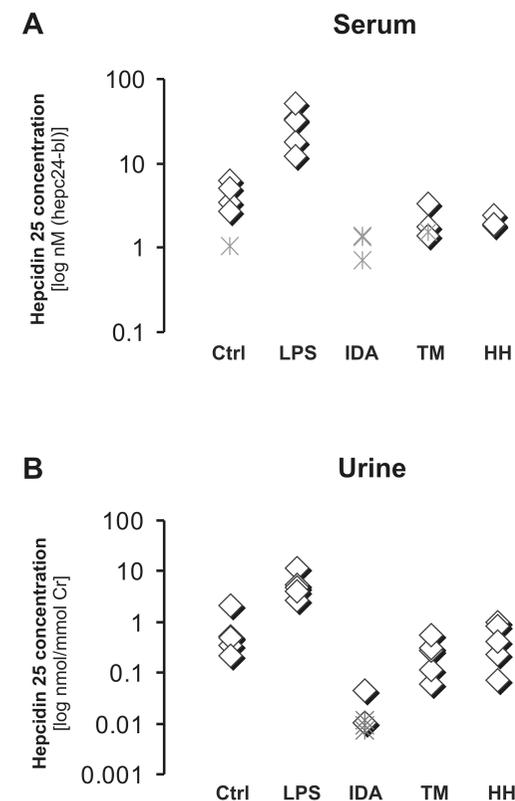
- Hépcidine circule principalement sous forme libre avec moins de 3% liés à  $\alpha$ 2-macroglobuline et à l'albumine

**Table 1.** Peak areas of the main peaks ( $t_{ret}$  4.8 min) and late-eluting peaks ( $t_{ret}$  5.1 min) for hepcidin and the internal standard (ISTD) in the LC-MS/MS chromatograms of patient samples containing 36.6 nmol/L and 50.4 nmol/L endogenous hepcidin, and of gel-filtration chromatography fractions of the same samples.

	$t_{ret}$ 4.8 min, cps		$t_{ret}$ 5.1 min, cps	
	Hepcidin	ISTD	Hepcidin	ISTD
Serum sample (36.6 nmol/L)	135 000	121 000	323	3250
$\alpha$ 2M fraction	296	139 000	—	—
Albumin fraction	380	124 000	744	9660
Hepcidin fraction	43 900	117 000	—	—
Serum sample (50.4 nmol/L)	140 000	143 000	494	4260
$\alpha$ 2M fraction	241	78 300	—	—
Albumin fraction	345	179 000	803	6130
Hepcidin fraction	27 000	106 000	—	—

# 4.2. Comportement rénal

- Filtration libre à travers le glomérule
- Réabsorption tubulaire
- Fraction d'excrétion rénale
  - 0-5% (Swinkels D, PLoS ONE 2008, Ganz T, Blood 2008)
  - 0.1-16.4% (Wolff F, Clin Chim Acta 2013)



- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Heparidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Heparidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

# 5. Méthodes de dosage

- Risque de agrégation et de adhésion sur différentes surfaces
- Production d'anticorps difficile
- Interférence des isoformes 20 et 22 pour les tests immunologiques

# 5.1. Première génération



- prohepcidine sérique par un test immunologique (Kulaksiz H, gut 2004)
- hepcidine-25 urinaire par immunodot (Nemeth E, J Clin Invest 2004)
- hepcidine-25 sérique ou urinaire par SELDI-TOF MS (Kemna EH, Clin Chem 2007)

## 5.2. Seconde génération

- SELDI-TOF MS et MALDI-TOF MS
- LC-MS/MS ou UPLC-MS/MS
- Tests immunologiques: cRIA, cELISA, ELISA sandwich

# 5.3. Comparaison technique

## Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization

Joyce J.C. Kroot,<sup>1</sup> Erwin H.J.M. Kemna,<sup>1</sup> Sukhvinder S. Bansal,<sup>2</sup> Mark Busbridge,<sup>3</sup> Natascia Campostrini,<sup>4</sup> Domenico Girelli,<sup>4</sup> Robert C. Hider,<sup>2</sup> Vasiliki Koliaraki,<sup>5</sup> Avgi Mamalaki,<sup>5</sup> Gordana Olbina,<sup>6</sup> Naohisa Tomosugi,<sup>7</sup> Chris Tselepis,<sup>8</sup> Douglas G. Ward,<sup>8</sup> Tomas Ganz,<sup>6,9</sup> Jan C.M. Hendriks,<sup>10</sup> and Dorine W. Swinkels<sup>1</sup>

**Table 1.** Characteristics of methods used for plasma and urine hepcidin measurements.

Method	Principle	Method	Hepcidin extraction	Standard	Urine	Plasma	
I	Mass spectrometry	SELDI-TOF MS	Normal phase	None	X	X	
II	Mass spectrometry	SELDI-TOF MS	Weak cation exchange	Internal	Synthetic hepcidin-24	X	X
III	Mass spectrometry	MALDI-TOF MS	Reversed phase	External	Synthetic hepcidin-25	X	
		SELDI-TOF MS	Immobilized metal affinity Chromatography	External	Synthetic hepcidin-25		X
IV	Mass spectrometry	LC-MS/MS	Weak cation exchange	Internal	[ <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Gly-12,20-hepcidin	X	X
V	Immunochemical	Competitive ELISA	None	External	Synthetic hepcidin-25	X	X
VI	Immunochemical	Competitive RIA	None	External	Synthetic hepcidin-25	X	X
VII	Mass spectrometry	LC-MS/MS	None	Internal	Synthetic hepcidin-25		X
VIII	Immunochemical	Competitive ELISA	None	External	Recombinant hepcidin-25-His		X

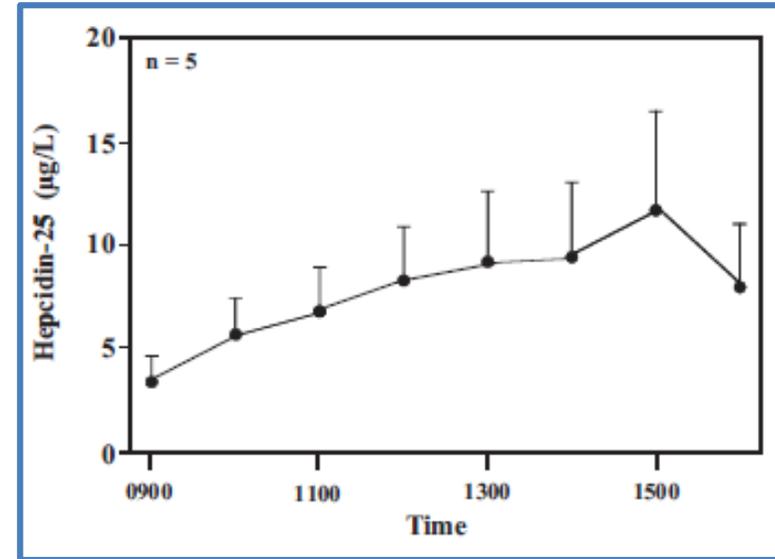
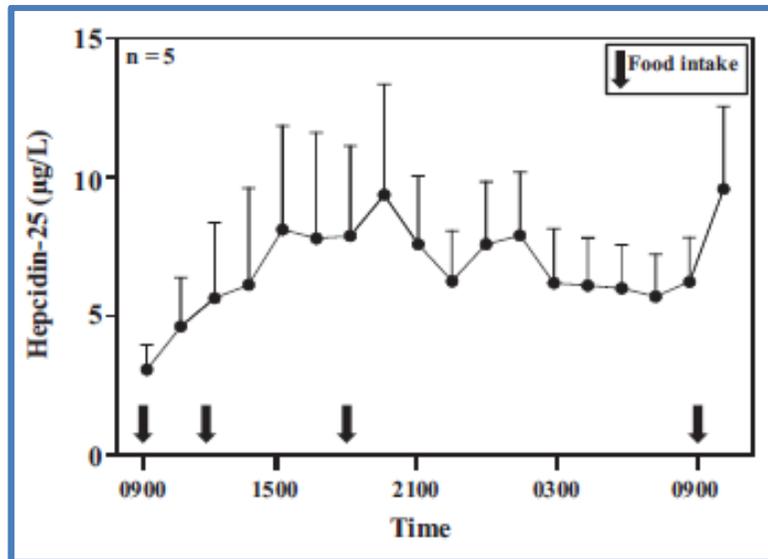
## 5.3. Comparaison technique

- Variation analytique similaire
- Différences importantes au niveau des valeurs de pipéridine obtenues
- Absence de standard

- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- **6. Aspects pré-analytiques**
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Hepcidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Hepcidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

# 6. Aspects pré-analytiques

- Variation circadienne



non influencée par la prise de nourriture



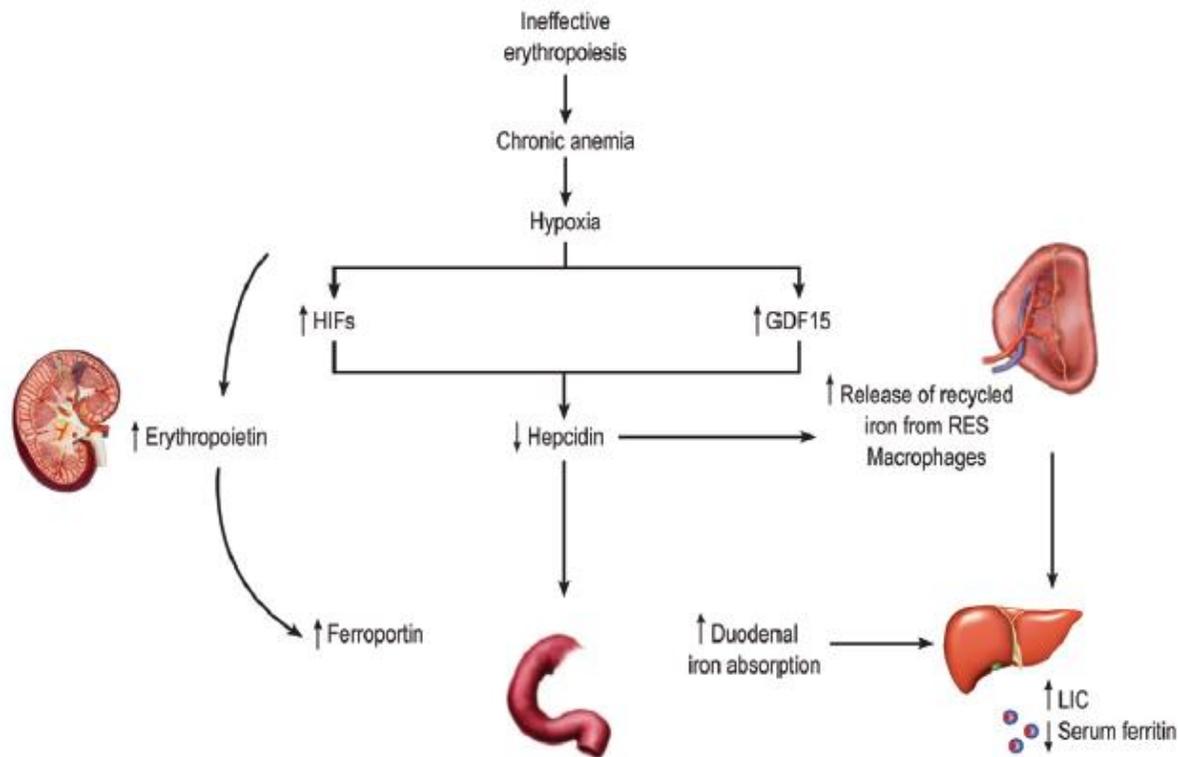
nécessité de standardiser les heures de prélèvements

- Stabilité

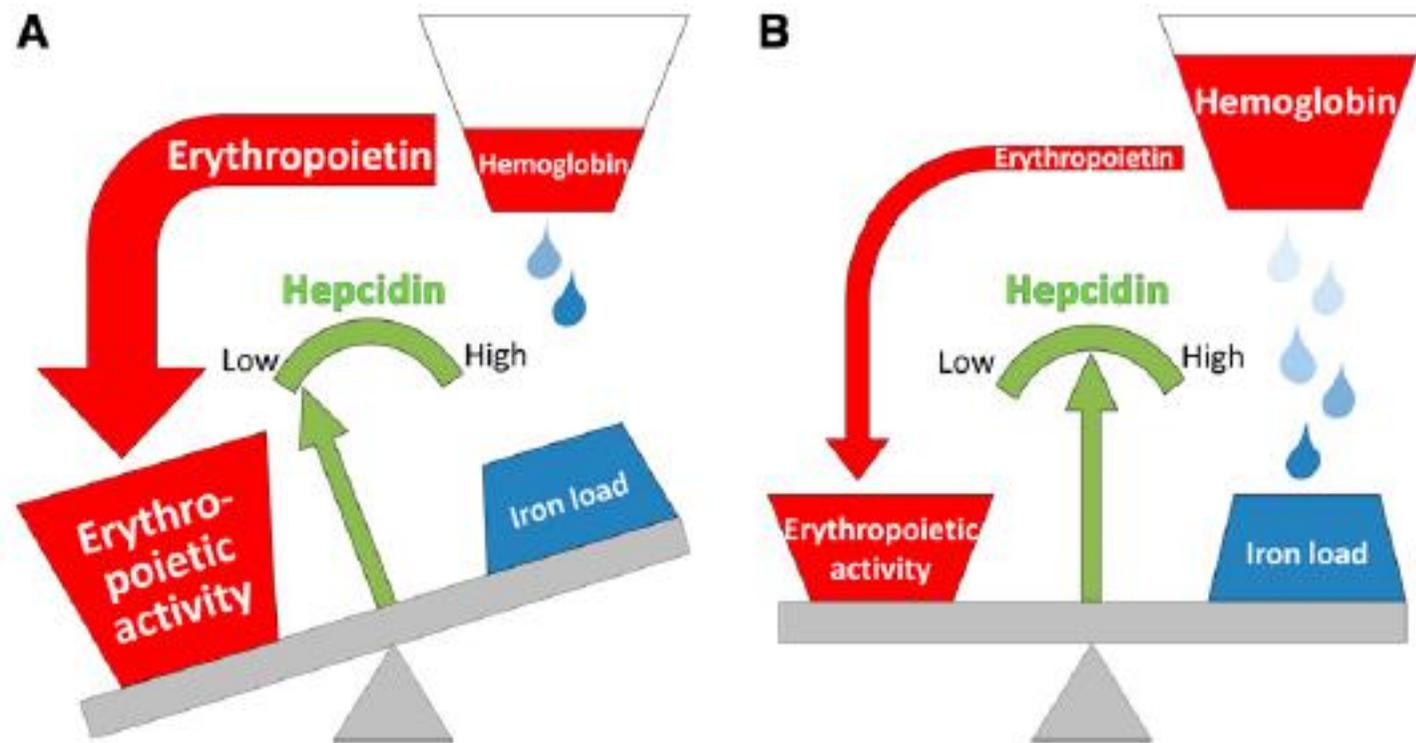
- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Heparidine et  $\beta$ -thalassémie
  - 7.2. Heparidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

# 7.1. Hepcidine et $\beta$ -thalassémie

- La surcharge en fer observée chez ces patients est une cause majeure de morbidité et mortalité
- Mise en évidence de taux urinaires d'hepcidine anormalement bas pour le degré de surcharge en fer chez des patients avec  $\beta$ -thalassémie majeure ou intermédiaire



# 7.1. Heparidine et $\beta$ -thalassémie



Mesure de l'hepcidine pour la prise en charge des patients avec  $\beta$ -thalassémie

- 1. Découverte, structure
- 2. Rôle de l'hepcidine
- 3. Synthèse et voie de régulation
- 4. Liaison protéique et comportement rénal
- 5. Méthodes de dosage
- 6. Aspects pré-analytiques
- 7. Intérêt clinique
  - 7.1. Hepcidine et  $\alpha$ -thalassémie
  - 7.2. Hepcidine et hémochromatose
- 8. Conclusions

## 7.2. Hémochromatose

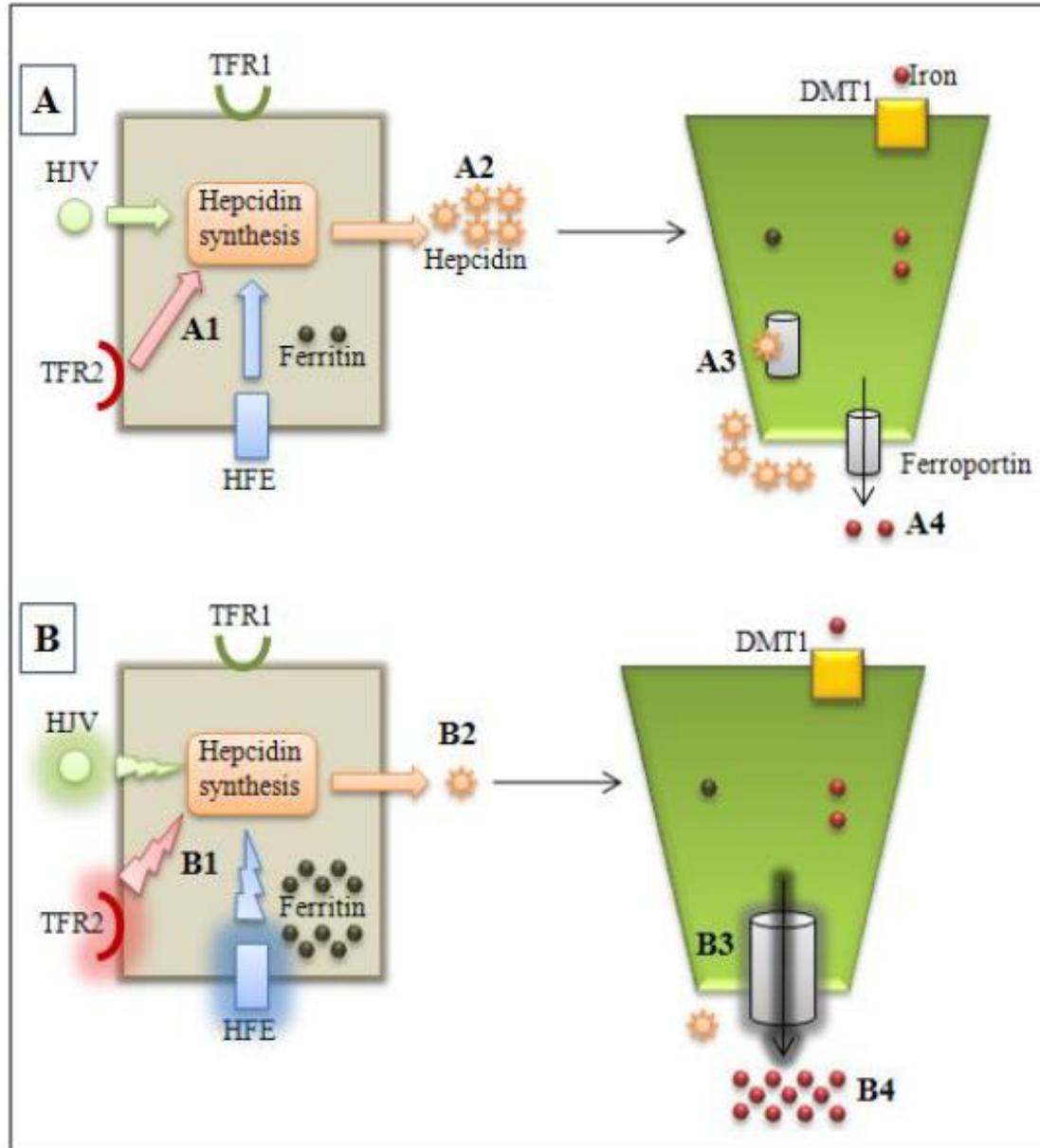


- Désordre génétique caractérisé par une surcharge en fer suite à une incapacité à réguler correctement la synthèse de hepcidine en réponse à la surcharge martiale
- Complications: cirrhose hépatique, cardiomyopathie, diabète, arthrite, hypogonadisme

## 7.2.2. Types de Hémochromatose

HH types	Phenotype MIM number	Gene MIM number	Location	Inheritance	Gene product function	Main clinical manifestations
1	235200	<i>HFE</i> , 613609	6p21.3	AR	Involved in hepcidin synthesis via BMP6, interaction with TFR1.	Arthropathy, skin pigmentation, liver damage, diabetes, endocrine dysfunction, cardiomyopathy, hypogonadism.
2A	602390	<i>HJV</i> , 608374	1p21	AR	Involved in hepcidin synthesis, BMP co-receptor.	Types 2: earlier onset, <30 years old. Hypogonadism and cardiomyopathy more prevalent.
2B	613313	<i>HAMP</i> , 606464	19q13	AR	Downregulation of iron efflux from enterocytes.	
3	604250	<i>TFR2</i> , 604720	7q22	AR	Involved in hepcidin synthesis, interaction with transferrin.	As for type 1.
4	606069	<i>SLC40A1</i> , 604653	2q32	AD	Duodenal iron export.	Lower tolerance to phlebotomies and may have anemia.

# 7.2.2. Types 1, 2 et 3



## 7.2.3. Type 4

- Il existe 2 classes de mutation de la ferroportine qui diffèrent par leurs conséquences phénotypiques
  - *Phénotype classique*: perte ou réduction de la fonction d'export de la ferroportine avec séquestration du fer macrophagique
  - *Phénotype non classique*: gain de fonction de la ferroportine devenant résistante à l'action de l'hepcidine avec augmentation de l'absorption du fer duodénal

## 7.2.4. Hepcidine sérique

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

## 7.2.5. Cas clinique

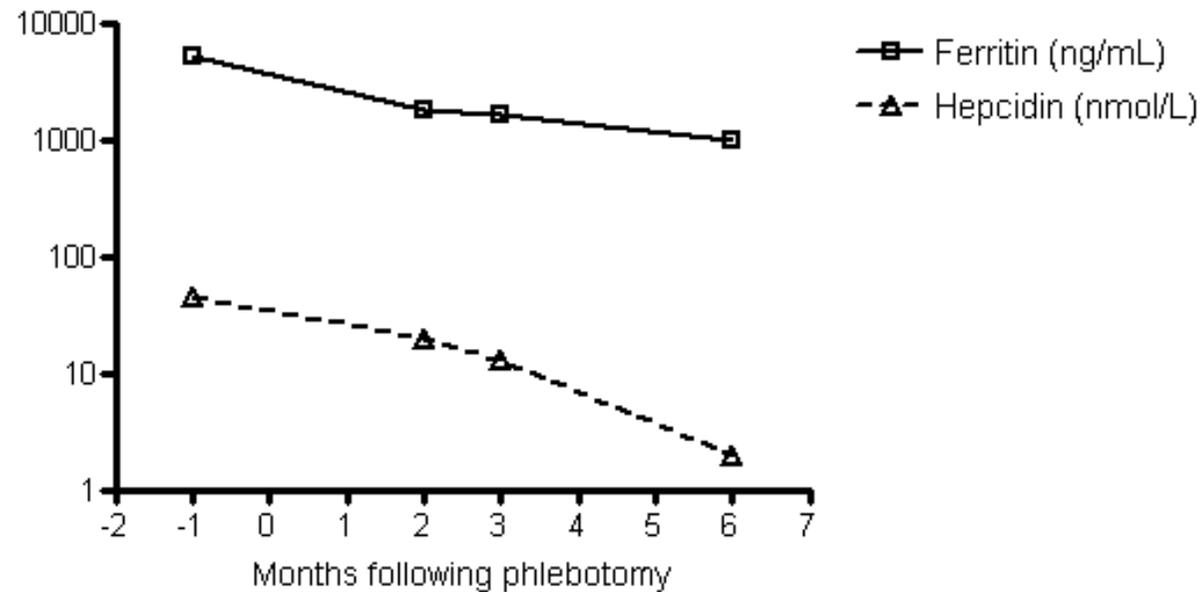
- Homme de 36 ans avec histoire familiale de surcharge en fer chez la mère, les oncles et tantes
- Ferritine: 5183 ng/mL (30-350)  
Saturation de la transferrine: 20% (15-55%)
- Absence de mutation du gène HFE
  
- Hepcidine : 44 nmol/L (1.5-15.2)



Résultats biochimiques et transmission en faveur d'une hémochromatose de type 4

## 7.2.5. Cas clinique

- Evaluation des concentrations en hepcidine lors des saignées thérapeutiques



## 7.2.6. Hepcidine & hémochromatose



- Orientation sur les analyses moléculaires à réaliser
- Suivi en cours de saignées thérapeutiques

# 8. Conclusions

- Peptide découvert en 2000
- Eclaircissement de nombreux mécanismes impliqués dans le métabolisme ferrique
- Compréhension de la physiopathologie de différents types d'anémie (anémie avec surcharge en fer, anémie observée dans les maladies inflammatoires chroniques, anémie associée aux processus néoplasiques)
- Perspectives larges

Merci de votre attention