

L'hepcidine pourquoi fer ?

Sophie VAULONT, Axel KAHN

Institut Cochin, 24 rue du Fg St Jacques, 75014 Paris

E-mail : vaulont@cochin.inserm.fr

L'hepcidine est un petit peptide hormonal produit par le foie, distribué dans le plasma et excrété dans les urines. Ce peptide constitue le régulateur central de l'équilibre du fer dans l'organisme. Il agit en contrôlant l'absorption intestinale de fer et sa réutilisation par le système réticulo-endothélial. Le mode d'action du peptide vient tout juste, quatre ans après sa découverte, d'être décrypté. L'hepcidine agit en empêchant l'export du fer des entérocytes et des macrophages. Elle se fixe en effet sur l'exporteur du fer présent à la membrane de ces cellules, la ferroportine, et provoque sa dégradation.

Comme attendue d'une hormone dont le rôle est de limiter la quantité de fer dans l'organisme, la production d'hepcidine est augmentée par le fer et diminuée par l'anémie et l'hypoxie. L'hepcidine est également très fortement induite dans les situations d'infections et d'inflammation, provoquant la séquestration du fer dans l'entérocyte et le macrophage. La diminution des niveaux de fer plasmatique qui en résulte contribue à l'anémie associée à l'infection et l'inflammation. A l'opposé, les déficits en hepcidine, qu'ils soient primitifs ou secondaires, permettent aujourd'hui d'expliquer la majorité des formes de surcharges héréditaires en fer.

I. L'HEPCIDINE : LA FULGURANTE ASCENSION D'UN PEPTIDE ANTIMICROBIEN DANS LE MONDE TRÈS FERMÉ DU FER

L'hepcidine a été isolée en 2001 par deux équipes à la recherche de nouveaux peptides antimicrobiens à visées thérapeutiques [1,2]. Isolée et purifiée à partir du sang et de l'urine de volontaires sains, son activité antimicrobienne a été démontrée *in vitro* par les deux équipes mais les travaux dans ce sens n'ont guère été poursuivis. En effet, il semble que l'hepcidine, en comparaison des autres peptides antimicrobiens de la famille des défensines, soit beaucoup moins cationique, soit efficace à des concentrations beaucoup plus élevées et nécessite des temps d'action beaucoup plus longs pour être active. De plus, l'activité du peptide semble être inhibée par une concentration de 0,1 M de NaCl, ce qui n'est pas en faveur d'une quelconque activité antimicrobienne *in vivo* du peptide circulant. Contrairement aux vertébrés inférieurs, où l'activité de l'hepcidine dans la réponse immunitaire innée semble jouer un rôle très important, ce rôle ne semble plus être d'actualité chez les vertébrés supérieurs qui réutiliseraient plutôt ce peptide ancestral pour régler l'homéostasie du fer. On sait aujourd'hui que l'hepcidine réduit la quantité de fer circulant en empêchant la sortie du métal, d'une part de l'entérocyte, site de l'absorption intestinale du fer alimentaire et, d'autre part, du macrophage, site de recyclage du fer incor-

poré dans l'hémoglobine. Pour cela, l'hepcidine se lie directement à l'exporteur du fer, la ferroportine, présent spécifiquement à la membrane de ces cellules, et induit son internalisation puis sa dégradation [3,4]. Si l'hepcidine n'a pas de réelle activité antimicrobienne par destruction directe des microbes, notons cependant que, de part son activité hyposidérémiant, l'hormone pourrait quand même participer aux mécanismes de défenses innés chez les mammifères en limitant la quantité de fer nécessaire aux organismes pathogènes pour leur prolifération.

Le rôle hormonal du peptide a été initialement révélé grâce à l'étude de deux modèles murins. Des souris déficientes en hepcidine présentent une accumulation considérable de fer dans tous les organes, en particulier dans le foie, le pancréas et le cœur, alors que les macrophages apparaissent dépourvus de fer [5]. Ce phénotype s'explique facilement : du fait de l'absence de sa régulation par rétrocontrôle négatif via l'hepcidine, la ferroportine est présente de façon constitutive au niveau de l'entérocyte, expliquant l'hyperabsorption de fer. L'accumulation de la ferroportine au niveau du macrophage provoque, quant à elle, un relargage non contrôlé du fer de ces cellules.

Le deuxième modèle est celui de souris transgéniques qui expriment de façon constitutive l'hepcidine [6]. Ces animaux présentent une carence sévère en fer et développent à la naissance une anémie hypochrome et microcytaire profonde. Pour s'affranchir de l'anémie périnatale, qui entraîne dans la majorité des cas une létalité précoce des souris transgéniques, un modèle de souris transgénique inducible «*tet-on*» a été créé au laboratoire. Dans ce modèle, nous montrons que l'inducteur de l'expression du gène hepcidine est capable en quelques heures d'induire un déficit en fer sérique chez l'animal transgénique (Viatte et al., manuscrit en préparation). L'activité fonctionnelle de l'hepcidine a été confirmée par le laboratoire de Tomas Ganz par injection directe d'une forme synthétique d'hepcidine de 25 aa qui, en quelques heures seulement, entraîne une hyposidémie, preuve de son activité biologique.

II. L'HEPCIDINE : UN PETIT GÈNE MAIS UNE RÉGULATION COMPLEXE

La synthèse de l'hepcidine a lieu majoritairement dans le foie (ce qui lui vaut d'ailleurs le préfixe de son nom, «hep» pour hépatocyte et «idine» pour son activité antimicrobienne) [1,2,7]. Le gène de l'hepcidine est de petite taille; il comporte 3 exons qui codent un pré-pro-peptide de 84 aa (figure 1).

Ce dernier inclut en N-ter un peptide signal, une prorégion, et en C-ter le peptide mature de 25 aa tel qu'on le retrouve dans le sang et dans l'urine [8]. A ce jour, ni les données sur les protéines responsables de la maturation du peptide, ni celles sur la régulation de sa sécrétion ne sont disponibles. La pratique la plus fréquente pour quantifier l'hepcidine dans des modèles animaux est le dosage des ARNm provenant de biopsies hépatiques. Pour doser l'hepcidine chez l'homme, l'équipe de Tomas Ganz a développé des anticorps (AC)

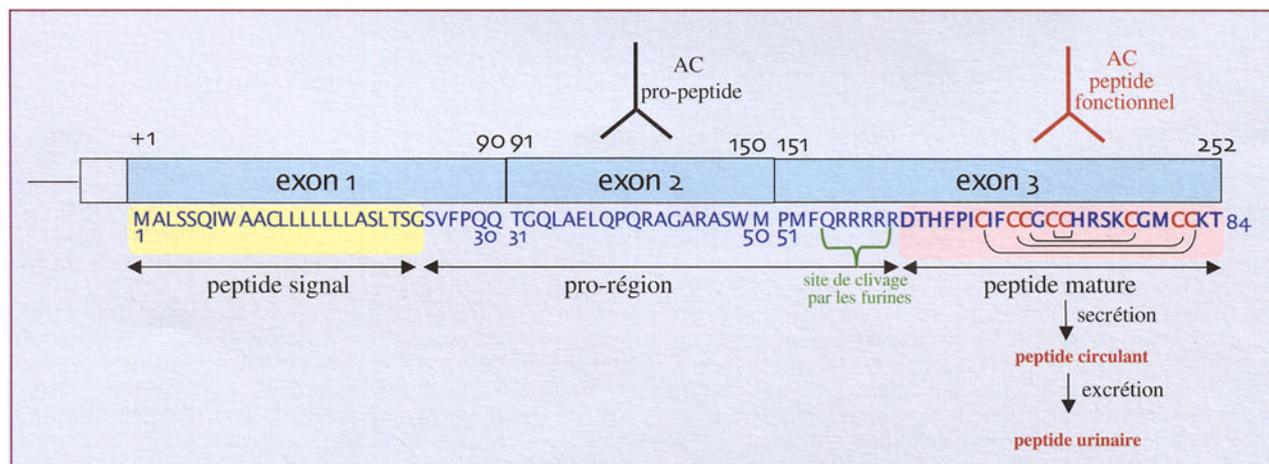


Figure 1 : Structure génétique et séquence en acides aminés du précurseur de l'hepcidine humaine. La connectivité des ponts disulfures au sein du peptide mature est représentée.

qui permettent d'évaluer le peptide urinaire [9]. Notons qu'à ce jour cette équipe est la seule à disposer d'AC contre le peptide fonctionnel. De plus, l'AC utilisé ne dose que l'hepcidine urinaire et non l'hepcidine sérique, pour des raisons qui ne sont pas encore très claires. La difficulté d'obtention d'AC contre l'hepcidine réside dans la complexité de la structure tridimensionnelle du peptide. En effet, comme tout peptide antimicrobien, l'hepcidine est riche en cystéines (8 résidus sur 25), qui sont engagées dans 4 ponts disulfures (figure 1). Une étude récente chez l'homme a démontré qu'il existe une relation directe entre la synthèse d'ARNm hepcidine hépatique (qui reste donc la technique de choix pour bon nombre de modèles et différentes espèces) et l'hepcidine urinaire dosée par une technique ELISA utilisant les AC de Tomas Ganz [10]. Si les AC contre le peptide de 25 aa ne sont pas disponibles dans le commerce, on pourra cependant trouver sur le marché des trousse ELISA pour le dosage de la prohepcidine (figure 1). La signification physiologique de ce dosage, et donc son intérêt, sont cependant incertains.

L'hepcidine, comme ses propriétés et sa fonction permettent de s'y attendre, est contrôlée par le fer et par l'inflammation [11]. La surcharge en fer, induite expérimentalement par un régime riche en cet élément, entraîne une augmentation de la synthèse d'hepcidine chez l'animal comme chez l'homme [7, 12]. Cette réponse de l'hepcidine au fer est physiologique. Elle permet de contrecarrer l'excès de fer qui peut provoquer, lorsqu'il s'accumule, des lésions tissulaires irréversibles, sans doute secondaires à la production de radicaux libres. À l'inverse, un régime pauvre en fer entraîne une diminution de la production d'hepcidine qui assure une meilleure disponibilité du fer dont les globules rouges ont besoin pour la synthèse d'hémoglobine. L'anémie et l'hypoxie inhibent elles aussi la synthèse d'hepcidine [13]. Ainsi, l'hepcidine se présente-t-elle comme le «ferrostat» de notre organisme permettant d'ajuster les quantités de fer aux demandes de l'organisme. Les mécanismes de la régulation de l'hepcidine par le fer ne sont pas encore élucidés. Beaucoup d'arguments laissent cependant à penser que trois protéines abondantes dans l'hépatocyte et dont le défaut est associé à une surcharge en fer (HFE, RTF2 et HJV) pourraient, individuellement ou en association, contribuer à la régulation de la synthèse d'hepcidine par le fer. Si le rôle fonctionnel de ces trois protéines est loin d'être établi (Tableau I et figure 2), il est en revanche très clairement montré que leur déficit altère la réponse du gène de l'hepcidine au fer.

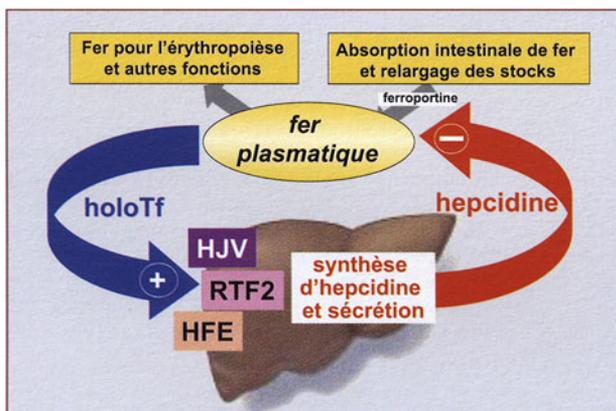


Figure 2 : Régulation de la production hépatique d'hepcidine par l'holotransferrine (holoTf) D'après Ganz T. Blood, 2005;104:3839.

Le fait que le gène de l'hepcidine soit sensible aux stimulus inflammatoires reflète sans doute les propriétés bactéricides ancestrales du peptide. L'injection de LPS (lipopolysaccharide) et d'essence de térébenthine à la souris stimule la production d'hepcidine [14]. L'implication de cette hormone dans les anémies associées aux syndromes inflammatoires, infectieux, et cancéreux, connues sous le nom d'anémies chroniques inflammatoires [15], a très tôt été évoquée. En effet, les signes caractéristiques de cette anémie (diminution du fer sérique, rétention du fer dans les macrophages et blocage de l'absorption intestinale de fer) sont tous compatibles avec les conséquences d'une augmentation de la production d'hepcidine. De fait, l'essence de térébenthine administrée à des souris déficientes en hepcidine ne provoque pas de diminution du fer sérique [14]. Enfin, chez plusieurs patients développant une anémie chronique inflammatoire, des taux élevés d'hepcidine urinaire ont été détec-

tés [9]. Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle central dans l'induction du gène hepcidine par l'inflammation. La cytokine IL6 est capable d'augmenter l'expression de l'hepcidine tant *in vivo* (injection chez la souris et perfusion chez des volontaires sains), avec diminution concomitante du fer sérique, qu'*in vitro* sur culture d'hépatocytes isolés [9, 12]. Quant aux cytokines, telles que IL1 et TNF α , leur activité, activatrice ou inhibitrice sur le gène de l'hepcidine [12, 16] reste aujourd'hui controversée. L'implication de RTF2 et de HJV dans la réponse inflammatoire de l'hepcidine a pu être éliminée. En revanche, des résultats contradictoires ont été rapportés quant à l'éventuelle participation de HFE à cette réponse [17].

III. ET SI L'HEPCIDINE ÉTAIT RESPONSABLE DE LA MAJORITÉ DES SURCHARGES GÉNÉTIQUES EN FER ?

On oppose généralement aux surcharges en fer secondaires (apport excessif de fer, maladies métaboliques, affections chroniques du foie, anémies hémolytiques ou aplasiques), les surcharges primaires ou hémochromatoses. Ce sont des maladies génétiques touchant des systèmes impliqués directement dans le métabolisme du fer [18]. Le désordre se caractérise par une absorption intestinale anormalement élevée de fer entraînant l'accumulation progressive de métal dans les tissus. Une augmentation de la ferritine sérique et du taux de saturation de la transferrine signent la surcharge. Les patients développent une symptomatologie très variée incluant, selon les cas et le stade d'évolution, cirrhose, hépatocarcinome, diabète, cardiomyopathie, arthrite et autres complications. Depuis la découverte en 1996 du premier gène de l'hémochromatose, le gène *HFE*, la liste des gènes responsables de cette maladie n'a cessé de croître (*HJV*, *RTF2*, hepcidine et ferroportine, voir tableau I) faisant de l'hémochromatose une maladie hétérogène [19]. Il existe néanmoins un point commun à toutes ces formes (excepté l'hémochromatose liée à la ferroportine, voir ci-dessous) : l'activation du gène de l'hepcidine par le fer est anormale et aujourd'hui, tout laisse à penser que la gravité et la précocité de la maladie sont directement liées aux niveaux d'hepcidine résiduels. Ainsi, dans l'hémochromatose classique liée à des mutations des gènes *HFE* ou *RTF2*, l'ARNm de l'hepcidine et le peptide sont présents, bien que diminués, alors que dans l'hémochromatose juvénile (une forme rare d'hémochromatose avec une aggravation rapide et sévère du tableau clinique) liée à des mutations des gènes de l'hémojuviline – *HJV* – ou de l'hepcidine, l'ARNm et le peptide sont beaucoup plus diminués. Ils sont complètement absents dans le cas des mutations du gène de l'hepcidine, et très fortement diminués dans le cas des mutations du gène *HJV*. En accord avec l'hypothèse selon laquelle l'hepcidine est le paramètre majeur de la gravité de l'hémochromatose, il a été montré que certaines mutations hétérozygotes du gène de l'hepcidine sont capables de moduler la gravité de la surcharge en fer lorsqu'elles sont associées à des mutations homozygotes du gène *HFE*. De la même façon, une hétérozygotie *HFE*, généralement silencieuse, peut conduire à des signes de surcharge en fer si elle est associée à une mutation hétérozygote du gène de l'hepcidine. Enfin, venant compliquer le tableau, le cas récemment décrit d'une famille présentant une hémochromatose juvénile sévère génétiquement liée à l'association des deux formes classiques de l'hémochromatose (homozygotie composite *HFE* et homozygotie *RTF2*) témoigne de ce que l'hémochromatose juvénile ne se définit pas seulement par l'atteinte des gènes de l'hepcidine ou de l'hémojuviline [20]. Il sera, bien sûr, très intéressant de connaître les taux d'hepcidine chez les malades de cette famille.

L'hepcidine apparaît donc comme le déterminant commun des hémochromatoses, ce qui met en lumière son rôle crucial dans la physiopathologie de la maladie. Notons que dans le modèle des souris hémochromatosiques, dont les gènes *Hfe* ont été invalidés, la surcharge en fer peut être prévenue par un apport d'hepcidine [21]. Ce résultat suggère qu'un possible traitement préventif de l'hémochromatose héréditaire pourrait être possible.

La dernière forme d'hémochromatose est liée à des mutations de la ferroportine. Cette maladie est généralement classée à part car elle présente plusieurs particularités [22]. Elle se transmet suivant un mode autosomique dominant (alors que les autres formes sont autosomiques récessives) et ses caractéristiques biologiques et histologiques (localisation du fer, saturation de la transferrine, ferritinémie, fer sérique...) apparaissent hétérogènes. L'équipe d'Alain Townsend vient de publier une belle étude des conséquen-

ces fonctionnelles des mutations de la ferroportine sur l'export cellulaire de fer. Il existerait deux classes de mutations de cet exporteur, ce qui pourrait régler la controverse sur les mécanismes – perte au gain de fonctions – de la surcharge en fer [23,24].

Dans le cas des mutations hétérozygotes avec perte de fonction, la réduction de la quantité de ferroportine au niveau de l'entérocyte n'a pas de conséquence mais le déficit de l'exporteur au niveau du macrophage (dont la fonction d'efflux du fer est quantitativement beaucoup plus importante que celle de l'entérocyte¹) provoque, par indisponibilité du fer, une anémie. Le fer est d'abord séquestré au niveau des macrophages (relargage inefficace), puis au niveau de l'hépatocyte car l'anémie provoque secondairement une augmentation de l'érythropoïèse et donc une augmentation de l'absorption intestinale de fer qui est stocké dans l'hépatocyte. La surcharge est la conséquence de l'haplo-insuffisance au niveau des macrophages. Dans le cas des mutations qui ne modifient pas l'activité d'export de la ferroportine, la surcharge en fer semble être expliquée par une résistance à l'hepcidine. La ferroportine est alors exprimée en permanence au niveau de l'entérocyte, le fer est hyperabsorbé et vient s'accumuler en premier lieu dans l'hépatocyte. Les malades porteurs de ces mutations ont des signes très voisins de ceux des patients souffrant d'hémochromatose liée aux gènes *HFE* ou *RTF2*. En particulier, la saturation de la transferrine et la ferritinémie sont augmentées. De façon intéressante, l'hepcidine s'est révélée augmentée dans une famille avec mutation-perte de fonction de la ferroportine, ce qui montre que le gène de l'hepcidine est sensible au fer dans cette forme de surcharge. La ferroportine agit donc bien en aval de l'hepcidine, et non en amont comme les gènes *HFE* et *HJV* (figure 2).

IV. CONCLUSION

La démonstration du rôle de l'hepcidine permet de mieux comprendre les mécanismes de la régulation du métabolisme du fer, tout en apportant un éclairage nouveau sur la physiopathologie des hémochromatoses et des surcharges en fer d'un côté, des hyposidérémies et anémies inflammatoires de l'autre. Le foie apparaît comme un élément central où sont traités les signaux de l'organisme qui concourent au maintien de l'homéostasie du fer. L'ensemble de ces signaux converge vers la synthèse d'hepcidine qui, en régulateur final, permet d'ajuster les besoins en fer de l'organisme en modulant son absorption intestinale et son recyclage au niveau des macrophages. Un travail important reste à effectuer pour préciser les mécanismes moléculaires de l'activité de l'hepcidine, de sa régulation, de sa synthèse et de sa sécrétion par le fer ainsi que pour caractériser les voies liant les régulateurs hémochromatosiques identifiés par la génétique (*HFE*, *HJV*, *RTF2*) à l'hepcidine. A terme, le dosage de l'hepcidine pourrait être utilisé pour le diagnostic et la classification des anomalies du métabolisme du fer ainsi que pour le suivi thérapeutique des surcharges en fer. Enfin, les applications thérapeutiques de la découverte de cette hormone devraient être considérables. Les molécules agonistes et antagonistes de l'hepcidine seront sans nul doute des médicaments importants dans, respectivement, les surcharges en fer et les anémies chroniques inflammatoires. ■

¹ L'entérocyte absorbe 1 mg de fer environ par jour (ce qui correspond aux pertes journalières) alors que le macrophage doit recycler près de 20 mg de fer par jour pour les besoins de l'érythropoïèse, soit une activité d'export environ 20 fois plus importante que l'entérocyte.

BIBLIOGRAPHIE

Retrouvez les références de cet article sur BioTribune.com



Tableau I : Classification des hémochromatoses héréditaires (surcharges primaires en fer)

Classification survenue de la maladie transmission	Gène (protéine) OMIM	Fonction	Type de mutations	Niveau d'hepc	Fréquence	Modèles Murins
Hémochromatose classique 40-50 ans autosomique récessive	HFE (Hfe) 235200	- Senseur du fer ? (liaison avec RTF1) - Contrôle de la réponse du gène de l'hepcidine au fer	perte de fonction	↓	très fréquent	<i>KO Hfe</i> <i>KI Hfe</i> <i>C282Y</i>
	RTF2 (Récepteur à la transferrine2) 604250	- Senseur de l'holotransferrine au niveau de l'hépatocyte. (affinité très réduite pour l'holotransferrine par rapport à RTF1)	perte de fonction	↓	très rare	<i>KO RTF2</i>
Hémochromatose juvénile 20-30 ans autosomique récessive	HJV (Hémojuvéline) 602390	Nécessaire à l'expression du gène de l'hepcidine	perte de fonction	↓↓	très rare	<i>KO HJV</i>
	HAMP (Hepcidine) 602390	Régulateur central de l'homéostasie du fer : inhibe l'absorption intestinale de fer et le recyclage du métal par les macrophages	perte de fonction	0	exceptionnel	<i>KO Usf2*</i> <i>KO Hpc1</i>
Hémochromatose liée à la ferroportine 40-50 ans autosomique dominante	SLC11A3 (Ferroportine) 606069	Exportateur du fer	perte de fonction phénotype de surcharge en fer par haploinsuffisance	↗	rare	<i>KO Fpn</i> (léthalité embryonnaire) <i>KO Fpn</i> tissus-spécifiques
			fonction d'export normale phénotype de surcharge en fer par résistance à l'hepcidine	ND		

KO, knockout, KI, knockin

* Les souris KO pour le facteur de transcription USF2 constituent le 1er modèle de déficit en hepcidine. Ce déficit fonctionnel (et non génique), est la conséquence des manipulations génétiques opérées au niveau du gène *Usf2* qui précède le locus hepcidine sur le chromosome 7 de souris [5].