

Année 2022

N° : MM0312021

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie médicale** »

OPTION: « **Biomédicale** »

Intitulé

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE : REVUE SYSTEMATIQUE

Soutenu par :

FERNANDES LIMA DO ESPIRITO SANTO ANERY KATIA

Le 15 /06 2022

Devant le jury composé du :

Pr. IBRAHIMI Azeddine, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Président

Pr. BOUABDELLAH Mounya, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Encadrante

Pr. CHACHI El Mostafa, Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Agadir, Co-encadrant

Pr. LOUATI Sara, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Examinatrice

Pr. KANDOUSSI Ilham, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Examinatrice

Dédicace

A l'éternel Dieu

Merci pour tout, la santé, le courage qui vous m'avez donné

Tout au long de cette vie

Je ne pourrais jamais vous remercier pour toutes les bénédictions

A ma chère mère et mon cher père

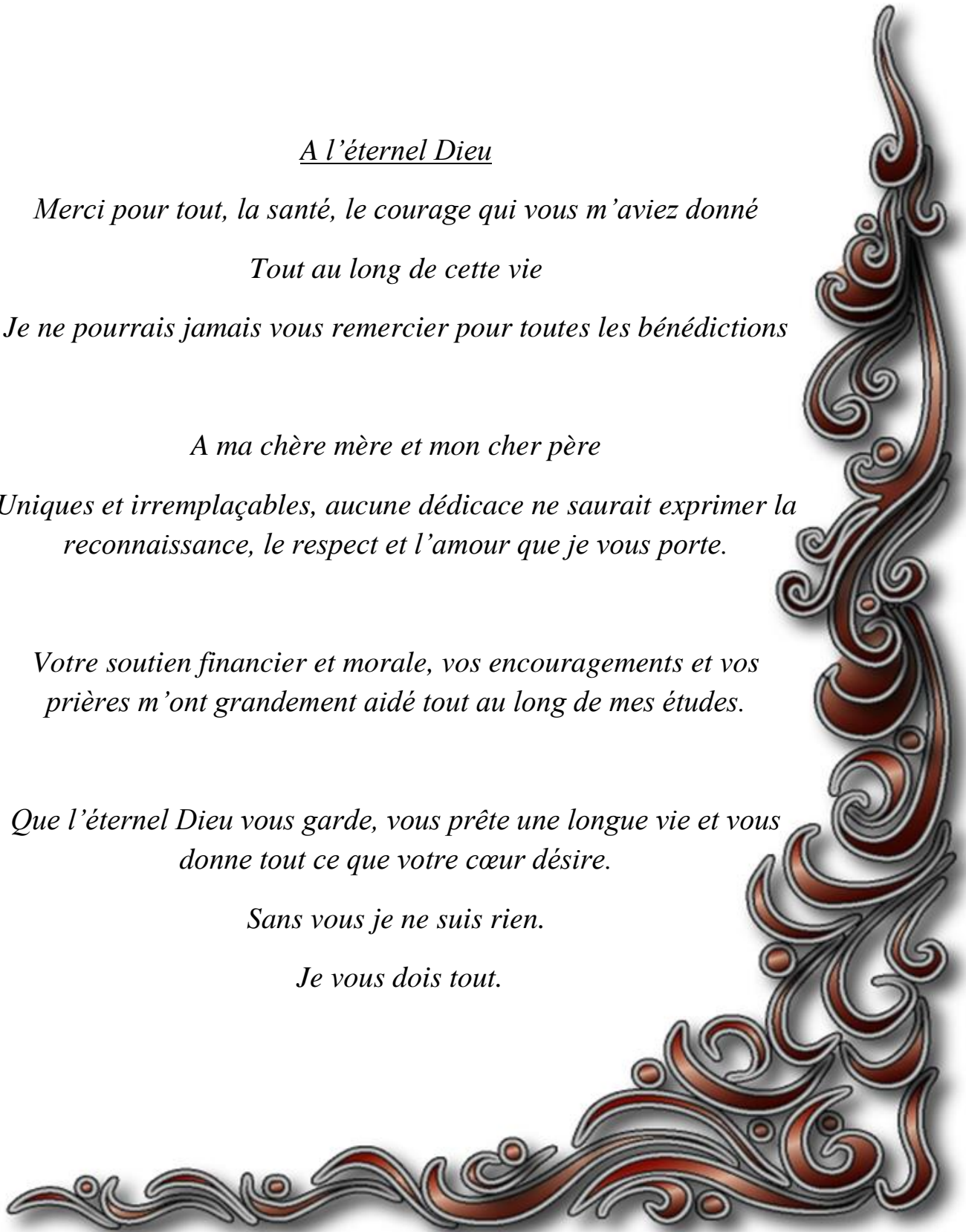
Uniques et irremplaçables, aucune dédicace ne saurait exprimer la reconnaissance, le respect et l'amour que je vous porte.

Votre soutien financier et morale, vos encouragements et vos prières m'ont grandement aidé tout au long de mes études.

Que l'éternel Dieu vous garde, vous prête une longue vie et vous donne tout ce que votre cœur désire.

Sans vous je ne suis rien.

Je vous dois tout.



A mes très chers oncles et tantes

Vous avez toujours été présent dans toutes les étapes de ma vie de près ou de loin toujours avec des paroles d'encouragement. J'espère être toujours à la hauteur de vos attentes.

A ma très chère amie Lesiley Camblé

Nous avons passé tous ces années ensemble, en partageant beaucoup de moments de joie, que Dieu te couvre de bonheur et que notre amitié reste à jamais.

A Tous mes amis

Jacqueline, Nelly Djiaga, Magaly Nguema, Roland, Adrien Malonga,

Shari Dona, Mouhssine, Tibault

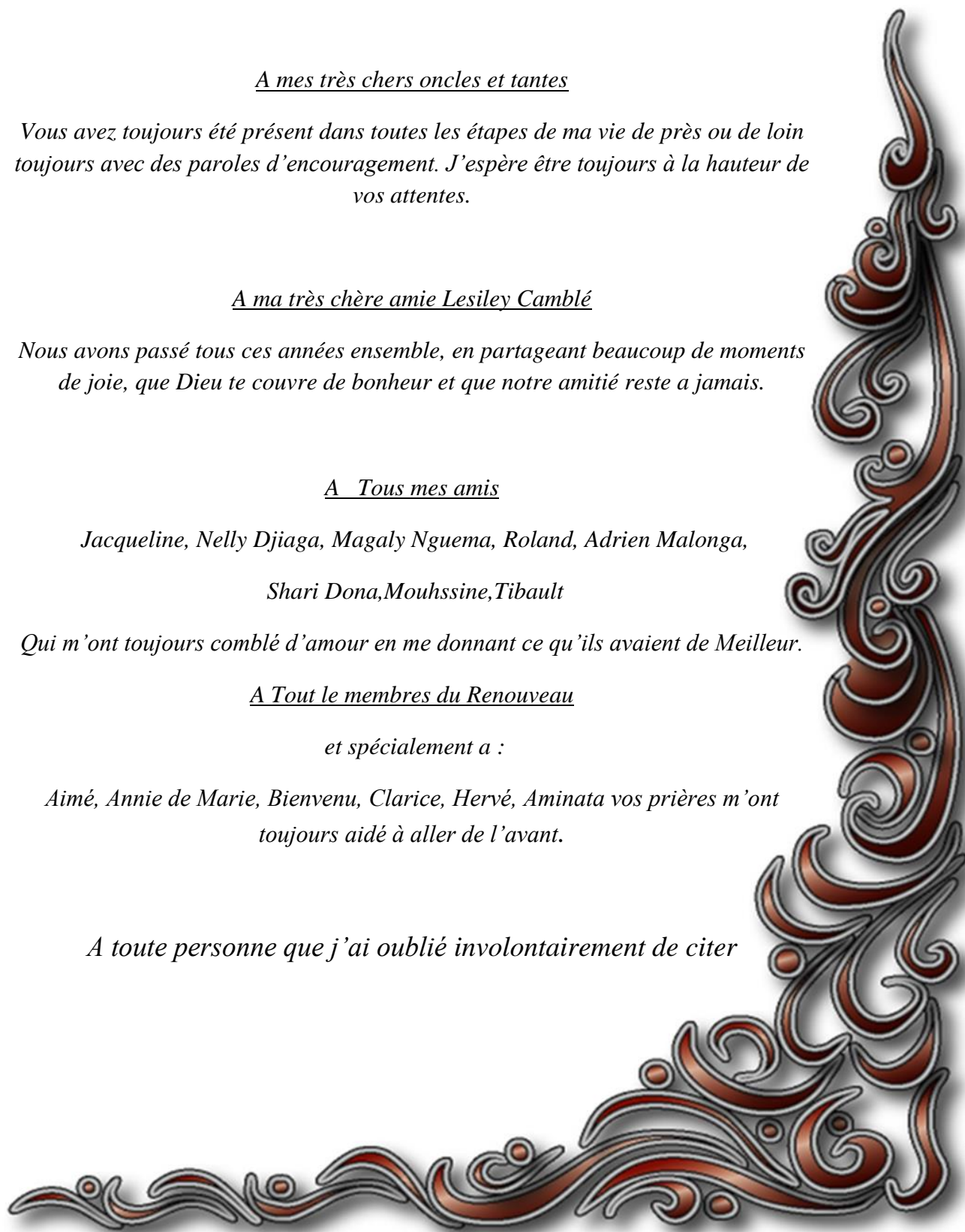
Qui m'ont toujours comblé d'amour en me donnant ce qu'ils avaient de Meilleur.

A Tout le membres du Renouveau

et spécialement a :

Aimé, Annie de Marie, Bienvenu, Clarice, Hervé, Aminata vos prières m'ont toujours aidé à aller de l'avant.

A toute personne que j'ai oublié involontairement de citer



Remerciement

A ma chère encadrante,
Madame BOUABDELLAH Mounya
Professeur
de Biochimie Laboratoire central de Biochimie –
CHU Ibn Sina de Rabat

Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger et d'encadrer ce travail. Sans vos précieux conseils, orientations, qualités scientifiques, pédagogiques et humaines ce travail n'aurait pas pu aboutir.

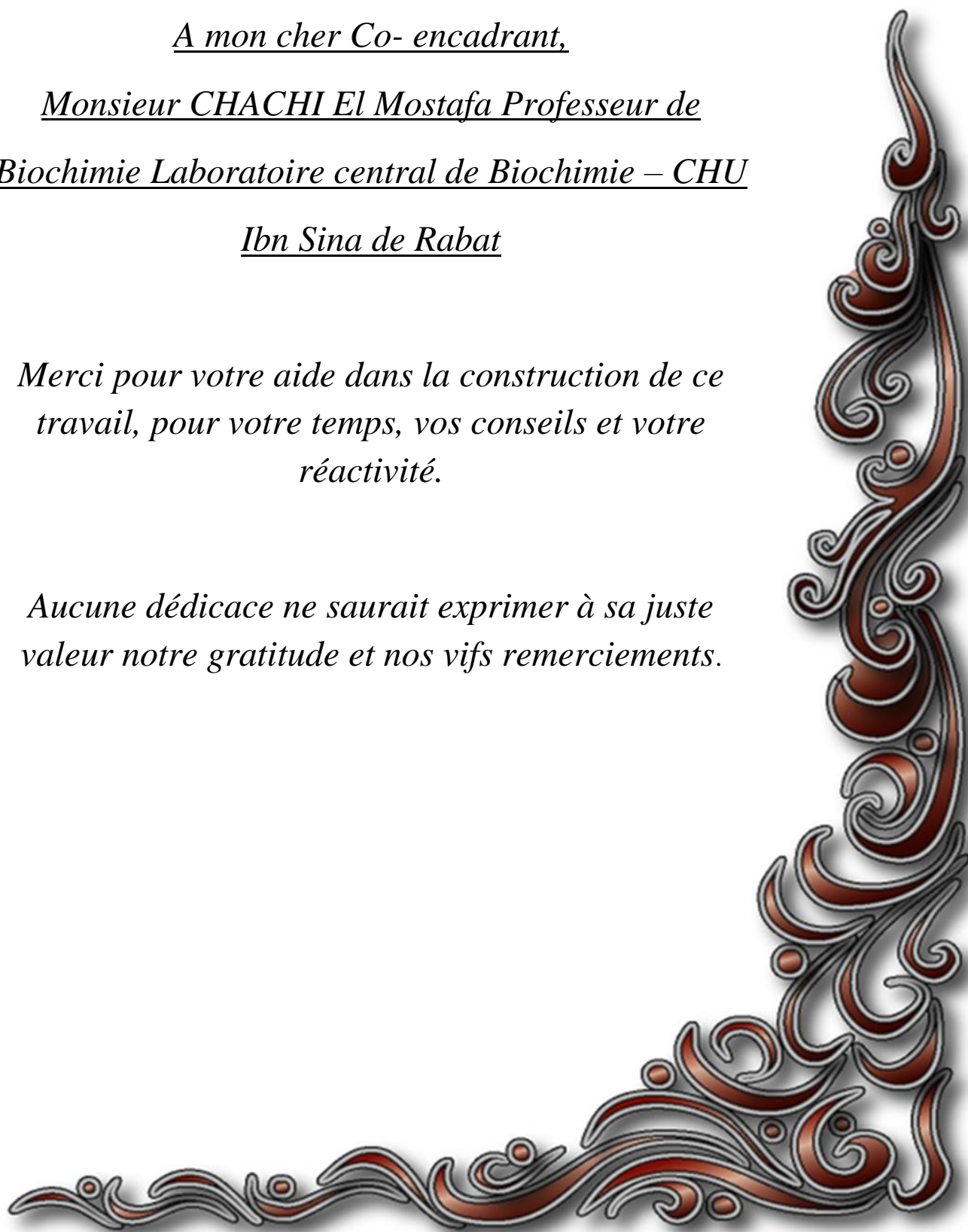
Vous m'avez guidé et aidé à trouver des outils nécessaires pour relever ce défi. Je voudrais également vous dire du plus profond de mon cœur merci de m'avoir donné un soutien moral.



A mon cher Co- encadrant,
Monsieur CHACHI El Mostafa Professeur de
Biochimie Laboratoire central de Biochimie – CHU
Ibn Sina de Rabat

Merci pour votre aide dans la construction de ce travail, pour votre temps, vos conseils et votre réactivité.

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur notre gratitude et nos vifs remerciements.



A nos chers jurys

Professeur IBRAHIMI Azzedine

Directeur du laboratoire de Biotechnologie médicale

Pour avoir accepté de juger ce travail e pour soutenir la continuité de la formation supérieure de plusieurs étudiants, à préciser les africains étrangers.

Professeur KANDOUSSI Ilham

Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous sommes très sensibles à votre gentillesse, votre accueil très aimable et votre aide précieuse.

Veillez croire en nos sentiments les plus respectueux

Professeur LOUATI Sara

Nous avons l'honneur de vous compter parmi les membres du jury de notre mémoire.

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



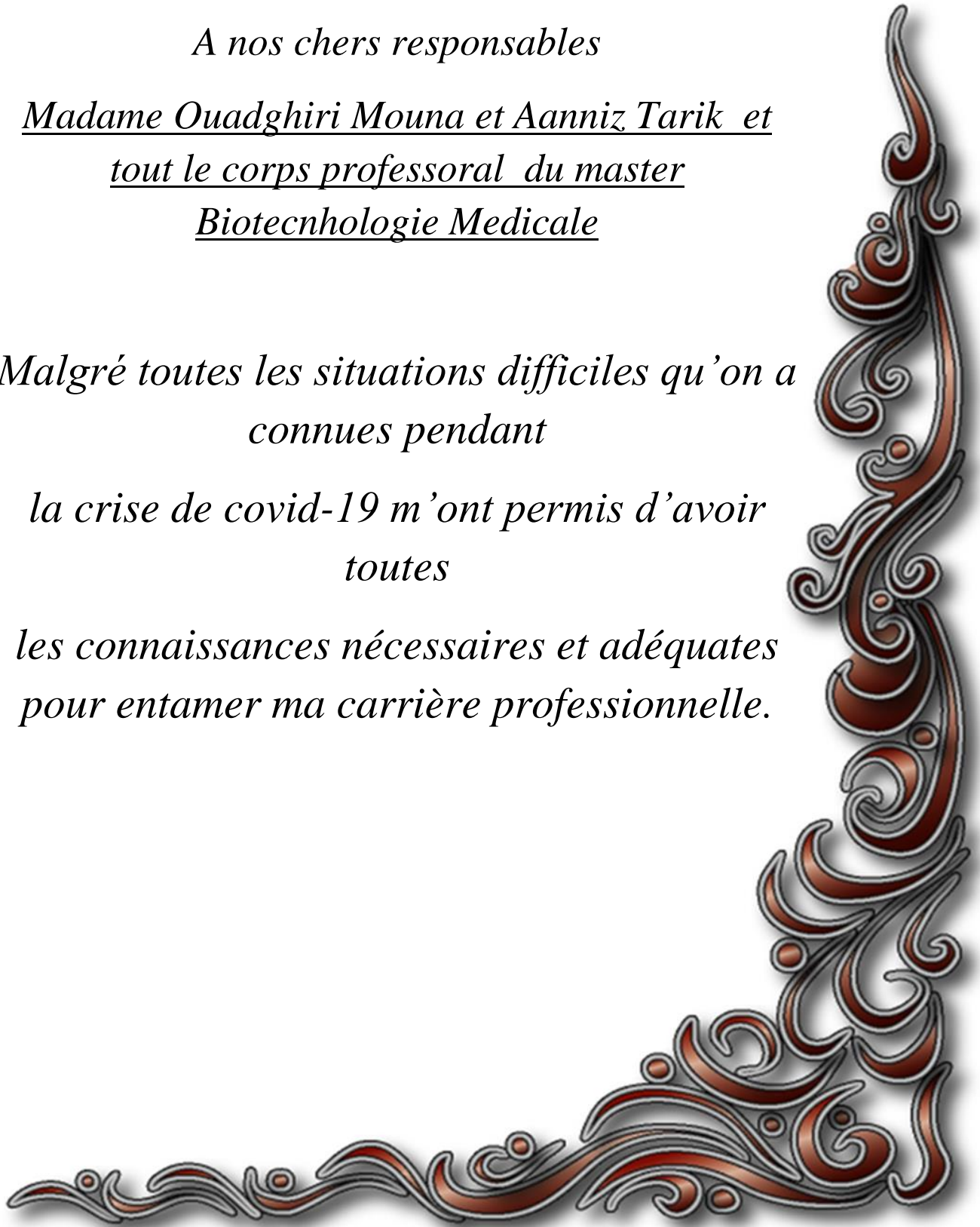
A nos chers responsables

Madame Ouadghiri Mouna et Aanniz Tarik et
tout le corps professoral du master
Biotechnologie Medicale

Malgré toutes les situations difficiles qu'on a
connues pendant

la crise de covid-19 m'ont permis d'avoir
toutes

les connaissances nécessaires et adéquates
pour entamer ma carrière professionnelle.



Résumé

Titre : Etude comparative des techniques d'analyse de la ferritine : Revue systématique

Auteur: Fernandes Lima do Espirito Santo Anery Katia

Encadrant : Pr. Bouabdellah Mounya

Co- Encadrant : Pr. Chachi EL Mostafa

Mots-clés : Ferritine ; fer ; anémie ; néphélobimétrie ; chimiluminescence ; turbidimétrie ;

Arrière-plan : L'anémie, est un problème majeur de santé publique mondiale. Le taux de ferritine sérique est l'une des investigations les plus fréquemment demandées dans les soins primaires et secondaires, que ça soit pour le diagnostic de l'anémie, de l'hémochromatose ou des syndromes inflammatoires.

Objectif : Faire une comparaison des plusieurs techniques existantes permettant de doser la ferritine.

Méthodes et résultats : Recherche des références bibliographiques dans les différentes bases de données régionales et internationales en adoptant une méthodologie de recherche rigoureuse. La stratégie de recherche a identifié 325 enregistrements. Après sélection 118 ont été analysés dans le moindre détail.

Discussion : La ferritine est une protéine de stockage du fer présente dans toutes les cellules de l'organisme. Une petite quantité se trouve dans le plasma et le sérum, ce qui reflète les réserves de fer chez les individus en bonne santé. Vu l'importance de ce marqueur biologique dans le diagnostic de plusieurs affections, il est important de revoir les différentes techniques de dosage afin d'évaluer leur efficacité de détection.

Conclusion : Les méthodes permettant de doser la ferritine présente une bonne précision. Cependant le non existence d'une technique de référence empêche une réelle comparaison entre elles.

Abstrat

Title: Comparative study of ferritin analysis techniques: A systematic review

Author: Fernandes Lima do Espirito Santo Anery Katia

Supervisor : Pr. Bouabdellah Mounya

Co-supervisor : Pr. Chachi EL Mostafa

Keywords: Ferritin; iron; anemia; nephelometry; chemiluminescence; turbidimetry;

Background: Anemia is a major public health problem worldwide. Serum ferritin levels are one of the most frequently requested investigations in primary and secondary care, whether for the diagnosis of anemia, hemochromatosis or inflammatory syndromes.

Objective: To make a comparison of several existing techniques for the determination of ferritin.

Methods and results: Search of bibliographic references in different regional and international databases using a rigorous search methodology. The search strategy identified 325 records. After selection, 118 were analyzed in detail.

Discussion: Ferritin is an iron storage protein present in all cells of the body. A small amount is found in plasma and serum, reflecting the iron stores in healthy individuals. Given the importance of this biomarker in the diagnosis of many conditions, it is important to review the various assay techniques to assess their detection efficiency.

Conclusion: Methods for the determination of ferritin have good accuracy. However, the lack of a reference technique prevents a real comparison between them.

مختصرة

عنوان: دراسة مقارنة لتقنيات تحليل الفيريتين: منهجية مراجعة

الكاتب: فرنانديز ليما دو إسبيريتو سانتو أنري كاتيا

مشرف: أ.د. بو عبدالله مونيا

مشرف مشارك: شاشي المصطفى

الكلمات الدالة: فيريتين. حديد ؛ فقر الدم ؛ قياس الكلية. تألؤ كيميائي. العكر.

خلفية: فقر الدم هو مشكلة صحية عامة عالمية كبرى. يعد مستوى الفيريتين في الدم أحد أكثر الفحوصات المطلوبة في الرعاية الأولية والثانوية ، سواء لتشخيص فقر الدم أو داء ترسب الأصبغة الدموية أو المتلازمات الالتهابية.

هدف: القيام بإجراء مقارنة بين العديد من التقنيات الحالية لقياس الفيريتين.

الطرق والنتائج: البحث عن المراجع الببليوغرافية في مختلف قواعد البيانات الإقليمية والدولية من خلال اعتماد منهجية بحث صارمة. حددت استراتيجيات البحث 325 سجلاً. بعد الاختيار تم تحليل 118 بأدق التفاصيل.

مناقشة: الفيريتين هو بروتين لتخزين الحديد موجود في جميع خلايا الجسم. توجد كمية صغيرة في البلازما والمصل ، مما يعكس مخزون الحديد لدى الأفراد الأصحاء. نظراً لأهمية هذه العلامة البيولوجية في تشخيص العديد من الحالات ، فمن المهم مراجعة تقنيات الفحص المختلفة من أجل تقييم كفاءة الكشف عنها.

استنتاج: طرق تحديد الفيريتين لديها دقة جيدة. ومع ذلك ، فإن عدم وجود تقنية مرجعية يمنع التفاهم الحقيقي بينهما.

Table des Matières

Dédicace.....	i
Remerciement	iv
Résumé.....	ix
Table des Matières	xii
Liste des abréviations.....	xvi
Liste des Figures	xix
Liste des Tableaux	xx
Introduction.....	1
MATERIELS ET METHODES	3
I. STRATEGIE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Les mots - clés.....	4
2. Moteurs de recherches et bases de données	4
2.1. Moteurs de recherches spécialisés	5
2.2. Bases de données factuelles exprimant les données dans un langage numérique ou symbolique.....	5
3. Littérature grise	5
4. Utilisation des ouvrages et des périodiques	6
II. STRATEGIE DE SELECTION DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1. Elaboration des critères de sélection des publications recueillies.....	6
1.1. Critères d'inclusion.....	6
1.1.1. Revue systématique	6
1.1.2. Méta-analyse.....	6
1.1.3. Analyse poolée	7
1.1.4. Etude de cas cliniques.....	7
1.1.5. Recommandations.	7
2. Application des critères de sélection aux publications recueillies	7
2.1. Premier niveau d'exclusion : la langue	7
2.2. Deuxième niveau d'exclusion : titre et résumé.....	7
2.3. Troisième niveau d'exclusion : l'accessibilité	8

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

2.4. Quatrième niveau d'exclusion : le contenu de la publication	8
III. Méthode rédactionnelle : Structure IMRAD	9
1. Introduction	9
2. Méthodes et matériels.....	9
3. Résultats	9
4. Discussion	9
Résultats	10
I. Résultats bruts obtenus à partir de la recherche bibliographique	11
1. Première recherche bibliographique.....	11
2. Deuxième recherche bibliographique.....	11
3. Troisième recherche bibliographique.....	11
4. Quatrième recherche bibliographique	11
II. Résultats définitifs obtenus à partir de la sélection des références bibliographiques	12
Discussion	14
Chapitre I : Métabolisme du fer	15
1. Généralités.....	15
2. Absorption intestinale du fer	17
2.1. Absorption intestinale du fer non Héminique.....	17
2.2. Absorption du fer Héminique	17
3. Fer dans la circulation/Transport du fer	19
4. Stockage du fer.....	20
4.1. Stockage du fer dans le foie	20
4.2. Érythrophagocytose et stockage du fer dans les macrophages	21
5. Régulation du métabolisme du fer	24
5.1. Régulation intracellulaire.....	24
5.1.1. Rôle du système de régulation intracellulaire du métabolisme du fer IRE/IRP	24
5.1.2. Régulation systémique de l'absorption intestinale	25
5.2. Régulation de la synthèse de l'hepcidine.....	28
6. Variations pathologiques associées au métabolisme du fer	30
6.1. Anémie Ferriprive.....	30

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

6.1.1.	Etiologie.....	30
6.1.2.	Diagnostic en laboratoire de l'anémie ferriprive	31
6.1.3.	Epidémiologie.....	34
6.1.3.1.	Au niveau Mondiale.....	34
6.1.3.2.	Au Maroc	35
6.2.	Anémie de maladie chronique ou anémie d'inflammation.....	35
6.3.	Surcharge martiale	37
6.3.1.	Hémochromatose	37
6.3.2.	Hémochromatose héréditaire.....	37
6.3.2.1.	Classification de l'hémochromatose héréditaire	38
a.	Hémochromatose héréditaire (TYPE 1, HFE1,).....	38
b.	Hémochromatose de type IIa et IIb	39
c.	Mutation du récepteur de la transferrine (TYPE 3).....	40
d.	Mutation ferroportine (TYPE 4).....	40
6.3.2.2.	Epidémiologie.....	42
6.3.3.	Surcharge de fer secondaire.....	43
Chapitre II : La Protéine ferritine		44
1.	Structure Chimique	44
2.	Synthèse de la ferritine	49
2.1.1.	Assemblage supramoléculaire de la ferritine.....	49
3.	Rôles de la ferritine dans la cellule	53
3.1.1.	Localisations et rôles de la ferritine dans la cellule.....	53
3.1.2.	Ferritine Sérique	56
4.	Dégradation de la Ferritine.....	56
Chapitre III : Techniques d'analyse de la Ferritine.....		64
1.	Intérêt du dosage de la ferritine.....	64
1.1.1.	Circonstances de prescription.....	64
1.2.	Rappels sur la valeur diagnostique d'un test biologique	65
2.	Les méthodes de dosage de la ferritine :	65
3.	Immunoprécipitation en milieu liquide	66
3.1.	Agglutination par des particules en latex	68

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

3.2. Immunoprécipitation en milieu liquide et détection par néphélobimétrie ou turbidimétrie.....	69
3.2.1. Immunoturbidimétrie.....	70
3.2.1.1. Turbidimétrie utilisant des particules en latex.....	71
3.2.1.2. Avantages de la turbidimétrie.....	71
3.2.2. Immunonéphélobimétrie.....	72
3.2.2.1. Avantages de la néphélobimétrie.....	75
3.2.3. Limitations des techniques de néphélobimétrie et de turbidimétrie.....	75
3.2.3.1. Risque de faux négatif par excès d'Ag.....	75
3.2.3.2. Effets matrice.....	76
3.2.3.3. Inconvénients de la néphélobimétrie.....	77
4. Immunoanalyses avec marqueur.....	78
4.1. Chimiluminescence.....	78
4.1.1. Dosage immunoenzymatique par chimiluminescence.....	79
4.1.2. Esters d'acridinium en tant qu'étiquettes dans un test immunochemiluminescent	80
4.1.3. L'immunodosage électrochemiluminescent.....	80
5. Intervalles de référence.....	81
6. Standardisation.....	83
6.1. Traçabilité métrologique et hiérarchies d'étalonnage.....	84
7. Comparaison entre les différentes techniques.....	85
Conclusion.....	87
Références.....	89

Liste des Abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : Anémie ferriprive

Ag : Antigène

AI : Anémie inflammatoire

ALT : Alanine aminotransférase

AMP : Adénosine monophosphate

ANAES : Agence nationale d'accréditation et évaluation en santé

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

AST : Aspartate transaminase

ATP : Adénosine-Triphosphate

Bfr : Bactérioferritines

BMP : Bone morphogenic proteins

CCMH : Concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne

CE : Cellules épithéliales cornéennes

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CLEIA : Chemiluminescence enzyme immunoassay

CLSI : Institut des normes cliniques et de laboratoire / Clinical and laboratory standards institut

CMA : Autophagie médiée par les chaperons

CST : Coefficient de saturation de la transferrine

Cullin 7 : Domaine CUL7

CV : Coefficients de variation intra-série

Dcyt : Duodéal cytochrome B

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

DMT1 : Divalent Metal Transporter 1

Dps : Protéines de liaison à l'ADN à partir de cellules affamées

ECLIA : Immunodosage électrochimiluminescent

EPO : Erythropoïétine

FICC : Fédération internationale de chimie clinique

FPN : Ferroportine

FSC : Formule sanguine complète

FTH1 : La sous unité H de la ferritine

FtMt : Ferritine mitochondriale

Ftn : Ferritines classiques

HAMP : Hepcidine Antimicrobial Peptide

HAS : Haute autorité de santé

HERC2 : HECT and RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 2

HH : Hémochromatose héréditaire

HIC : Concentration hépatique en fer /Hepatic iron content

HIF : Facteur transcriptionnel sensible à l'hypoxie

HJV : Hémojuvéline

HO : Hème oxygénase, : Hème oxydases

IC : Immun complexe

IRE : Iron Responsive Eléments

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IRP : Iron Regulatory Proteins

IS : International standards

ISC : Iron-Sulfur Cluster

ISO : Organisation internationale de normalisation

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

JNK : Kinase N-terminale c-Jun

LIP : Pool de fer labile / Labile iron pool

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease/ stéatose hépatique non alcoolique

NCO4 : Coactivateur de récepteur nucléaire 4

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAM : Peptide antibactérien antimicrobien

PCT : Porphyrine cutanée tardive

RIA : Radioimmunoassay

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RTf : Récepteurs spécifiques à la transferrine

RTF1 : Récepteur 1 de la transferrine

RTF2 : Récepteur 2 de la transferrine

Ru(bpy)₃²⁺ : Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride

SF : Ferritine sérique / Serum ferritin

Steap3 : 6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3

Tf : Transferrine

TPA : Tripropylamine

TS : Serum transferrine iron saturation

UBD : Ubiquitin-binding domain

VHC : Virus de l'hépatite C

VLP : Particules pseudo virales

Liste des Figures

Figure 1 : Procédure de recueil des 325 références bibliographiques 12

Figure 2 : Logigramme de la procédure de recherche bibliographique 13

Figure 3 : Mécanismes de l'absorption intestinal du fer..... 18

Figure 4: Flux du fer dans les macrophages 23

Figure 5 : Régulation systémique du fer dans l'organisme 27

Figure 6 : Rôle et régulation de la synthèse de l'hepcidine..... 28

Figure 7: Le métabolisme du fer fonctionne comme un circuit fermé. 29

Figure 8: Algorithme d'approche clinique de l'anémie 30

Figure 9: Algorithme décisionnel pour le diagnostic des anémies microcytaires 33

Figure 10: Algorithme décisionnel permettant de distinguer une anémie ferriprive, inflammatoire, ou mixte 36

Figure 11 : Algorithme concernant le diagnostic et le traitement de l'HH 41

Figure 12 : (a) Typical tetrahedral structure of mini-ferritin (Dps). Les monomères du faisceau à quatre hélices sont représentés sous forme de rubans. (b) cages à protéines de mini-ferritine Dps vues à travers le triple axe; l'image montre le positionnement des acides aminés hydrophobes le long du pore. 45

Figure 13 : (a) Structure cristalline de la ferritine (PDB 2ffx). Chacune des 24 chaînes est colorée individuellement. La structure est montrée regardant vers le bas de l'axe quadruple. (b) Structure de la ferritine avec un potentiel électrostatique cartographié sur la surface accessible aux solvants. Rouge : $-5 e^{-1} \text{ kT}$, bleu : $+5 e^{-1} \text{ kT}$. (c) La structure en forme de cage et le diamètre extérieur/intérieur de la ferritine. (d) Structures of human H-ferritin (PDB ID: 4ZJK) and L-ferritin (PDB ID: 6TSF). 47

Figure 14 : Un diagramme schématique pour la préparation de l'apoferritine 49

Figure 15 : Un certain nombre d'assemblages différents peuvent être formés par des protéines ou des peptides..... 50

Figure 16 : Détection par FRET de l'assemblage de ferritine..... 53

Figure 17 : Localisations et fonctions de la ferritine dans la cellule. 55

Figure 18 : Trois types d'autophagie dans les cellules de mammifères 57

Figure 19 : Taux de contrôle de la liaison Fe^{2+} -ARN de la synthèse de la protéine ferritine..... 59

Figure 20 : Les protéines de type ATG8/LC3/GABARAP sont d'une importance cruciale dans l'autophagie sélective 60

Figure 21 : En condition basale ou en carence martiale, le fer héminique est stocké dans la ferritine, une molécule multimérique capable de chélater 4 000-4 500 atomes de fer par molécule..... 62

Figure 22 : Courbe de précipitation du complexe Ag-Ac..... 68

Figure 23 : Arrangements optiques de néphélométrie et de turbidimétrie..... 72

Figure 24 : Principe de la néphélométrie pour la mesure des réactions antigène-anticorps 74

Figure 25 : Une hiérarchie d'étalonnage complète avec une traçabilité métrologique au SI 84

Liste des Tableaux

Tableau I : Prévalence de l'anémie selon l'âge et le milieu de résidence selon une enquête du ministère de santé faite en 2012..... 35

Tableau II : Récepteurs spécifiques de l'autophagie 61

Tableau III : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de la turbidimétrie et de la néphélométrie..... 77

Introduction

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

Le maintien de concentrations stables de fer, à la fois intracellulaire et extracellulaire, nécessite le transport coordonné du fer dans le plasma à partir de sources alimentaires absorbées dans le duodénum, de globules rouges sénescents recyclés par les macrophages et de son stockage dans les hépatocytes. Le taux d'hémoglobine, le coefficient de saturation de la transferrine (CST) et la ferritine sérique sont les indices les plus couramment utilisés pour représenter l'état du fer dans le corps humain (1). La ferritine est la protéine responsable de la mise en réserve du fer dans l'organisme. Vu son aptitude à stocker le fer, la ferritine possède comme fonction la réserve et en même temps la détoxification du fer(2).

La concentration de ferritine est largement utilisée comme marqueur des réserves et du statut en fer, afin de pouvoir établir un bon diagnostic lorsque qu'ils suspectent être devant un cas du trouble de métabolisme du fer, les cliniciens sont souvent amenés à demander un dosage de la ferritinémie. Il existe plusieurs techniques de dosage de la ferritine qui ont été développées et automatisées au fil des années. Mais au regard de l'importance de cet examen de laboratoire dans la démarche diagnostique des anémies et de la demande courante de cette analyse, il est nécessaire pour les laboratoires d'adopter des méthodes fiables capables de détecter et de discriminer tous les statuts en fer possibles (carence, et surcharge) ; en vue d'une bonne orientation du clinicien, mais aussi éviter le gaspillage de ressources surtout financières aux patients qui sont plus nombreux dans les pays à revenu faible ou intermédiaire.

L'objectif de ce travail est de souligner l'importance des techniques de dosage de la ferritine, tout en rapportant les principes et les protocoles de ces techniques ; et ensuite évaluer la comparabilité entre les différentes techniques de dosage, en termes de spécificité sensibilité et exactitude afin de pouvoir proposer si possible la meilleure des techniques.

MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre présentera la méthodologie utilisée pour la réalisation de ce travail, en établissant un protocole rigoureux, de recueil de références bibliographiques.

I. STRATEGIE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Elle a débuté par le choix des piliers de la recherche bibliographique.

1. Les mots - clés

Ils ont été choisis selon le thème de l'étude, les chapitres et les objectifs finaux visés.

Pour cerner le sujet dans l'ensemble de ses aspects, les mots clés choisis ont été les mots attribués à la ferritine ou aux troubles du métabolisme du fer, avec les mots clés correspondant aux différentes techniques de dosage, ainsi que les mots clés ciblant des pathologies en rapport avec notre sujet.

Exemples :

- Anémie Ferriprive
- Carence martiale
- Ferritine
- Métabolisme du fer
- Ferritinophagie
- Turbidimétrie
- Néphélométrie
- Chimiluminescence
- Méthodes de dosage de la ferritine
- Standardisation/ Harmonisation

2. Moteurs de recherches et bases de données

Quatre recherches ont été réalisées dans le temps afin de rassembler le maximum d'informations au sujet de la ferritine et ses méthodes de dosage et de rédiger un rapport final contenant le plus d'informations possibles.

Les bases de données utilisées lors de la recherche bibliographique étaient :

2.1.Moteurs de recherches spécialisés

La recherche documentaire a été réalisée en interrogeant bases des données internationales et régionales.

L'équation de recherche sur les différents moteurs de recherche spécialisés a été établie en utilisant un seul mot clé (exemple : ferritine) ou en combinant différents mots clés correspondant à notre sujet.

Les moteurs de recherche utilisés étaient :

- PubMed ;
- Google scholar ;
- Erudit ;
- Embase ;
- Science directe ;
- EM consulte ;
- Scielo ;
- HAL ;
- Z.library ;

2.2.Bases de données factuelles exprimant les données dans un langage numérique ou symbolique.

En vue d'obtenir des données en relation avec épidémiologie, nous avons effectué des recherches complémentaires sur les grands sites de recommandations en matière de santé publique.

Exemples de bases de données factuelles utilisées :

- World Health Organization <http://www.who.int/>
- HAS (Haut autorité de santé)
- ANAES (Agence nationale d'accréditation et évaluation en santé)

3. Littérature grise

Elle représente l'ensemble des données non officiellement publiées par les principales bases de données.

Exemples :

- Articles publiés dans les sites des différentes bibliothèques universitaires
- Thèses Universitaires

4. Utilisation des ouvrages et des périodiques

Exemples:

- Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics
- Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 23^e édition
- Clinical Chemistry Principles Techniques Correlations

II. STRATEGIE DE SELECTION DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Elaboration des critères de sélection des publications recueillies

1.1. Critères d'inclusion

Pour être sélectionnées, les articles devaient répondre aux critères d'inclusion suivants :

- Publications obtenues à partir d'un mot-clé ou de la combinaison de plusieurs mots-clés ;
- Publications originales (qui émanent directement de l'auteur) ;
- Structure IMRAD (sauf recommandations et revue de la littérature) ;
- Langue française, anglaise, portugaise ou espagnole ;
- Publications de type :

1.1.1. Revue systématique

La revue systématique identifie toutes les preuves publiées et non-publiées sur un sujet en particulier et les synthétise de façon rigoureuse et structurée. Elle a comme objectif de vérifier si la littérature scientifique réunit des preuves suffisamment solides pour répondre, de façon précise, à une question de recherche (3).

1.1.2. Méta-analyse

La méta-analyse est un type d'analyse statistique combinant les données de toutes les publications recensées pour améliorer l'objectivité et la validité des résultats. Elle aboutit à un résultat original et peut se faire indépendamment d'une revue systématique. Les méta-analyses sont très utilisées dans le domaine de la santé(4).

1.1.3. Analyse poolée

Elle consiste en une re-analyser globalement les données individuelles de plusieurs études épidémiologiques indépendantes, en les combinant en une seule étude.

1.1.4. Etude de cas cliniques

En médecine, un cas clinique peut être défini comme un rapport détaillé des caractéristiques anthropométriques, symptômes, signes physiques, explorations, diagnostics, traitements, suivi et évolution d'un patient(5).

1.1.5. Recommandations.

Les articles ont été recherchés à partir de 2011, à l'exception d'une référence que date de 2009 (vu les informations pertinentes). En ce qui concerne les articles faisant une comparaison des différents types de dosage ils étaient recherchés à partir de 2015. Nous avons jugé d'autre part que ces 2 limites temporels permettaient un recul suffisant pour la recherche d'articles traitant des tous les thèmes de notre travail.

Les critères d'exclusion étaient :

- Non réponse aux critères d'inclusion.
- Absence de résumé, publications inaccessibles ou texte non disponible en intégralité.
- Publications hors – sujet ;
- Publications non pertinentes

2. Application des critères de sélection aux publications recueillies

Après la collecte, en suivant les critères d'inclusion, des différentes publications, la sélection des articles s'est faite en 4 étapes et par un seul lecteur selon les critères d'exclusion :

2.1.Premier niveau d'exclusion : la langue

Nous avons exclu pour des raisons de compréhension, toute publication dont la rédaction (titre inclus) a été faite en une langue autre que l'anglais, le français, le portugais et l'espagnol.

2.2.Deuxième niveau d'exclusion : titre et résumé

Toute publication jugée hors sujet ou non pertinente après la lecture du titre et du résumé a été éliminée de la sélection.

2.3.Troisième niveau d'exclusion : l'accessibilité

Toute référence bibliographique inaccessible a été éliminée de la sélection.

2.4.Quatrième niveau d'exclusion : le contenu de la publication

Après lecture des articles en texte intégral, nous avons, analysé le contenu des publications en termes de pertinence. Et nous avons éliminés toutes celles ayant un contenu :

- Incomplet, peu pertinent ou non pertinent ;

Afin de pouvoir obtenir un plus grand nombre de données, nous avons récupéré à partir d'articles obtenus sur les moteurs de recherches, les références les plus pertinentes nous donnant accès à de nouveaux articles auxquels nous avons appliqué la même procédure sélective.

Une analyse synthétique des résultats a ensuite été effectuée afin de répondre à l'objectif de notre étude.

III. Méthode rédactionnelle : Structure IMRAD

Nous avons choisi pour ce travail, d'adopter la structure rédactionnelle IMRAD soutenue par une méthodologie reproductible et objective de recherche bibliographique. Elle se présente sous la forme suivante :

1. Introduction

Elle formule clairement les messages du PFE, présente son contexte général et spécifique et spécifie les objectifs visés à savoir, l'importance de la ferritine comme biomarqueur en biochimie clinique.

2. Méthodes et matériels

Cette partie a comme objectif de détailler les outils (ex : Excell, end note, Zotero) et la stratégie de recherche bibliographique utilisés de manière à que le résultat puisse être reproductible.

3. Résultats

Cette partie présente les résultats et caractéristiques de la recherche bibliographique sous forme de logigramme.

4. Discussion

Elle présente, à partir de la bibliographie consultée, une synthèse des connaissances en matière de certaines pathologies telles que (anémie et hémochromatose), du métabolisme du fer, de la ferritine et ses méthodes d'analyse.

Cette partie est divisée en trois chapitres intitulés respectivement :

Chapitre 1 : Métabolisme du fer

Chapitre 2 : La protéine ferritine

Chapitre 3 : Techniques d'analyse de la ferritine

Résultats

I. Résultats bruts obtenus à partir de la recherche bibliographique

Après la collecte de données à partir des différents moteurs de recherche, il a été possible d'extraire un nombre total de 325 références bibliographiques (figure 1).

1. Première recherche bibliographique

Obtention 90 références bibliographiques.

- Moteurs de recherche et bases de données factuelles [80 références bibliographiques] ;
- La littérature grise [10 références bibliographiques].

2. Deuxième recherche bibliographique

Obtention 60 références bibliographiques :

- Moteurs de recherche et bases de données factuelles [53 références bibliographiques] ;
- Consultation d'ouvrages et de périodiques [5 références bibliographiques] ;
- La littérature grise [3 références bibliographiques].

3. Troisième recherche bibliographique

Obtention de 110 références bibliographiques :

- Moteurs de recherche et bases de données factuelles [95 références bibliographiques].
- Consultation d'ouvrages et de périodiques [10 références bibliographiques] ;
- La littérature grise [5 références bibliographiques].

4. Quatrième recherche bibliographique

Obtention de 70 références bibliographiques :

- Moteurs de recherche et bases de données factuelles [60 références bibliographiques].
- Consultation d'ouvrages [4 références bibliographiques] ;
- Littérature grise [5 références bibliographiques].

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

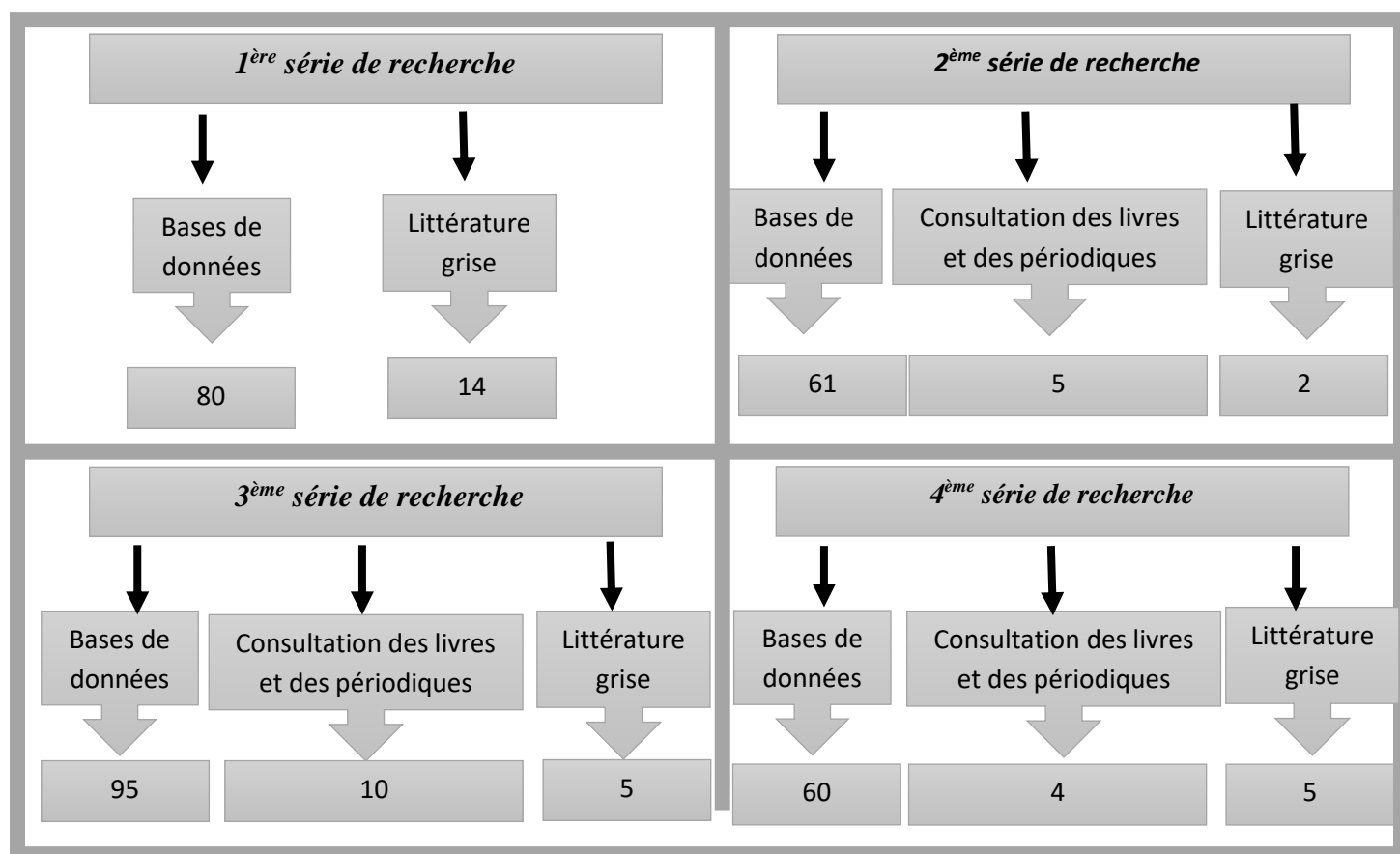


Figure 1 : Procédure de recueil des 325 références bibliographiques

II. Résultats définitifs obtenus à partir de la sélection des références bibliographiques

Après obtention des résultats bruts de la recherche bibliographique et application des critères de sélection sites si dessous, 118 références bibliographiques ont été définitivement retenues (figure 2).

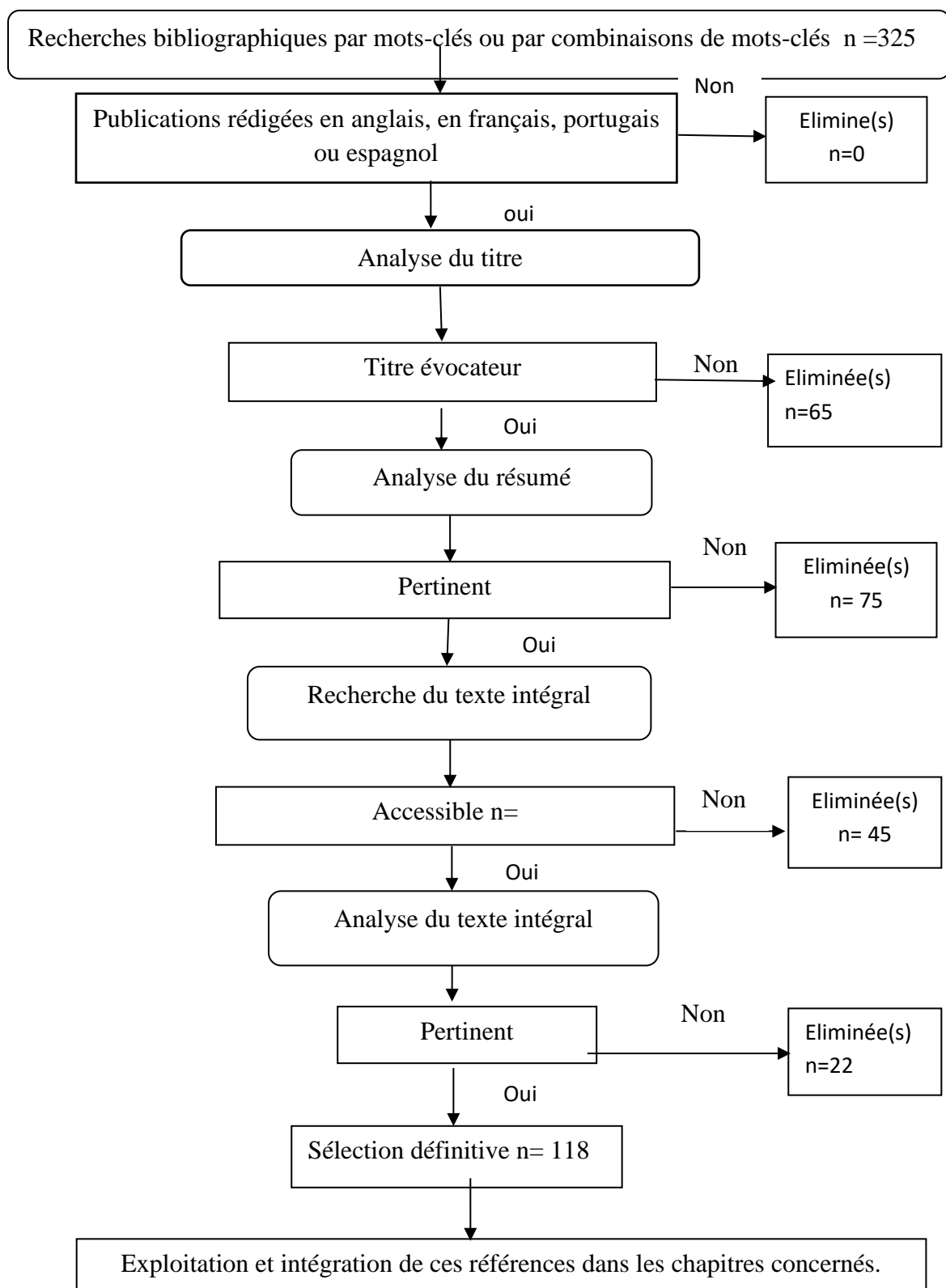


Figure 2 : Logigramme de la procédure de recherche bibliographique

Discussion

Chapitre I : Métabolisme du fer

1. Généralités

Le fer est essentiel à l'organisme, il intervient dans des nombreux processus tels que la synthèse de l'hémoglobine, des érythrocytes et dans les réactions d'oxydo-réduction. Ce métal existe sous deux formes ioniques (6):

- Fer ferreux (Fe^{2+}) connu aussi sur le nom de fer héminique
- Fer ferrique (Fe^{3+}) aussi appelé fer non héminique presque insoluble

Bien que le fer soit indispensable à l'organisme, son excès est délétère car il génère la production de radicaux via la réaction de Fenton : $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO\bullet$. La formation de radicaux hydroxyles conduit à d'importants dommages cellulaires(7).

Dans le métabolisme du fer deux classes de protéines sont impliquées. Les unes nécessaires au transport du fer dans l'organisme, à son passage à travers les membranes cellulaires, et finalement à son stockage dans les tissus sous forme disponible et non toxique.

D'autres utilisent le fer pour leur fonction et sont classées en fonction de l'atome de fer dans la molécule, montrant les nombreuses fonctions différentes associées au fer. Nous distinguons :

- Les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine, cytochromes...) où le fer est présent sous forme d'hème, lié à quatre noyaux pyrroles d'une molécule de porphyrine IX.
- Les protéines à centre fer-soufre où des atomes de fer sont liés de façon covalente à des atomes de soufre, elles-mêmes liées par l'intermédiaire de résidus de cystéine(8).

La quantité totale du fer dans l'organisme est de 3 à 4 g. Environ deux tiers (60%) sont contenus dans les globules rouges, 300 mg est contenu dans la myoglobine des muscles et le restant est stocker sous deux formes (9):

- La forme soluble 20%, ou le fer est stocké dans la ferritine
- Une forme insoluble (hémosidérine).

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

L'apport alimentaire du fer est de 1 à 2 mg/jour. Une alimentation équilibrée peut fournir entre 10 à 20 mg de fer, néanmoins seulement 1 à 2 mg peuvent être absorbés par l'intestin(10). Le fer hémique le mieux absorbé, se retrouve exclusivement dans produits animaux et le fer non hémique le moins absorbé se trouve essentiellement dans les produits végétaux et aussi dans les œufs (11,12).

Plusieurs protéines, telles que la transferrine, la ferritine, l'hémosidérine, l'hepcidine et la ferroportine, exercent des fonctions cruciales dans le maintien de l'homéostasie systémique de fer. Les macrophages jouent un rôle important dans l'exécution des cascades de régulation qui conduisent à des variations des taux de fer systémique. Schématiquement, le site principal de l'absorption du fer est l'intestin grêle, mais la plupart du fer est recyclé par le système des monocytes-macrophages via la phagocytose des érythrocytes sénescents. Dans la circulation, le fer est généralement lié à la transferrine (Tf), et la majeure partie du fer lié à la Tf est utilisé pour l'érythropoïèse de la moelle osseuse. Dans les cellules, le fer est stocké dans les protéines hémosidérine ou ferritine. Le fer est le seul micronutriment connu pour avoir une hormone de régulation, l'hepcidine, qui est régulée à la fois selon l'état nutritionnel et selon les infections. L'hepcidine est principalement synthétisée dans le foie. Elle agit en tant que régulateur négatif du taux de fer et sa production est augmentée dans la surcharge en fer et dans l'inflammation. Le fer intracellulaire est libéré dans la circulation par la ferroportine (FPN). Le fer est reversé à la Tf et réutilisé pour l'érythropoïèse de la moelle osseuse. L'hepcidine se lie à l'exportateur de fer FPT, ce qui entraîne sa dégradation, inhibant ainsi l'absorption intestinale du fer, son export cellulaire et la libération du fer par le système réticulo-endothélial(13).

Des processus physiologiques multiples sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du fer. Ceux-ci comprennent son stockage aux niveaux intracellulaires et extracellulaires. Le contrôle de la balance du fer dans l'organisme entier nécessite une communication entre les sites d'absorption, d'utilisation et de stockage. Les transporteurs de protéines clés et les molécules qui régulent leurs activités ont été récemment identifiés. La ferritine et l'hepcidine sont les principales protéines régulatrices. La régulation intracellulaire du métabolisme du fer est assurée par le système IRE/IRP (Iron Responsive Elements - Iron Regulatory Proteins) alors que la régulation systémique du métabolisme du fer est principalement sous dépendance de l'hepcidine (14).

2. Absorption intestinale du fer

L'absorption intestinal du fer alimentaire, présent soit sous forme héminique, soit non-héminique, est effectuée par les entérocytes matures des villosités du duodénum et du jéjunum proximal. Cette absorption est dépendante de la forme chimique du fer : le fer ionisé et le fer héminique sont très bien absorbés alors que le fer non héminique est peu absorbé. La vitamine C peut augmenter cette absorption(15,16).

2.1.Absorption intestinale du fer non Héminique

Pour pouvoir être absorbé par les entérocytes, le fer non héminique Fe (III) doit subir une réduction en Fe (II). La réduction est principalement réalisée par voie enzymatique par une réductase situé à la surface externe de la membrane apicale (dans les bordures en brosse de l'entérocyte) appelée duodéal cytochrome B (Dcyt B) réductase(17).Le fer étant un élément insoluble, il ne peut pas traverser les membranes cellulaires spontanément. Il existe un système complexe de transporteurs qui assure ce passage ; ces transporteurs sont différents, à la fois en fonction de la nature héminique ou non du fer et à la fois selon s'il est associé ou non à une protéine porteuse. L'identification de ces transporteurs et d'autres protéines qui interviennent dans l'absorption du fer alimentaire non héminique et héminique a hautement contribué dans l'amélioration de la compréhension de ce processus, qui est au centre du contrôle de l'homéostasie du fer(18).

Le Fe (II) est transporté grâce à un cotransporteur de proton nommé DMT1 (Divalent Metal Transporter 1, ou SLC11A2), une protéine de 70 kDa formée de dix domaines transmembranaires capable de transporter le fer Fe (II) couplé à un proton. Le DMT1 est un transporteur transmembranaire de cations divalents à large spectre tels que (fer, zinc, manganèse, cuivre, cobalt...), qui possède une plus forte affinité pour le fer. Le transport du fer via DMT1 est dépendant de certains facteurs comme le pH et est couplé à un transport de proton(19,20).

2.2.Absorption du fer Héminique

Le fer peut également être absorbé sous forme héminique. Le fer héminique présente une meilleure biodisponibilité si on le compare au fer non héminique, son absorption est plus d'autant efficace que celle du fer inorganique. Lors des régimes riches en viandes il peut devenir une source importante de fer (jusqu'à deux tiers des apports quotidiens). Malgré cela, les mécanismes par

lesquels l'hème est transporté et l'absorber au niveau digestif est toujours mal compris encore actuellement. Il semblerait, que le transport du fer organique se fait sans modification au travers de la bordure en brosse entérocytaire et que le catabolisme de l'hème serait intracellulaire, dépendant de l'hème oxygénase (HO-1) qui libère le fer ferreux(15).

L'importance de l'hème alimentaire comme source de fer dans le corps est indéniable, toute fois le mécanisme par lequel les entérocytes capturent le fer et le catabolisent est relativement inconnu. Dans les 2-3 heures qui suivent son absorption par endocytose médiée par des récepteurs, l'hème est dégradé à travers des vésicules d'internalisation. L'importance des hèmes oxydases (HO) localisées dans les entérocytes est maintenant établie. L'HO est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hémoglobine à l'aide du cytochrome P-450, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), et d'un oxygène moléculaire produisant du monoxyde de carbone (CO), du fer et de la biliverdine. Trois isoformes de HO ont été identifiées : une forme inductible (HO-1), qui est régulée notamment dans la rate et le foie en réponse à différents types de stress, et deux formes constitutives (HO-2 et HO-3)(21).

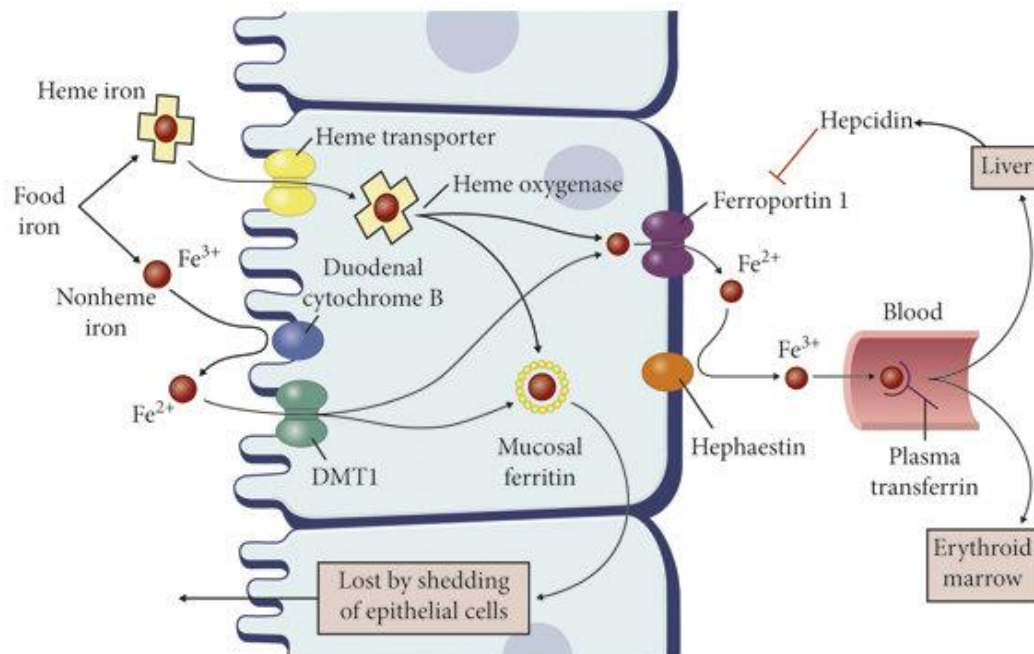


Figure 3 : Mécanismes de l'absorption intestinale du fer.

La majeure partie du fer est absorbée dans le duodénum et le jéjunum proximal en raison du pH acide du contenu intestinal. De plus, distalement dans le jéjunum, le pH devient neutre ou alcalin

et l'absorption du fer diminue. Fer alimentaire non hémique Fe^{2+} entre dans le pool de fer non hémique et le fer hémique entre dans le pool de fer hémique. Fe^{3+} est réduit à Fe^{2+} par le cytochrome B duodéal et pénètre ensuite dans la face luminale de l'entérocyte par la voie DMT-1 de l'importateur de fer. Fe^{2+} est transféré sur le côté basolatéral de l'entérocyte, expulsé par la ferroportine exportatrice de fer, puis oxydé en Fe^{3+} par l'héphaestine et transférée à la protéine porteuse transferrine dans le plasma sanguin. Une partie du fer pénètre dans le pool de fer ferritine intracellulaire et est perdue par desquamation de l'entérocyte dans les fèces. L'hepcidine du foie inactive la ferroportine, inhibant ainsi l'absorption du fer. Le fer hémique est absorbé dans l'anneau de protoporphyrine intact par une voie distincte impliquant éventuellement un transporteur d'hème et une hème oxygénase(22).

3. Fer dans la circulation/Transport du fer

Le fer passe dans la circulation grâce à la ferroportine (FPN), une protéine de 67 kDa et 12 domaines transmembranaires, codé par le gène SLC40A1. La FPN n'a aucune homologie avec DMT1 et est exprimée dans les macrophages où elle joue également un rôle primordial dans l'export du fer(23,24).

Le fer Fe(II) transporté par la FPN est ensuite oxydé en Fe(III) par une ferroxidase membranaire indispensable (Hephaestine ou cybrd1), avant d'être transféré et capté par la Tf plasmatique pour distribution aux cellules de l'organisme. Le complexe Tf-TfR est internalisé dans un compartiment endosomal unique où l'acidification de l'endosome conduit à la libération du fer ferrique. Le fer ferrique est ensuite réduit en fer ferreux et transporté à travers la membrane endosomale par DMT1. La réductase ferrique endosomale responsable de la réduction du fer ferrique dans les cellules érythroïdes a récemment été identifiée : steap3 (6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3)(25).

Le fer circulant dans le plasma n'étant pas soluble, il est lié à la transferrine, synthétisée par le foie. Cette protéine possède 2 lobes, chaque lobe pouvant fixer un atome de fer ferrique. Ainsi la transferrine peut transporter 2 molécules de fer ferrique de ses sites de libération, entérocytes et macrophages du système réticulo-endothélial, vers les tissus périphériques. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs spécifiques à la transferrine (RTf) permettant de capter le fer du plasma(26). La saturation de la transferrine varie en fonction du statut en fer de l'organisme est donc déterminée par l'absorption intestinale du fer, par le recyclage de fer

hémérique par les macrophages ainsi que par l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse. Dans les conditions physiologiques, la saturation de la transferrine est d'environ 30%-45% (27).

Lorsque la capacité de fixation de la transferrine est saturée, le fer peut apparaître dans le plasma sous une forme libre, sans être liée à la transferrine. Il se dépose ensuite dans les cellules par diffusion passive ou par l'utilisation d'un système de transport. Ceci peut entraîner une surcharge tissulaire, notamment au niveau du cœur et du foie, entraînant des dommages cellulaires(28).

4. Stockage du fer(29)

Après avoir été libéré dans le cytosol, le fer rejoint le pool de fer labile (LIP), qui est un pool temporaire de Fe^{2+} ferreux pouvant interagir avec des biomolécules intracellulaires. Le LIP ne représente que 3 à 5% du rendement cellulaire total et reflète le statut cellulaire. Parce que le fer libre est toxique pour les cellules, la majorité de celui-ci est stockée dans la ferritine.

Le stockage du fer dans les cellules nécessite qu'il soit associé à la ferritine, protéine de stockage qui protège la cellule de la toxicité du fer et qui est capable de le rendre disponible rapidement en cas de besoin. Les principales réserves en fer se trouvent dans le foie et dans la rate. Il existe également une ferritine mitochondriale qui possède une activité ferroxidasique indispensable à la captation du fer. Elle est exprimée dans les cardiomyocytes et aussi dans les neurones et les spermatozoïdes.

Bien que la ferritine soit une protéine principalement intracellulaire, sa fraction circulante plasmatique est proportionnelle au stock intracellulaire. Le dosage de la ferritine sérique permet ainsi l'évaluation des réserves en fer de l'organisme. Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'une augmentation de la ferritine. Par exemple, une surcharge en fer entraîne une augmentation de la concentration en ferritine aussi bien dans les cellules que dans le sérum, la synthèse de ferritine étant activée par le fer. La ferritinémie augmente également en cas d'inflammation, dans le syndrome métabolique.

4.1. Stockage du fer dans le foie

Le foie est le principal organe de stockage du fer. Dans des états de surcharge en fer génétiques associées à une augmentation de la saturation de la Tf, les hépatocytes deviennent le site majeur de dépôts de fer, entraînant des lésions tissulaires progressives, une cirrhose ou encore

un carcinome hépatocellulaire. Du fer non lié à la Tf (non-transferrin bound iron [NTBI]) peut apparaître dans le plasma lorsque la saturation de la Tf est supérieure à 80 % et ce NTBI serait transporté dans l'hépatocyte par le transporteur de cations divalents Zip 14.

Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie du fer puisqu'il est le siège de la synthèse d'hepcidine. Cette synthèse dépend de l'hémojuvéline (HJV) et des (bone morphogenic proteins) (BMP)(25).

4.2.Érythrophagocytose et stockage du fer dans les macrophages(30)

Les perturbations du recyclage du fer hémérique peuvent avoir des répercussions importantes et rapides sur la production des globules rouges. Un excès de recyclage du fer hémérique contribue à la surcharge en fer des parenchymes, alors qu'à l'inverse une rétention anormale de fer dans les macrophages est un élément important contribuant aux anémies des états inflammatoires.

Les macrophages tissulaires (ou cellules réticuloendothéliales) sont des cellules phagocytaires responsables de l'élimination des nombreux micro-organismes ainsi que de nombreuses particules. Par conséquent, ils sont également capables d'éliminer les globules rouges sénescents par un processus appelé érythrophagocytose. Cette capacité fait des macrophages les responsables majeurs du recyclage du fer et de sa redistribution à la moelle osseuse pour l'érythropoïèse.

La source principale des réserves en fer macrophagiques provient de la phagocytose des érythrocytes sénescents et du recyclage du fer à partir de l'hémoglobine. L'érythrophagocytose est une composante fondamentale de l'homéostasie du fer une fois elle permet le recyclage du fer hémérique (ferreux) nécessaire à l'érythropoïèse que rentre dans la production quotidienne de 200 milliards de nouveaux érythrocytes.

Environ 90 % des globules rouges qui sont éliminés dans la pulpe rouge de la rate, faisant de celle-ci, le site de dégradation des globules rouges le plus actif. Les 10 % restant subissent une hémolyse intravasculaire.

Dans les vésicules phagocytaires, l'hème est métabolisé par HO-1 libérant comme produits de dégradation du dioxyde de carbone, du fer et de la bilirubine. Une fois dans le cytosol, le fer est, soit stocké dans la ferritine, soit exporté vers l'extérieur de la cellule grâce au seul exporteur

FPN couplé à la céruloplasmine, une ferroxidase plasmatique. Soit exporté dans le plasma par la ferroportine où il va se lier à la transferrine pour être exporté vers ses sites d'utilisation. Les monocytes circulants peuvent également obtenir du fer à partir du plasma par la voie RTF1-DMT1, cette voie étant très minoritaire dans les macrophages tissulaires.

La quantité de FPN présente à la surface des macrophages dépend de nombreuses régulations intra- et extracellulaires et contrôle directement le recyclage du fer hémérique. Un excès de recyclage du fer hémérique contribue à la surcharge en fer des parenchymes, alors qu'à l'inverse une rétention anormale de fer dans les macrophages est un élément important contribuant aux anémies des états inflammatoires. Dans le macrophage la synthèse de FPN est stimulée au niveau transcriptionnel par l'hème, à travers la voie Bach1-Nrf2, parallèlement à l'activation de HO-1, en particulier au cours du processus d'érythrophagocytose. Après, le fer libéré lors de la dégradation de l'hème stimule la synthèse de FPN en inactivant les IRP. La quantité de FPN à la membrane du macrophage est contrôlée de façon systémique par l'hepcidine circulante. La fixation de l'hepcidine sur FPN entraîne son internalisation et dégradation par les lysosomes. La quantité de FPN à la membrane des macrophages joue donc un rôle majeur dans le contrôle de la disponibilité du fer pour l'érythropoïèse(31).

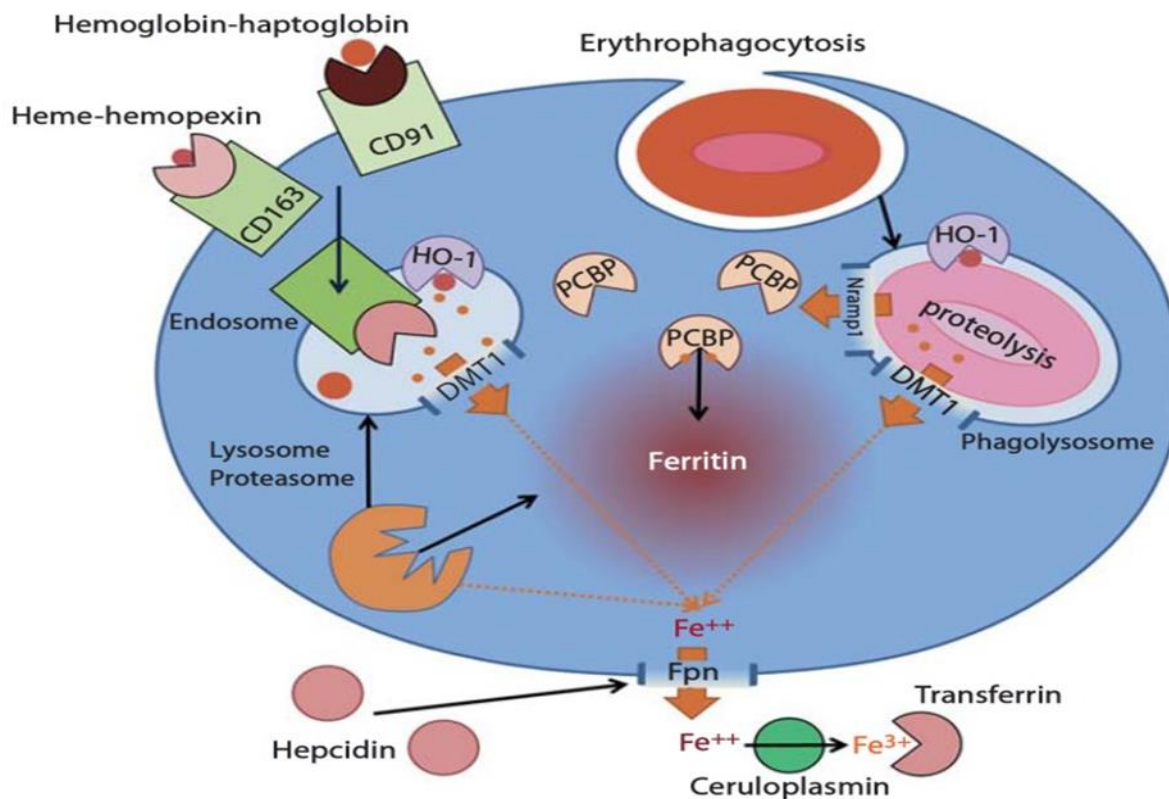


Figure 4: Flux du fer dans les macrophages

Les macrophages absorbent le fer par érythrophagocytose des érythrocytes endommagés ou sénescents. Les macrophages peuvent également piéger l'hème et l'hémoglobine, généralement complexés avec l'hémopexine et l'haptoglobine, respectivement, et endocytosés par CD163 et CD91, respectivement. Qu'elle soit phagocytée dans les érythrocytes ou endocytée par balayage, l'hémoglobine subit une protéolyse pour libérer l'hème. L'hème est dégradé par HO-1 pour libérer du fer, qui est exporté vers le cytoplasme par DMT1 et probablement aussi par Nrap1. Les chaperons cytoplasmiques de la famille des protéines de liaison poly(rC) (PCBP) fournissent du fer pour le stockage dans la ferritine. Alternativement, le fer des endosomes ou des phagolysosomes peut également être livré par un transporteur inconnu à la ferroportine (Fpn) pour exportation. Lorsque la demande en fer est élevée, la ferritine est dégradée par les lysosomes ou les protéasomes, et le fer ferreux libéré est exporté via la ferroportine. Le taux d'exportation du fer est contrôlé par l'hepcidine extracellulaire grâce à sa capacité à induire l'endocytose et la protéolyse de la ferroportine. La ferroxidase céruloplasmine oxyde le fer en sa forme ferrique et facilite ainsi l'exportation et le chargement du fer sur la protéine porteuse transferrine(31).

5. Régulation du métabolisme du fer

En raison de l'absence d'une méthode permettant de contrôler l'excrétion du fer, l'absorption intestinale et le stockage de ce métal est hautement régulée. Les mécanismes utilisés par l'organisme pour assurer cette minutieuse régulation comprennent, la modulation de la solubilité du fer dans la lumière intestinale ainsi que l'expression des transporteurs dans l'entérocyte par des facteurs alimentaires. Le fer étant un régulateur majeur, son apport élevé s'est avéré être un blocage pour l'absorption subséquente de fer. L'acide ascorbique en dehors de son action comme réducteur du fer ferrique en fer ferreux, peut être capable de contrôler l'expression des transporteurs et de la ferritine. Les glucides pourraient eux aussi réguler l'absorption du fer(32,33).

5.1.Régulation intracellulaire

L'homéostasie intracellulaire du fer est assurée grâce au facteur transcriptionnel sensible à l'hypoxie (HIF) et au système IRE-IRP (Iron Responsive Elements - Iron Regulatory Proteins), qui permet à la cellule selon la quantité de fer disponible, d'adapter l'entrée le stockage et la sortie du fer. Ce système est responsable du contrôle de l'expression post transcriptionnelle de plusieurs protéines intervenant dans le métabolisme du fer tels que RTF1 (récepteur 1 de la transferrine), DMT1, Dcytb et FPN et la ferritine. Permettant ainsi à la cellule de prévenir l'accumulation du fer toxique en augmentant par exemple le stockage du fer insoluble dans la ferritine et en diminuant l'entrée du fer dans la cellule médiée par RTf(25,34).

Lors des études ayant comme objectif une meilleure compréhension la régulation de l'absorption du fer à l'échelle cellulaire et moléculaire, l'identification de toutes ces protéines de transport, notamment DMT1, Dcytb et FPN, a été d'une grande importance. Le niveau d'expression de chacune d'elles est contrôlé par des multiples voies, dépendant de la composition en fer du régime alimentaire et des besoins de fer de l'organisme. En effet, il a été montré que la carence en fer induit l'expression simultanée de ces trois protéines par l'intermédiaire de l'isoforme HIF-2 alpha et augmente ainsi l'absorption intestinale du fer(25).

5.1.1. Rôle du système de régulation intracellulaire du métabolisme du fer IRE/IRP

Les IRE sont des motifs nucléotidiques en forme de tige-boucle d'environ 30 nucléotides, situés sur certains ARNm et reconnus par les deux protéines cytosoliques solubles : IRP1 et IRP2,

dont l'identité de séquence s'élève à 56 %. Les IRP sont des protéines régulatrices qui jouent un rôle de senseur de fer et dont l'activité varie selon la concentration intracellulaire en fer. Ces 2 protéines IRP1 et IRP2 sont exprimées de façon ubiquitaire. L'IRP1, qui est constitutivement présente, est une enzyme bifonctionnelle ; lorsque le fer intracellulaire est abondant, elle acquiert un centre [4Fe-4S] (ou ISC [Iron-Sulfur Cluster]) dans son site actif et exerce une activité d'aconitase cytosolique (catalysant la conversion du citrate en isocitrate). En cas de déficience en fer, IRP1 perd son ISC et acquiert une affinité pour les motifs IRE. IRP2 ne contient pas de site de fixation ISC, mais elle est rapidement dégradée au niveau du protéasome en présence d'un excès de fer(34).

5.1.2. Régulation systémique de l'absorption intestinale

Outre la régulation locale de l'absorption du fer, l'absorption intestinale du fer est principalement régulée négativement par l'hepcidine, baptisée l'hormone du fer. L'hepcidine qui permet aux différents organes consommateurs de fer de communiquer en vue de maintenir l'homéostasie du fer, est synthétisée majoritairement par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma. Découverte initialement comme un peptide antibactérien antimicrobien cationique (PAM), cette hormone s'est montrée être un régulateur majeur de l'homéostasie du fer et fait partie de la famille des défensines, peptides antimicrobiens à structure riche en résidus cystéines. Les PAM sont des antibiotiques naturels capables de tuer une variété des souches bactériennes toutes fois, le pouvoir antimicrobien de l'hepcidine est faible. C'est pourquoi le dosage de l'hepcidine a été lent à se développer. Obtention d'un anticorps anti-hepcidine a été très difficile vu sa structure repliée, et moyennement conservée entre les différentes espèces animales. Ce qu'explique pourquoi le développement des techniques de dosage de l'hepcidine a été lent(25,35,36).

L'hepcidine est sécrétée dans la circulation sanguine face à des conditions de surcharge en fer, d'infection, ou d'inflammation. L'inactivation du gène HAMP (Hepcidine Antimicrobial Peptide) conduit à une surcharge martiale. L'importance de l'hepcidine dans la régulation du métabolisme du fer a été mise en évidence initialement, dans les situations de surcharge en fer (25,36).

Pour inhiber le transport du fer l'hepcidine agit sur la ferroportine, protéine présente dans membrane des macrophages, hépatocytes et entérocytes. La ferroportine est la seule protéine connue permettant l'export du fer depuis le cytosol vers l'extérieur des cellules,(37) entraînant une

diminution de son absorption et une augmentation de sa rétention dans les macrophages et les cellules de Kupffer. De ce fait, l'hepcidine bloque la sortie du fer des cellules : au niveau entérocytaire, en limitant l'absorption digestive du fer, bloquant la sortie du fer des entérocytes, et au niveau macrophagique, en limitant le recyclage du fer héminique (bloquant la sortie du fer depuis les macrophages tissulaires). Le mécanisme par lequel l'hepcidine régule négativement la sortie du fer de la cellule vers le plasma a été bien étudié dans les macrophages, où l'hepcidine se fixe sur la FPN et entraîne son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes(25,36). Cette dégradation provoquera ainsi la diminution de l'expression de ferroportine sur la membrane et en conséquence la capacité des cellules à exporter le fer(38).

D'autres facteurs humoraux peuvent aussi moduler l'absorption intestinale du fer. De ce fait l'érythropoïétine (EPO), semble être capable de moduler l'absorption du fer, indépendamment de l'hepcidine. Certaines cytokines inflammatoires et adiponectines peuvent aussi agir au niveau de l'absorption du fer.

Au niveau de l'intestin, dans les cellules duodénales, plusieurs travaux récents ont fait état d'un mécanisme différent, où l'hepcidine agit en plus sur la DMT1 apicale et entraîne son internalisation puis sa dégradation via le protéasome. Démontrant ainsi, que l'hepcidine entraînerait dans un premier temps une diminution de l'expression de DMT1 plutôt que celle de la FPN. La régulation de la synthèse de l'hepcidine est trop complexe. Réalisée à l'état basal de même qu'en conditions pathologique, elle répond à de multiples signaux, certains d'entre eux encore mal compris. A l'état basal cette régulation est assurée par l'hémojuvéline, protéine transmembranaire fortement exprimée dans le muscle squelettique et le foie. Une étude faite sur les souris transgéniques montre, une augmentation permanente de l'hepcidine, induit une disparition complète de FPN à la membrane entérocytaire(25,36).

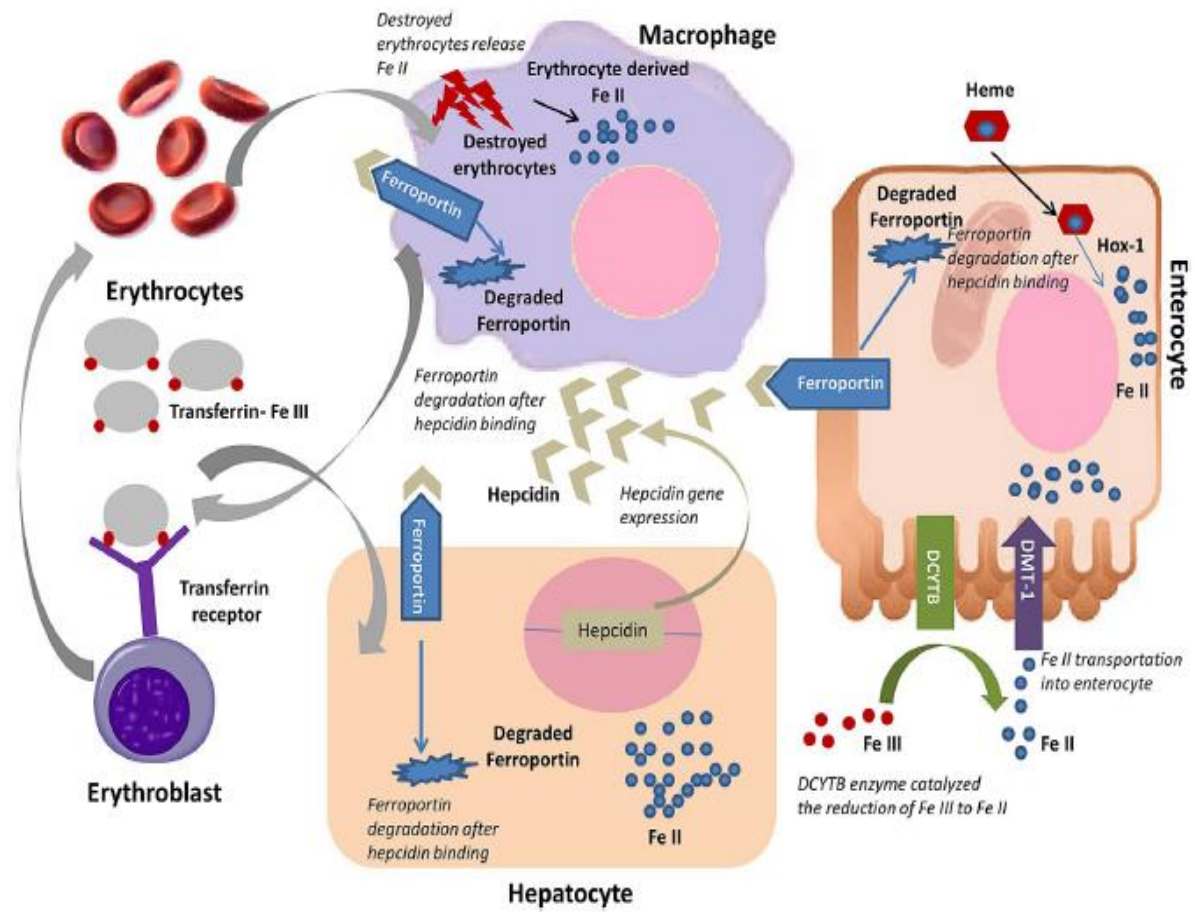


Figure 5 : Régulation systémique du fer dans l'organisme (39)

5.2.Régulation de la synthèse de l'hépcidine

On distingue 4 grandes axes régulateurs de l'hépcidine : les niveaux de fer (surcharge ou carence), inflammation et l'érythropoïèse. La synthèse de l'hépcidine est stimulée par des apports importants de fer et par l'inflammation et réprimée par la carence en fer et par toutes les situations qui stimulent l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse (anémie, saignements, hémolyse, dysérythropoïèse et injections d'érythropoïétine)(28).

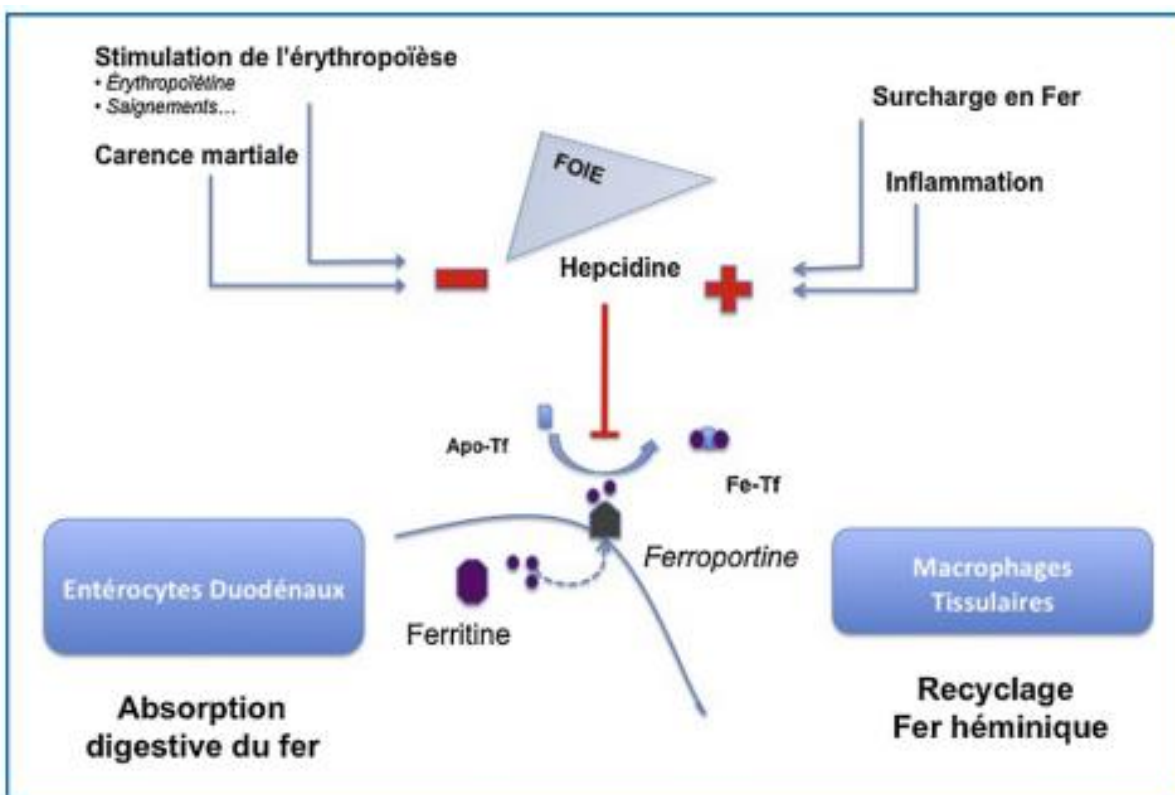


Figure 6 : Rôle et régulation de la synthèse de l'hépcidine.

L'hépcidine a pour cible la ferroportine, seule exporteur connu du fer cytosolique. L'hépcidine est donc une hormone hyposidérémiante. La synthèse de l'hépcidine est induite par la surcharge en fer et l'inflammation, et réprimée par la carence et la stimulation de l'érythropoïèse(36).

Ci-dessous une image permettant de résumer le métabolisme du fer

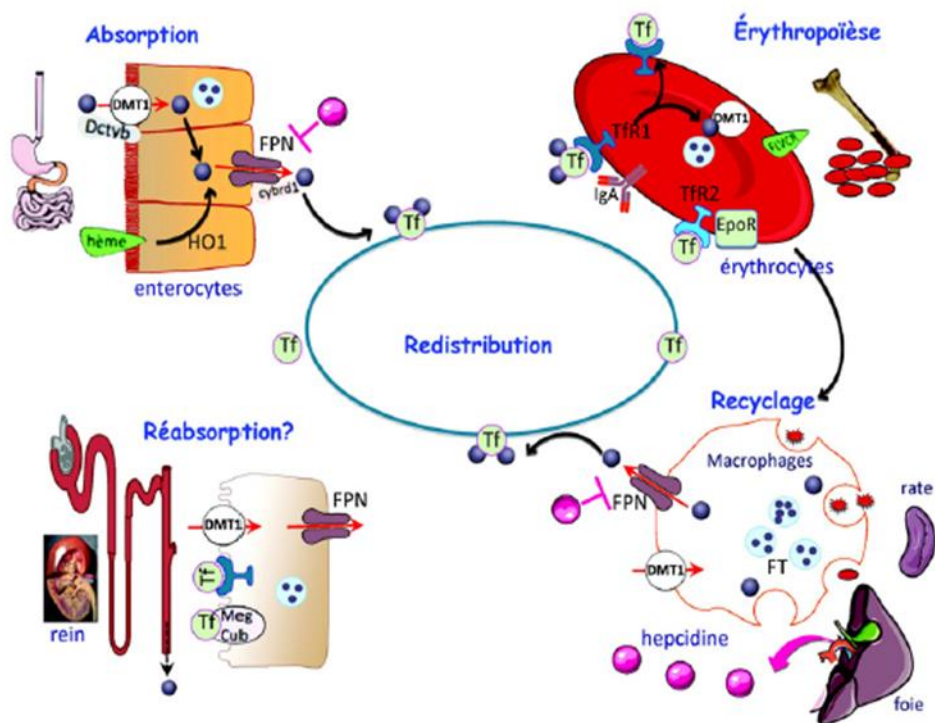


Figure 7: Le métabolisme du fer fonctionne comme un circuit fermé.

L'intestin absorbe le fer à partir des aliments et les macrophages stockent et recyclent le fer après phagocytose des globules rouges en fin de vie. Le fer dans la circulation est redistribué grâce à la Tf aux tissus cibles, notamment la moelle osseuse pour la maturation des précurseurs érythropoïétiques. Très peu de fer est filtré par le glomérule rénal, ce fer est totalement réabsorbé le long du néphron. cybrd1 : Héphesties ; DMT1 : co-transporteur Fe(II)-proton ; Dcyt B : duodéal cytochrome B ; EpoR : récepteur de l'érythropoïétine ; FPN : ferroportine ; FT : ferritine ; HO-1 : hème oxygénase 1 ; Meg/Cub : le complexe mégaline/cubuline ; Tf : transferrine ; TFR1/2 : récepteur de la transferrine 1/2 (25).

6. Variations pathologiques associées au métabolisme du fer

6.1. Anémie Ferriprive

Différents types d'anémies existent dans le monde, l'anémie ferriprive est la plus courante et la plus traitable de toutes les anémies. Elle est dû à un à un manque de fer en quantité suffisante pour former des globules rouges normaux. Le patient ayant une anémie ferriprive en raison d'une carence en fer peut développer des symptômes indépendants de l'anémie et peuvent être associés à diverses autres maladies. Ci-dessous un algorithme décisionnel permettant le diagnostic entre les anémies microcytaires, normocytaires, et macrocytaires (40,41).

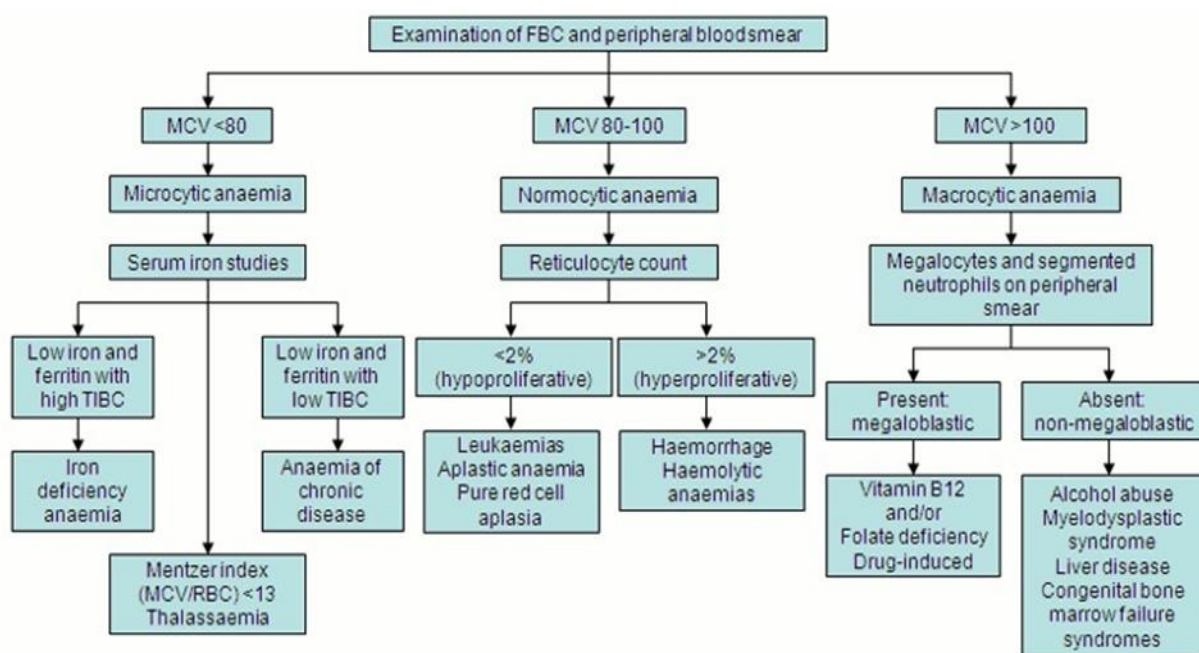


Figure 8: Algorithme d'approche clinique de l'anémie (42)

6.1.1. Etiologie

Afin d'évaluer les causes de l'anémie une analyse complète du sang, hémogramme, frottis périphérique, numération des réticulocytes et indices de fer sérique est nécessaire. La gravité de l'anémie est basée sur le taux d'hémoglobine/hématocrite du patient.

Les conditions pouvant entraîner à une anémie ferriprive varient selon le degré de développement du pays. Dans les pays en développement, la faible biodisponibilité du fer dans l'alimentation est la principale cause d'anémie ferriprive. Cependant, dans les pays développés, la perte de sang le plus souvent due aux menstruations ou à des saignements gastro-intestinaux et la

diminution de l'absorption du fer expliquent les étiologies les plus probables de la carence en fer. Les femmes sont le sujet à plus grand risque plus grand de développer une carence en fer en conséquence des pertes de fer obligatoires pendant la menstruation. La menstruation excessive est l'étiologie la plus retrouvée de l'anémie ferriprive chez les femmes préménopausées(41,43).

La perte de sang chronique des voies génito-urinaires, gynécologiques ou gastro-intestinales représente la majorité des causes d'anémie ferriprive. La perte gastro-intestinale est la deuxième source majeure de carence en fer, que le saignement soit aigu ou chronique. Les lésions gastro-intestinales entraînent une carence en fer par une perte de sang progressive sur de longues périodes de temps. La réponse physiologique de l'intestin grêle aux saignements consistera à augmenter l'absorption du fer de deux à trois fois par une régulation positive des protéines du cytochrome b duodénal, du transporteur de métal divalent 1, de la ferroportine et une régulation négative de l'hepcidine. Cependant cette réponse compensatoire n'est pas valable en présence d'une perte en fer supérieure à 5 mg/jour sur une période de temps prolongée car les réserves de fer du patient s'épuiseront et une anémie ferriprive s'ensuivra. Les saignements gastro-intestinaux chroniques sont associés à diverses lésions et peuvent apparaître à n'importe quel endroit du tractus gastro-intestinal. L'anémie ferriprive est particulièrement susceptible de se produire chez les personnes qui prennent de l'aspirine ou des anti-inflammatoires non stéroïdiens de façon chronique. Le cancer du côlon est la tumeur la plus fréquente, suivi des lésions des voies supérieures, telles que le cancer gastrique. Les tumeurs de l'intestin grêle sont rares et ne sont généralement pas dépistées, sauf en cas de carence en fer réfractaire ou de saignement (41,43).

Une diminution de l'absorption du fer peut également être le résultat d'une gastrite atrophique ou de syndromes de malabsorption, notamment la maladie cœliaque. Environ 10 à 40 % des patients présentant des saignements gastro-intestinaux occultes, la cause reste obscure.

6.1.2. Diagnostic en laboratoire de l'anémie ferriprive

Le diagnostic de laboratoire comprend plusieurs tests, dont chacun nécessite un certain degré d'interprétation pour être appliqué avec précision. Chacun de ces tests fournit des informations importantes mais doit être interprétés dans le contexte clinique dans lequel ils se trouvent et tous ne sont pas facilement disponibles, selon l'instrumentation du laboratoire clinique produisant les résultats. Les outils de diagnostic comprennent un interrogatoire, une analyse des marqueurs biologiques hématologiques et ceux associés à une carence martiale.

L'anémie ferriprive est caractérisée par (44):

- Un faible taux d'hémoglobine (<13g/dl chez l'homme et < 12g/dl chez la femme),
- Des érythrocytes microcytaires et hypochromes,
- Un volume globulaire moyen inférieur à 80 fl
- La concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CCMH) entre 32% - 36%
- Des faibles réserves de fer,
- Un faible taux de fer sérique
- Une faible ferritine sérique (<30 ng/l),
- Une faible saturation de la transferrine
- Une capacité totale de fixation du fer élevée.

Le ferritine sérique (ou, plus exactement, l'apoferritine), est la protéine du plasma qui reflète les réserves de fer de l'organisme dans des circonstances normales. Cette protéine est d'une importance cruciale dans le diagnostic des anémies microcytaires. Néanmoins le taux de ferritine peut être trompeur une fois qu'en présence d'inflammation aiguë ou chronique, ou d'une lésion hépatocellulaire, ce taux est normalement élevé, rendant l'interprétation des niveaux de ferritine problématique. Cependant lorsque le niveau de ferritine sérique est normal ou même élevé en présence d'un processus inflammatoire on ne peut donc pas exclure une carence en fer comme cause d'anémie. Si l'inflammation peut être exclue, le niveau de ferritine est un reflet pratique des réserves de fer. Un faible taux de saturation de la transferrine, combiné à une faible ferritine sérique (<15-25 ng/mL, selon le laboratoire) confirme le diagnostic de la carence en fer. À toutes fins utiles, un faible niveau de ferritine n'est observé qu'avec une carence martiale (40,43).

En présence d'une infection ou d'une inflammation sous-jacente, le praticien fera appel à d'autres marqueurs du fer tels que la teneur en hémoglobine des réticulocytes et la mesure du récepteur soluble de la transferrine. . Lorsque tout le reste échoue et qu'il est important d'établir s'il existe une carence en fer, on aura recours à la coloration de Perls qui est la démonstration de l'absence de fer colorable via une biopsie de la moelle osseuse(43).

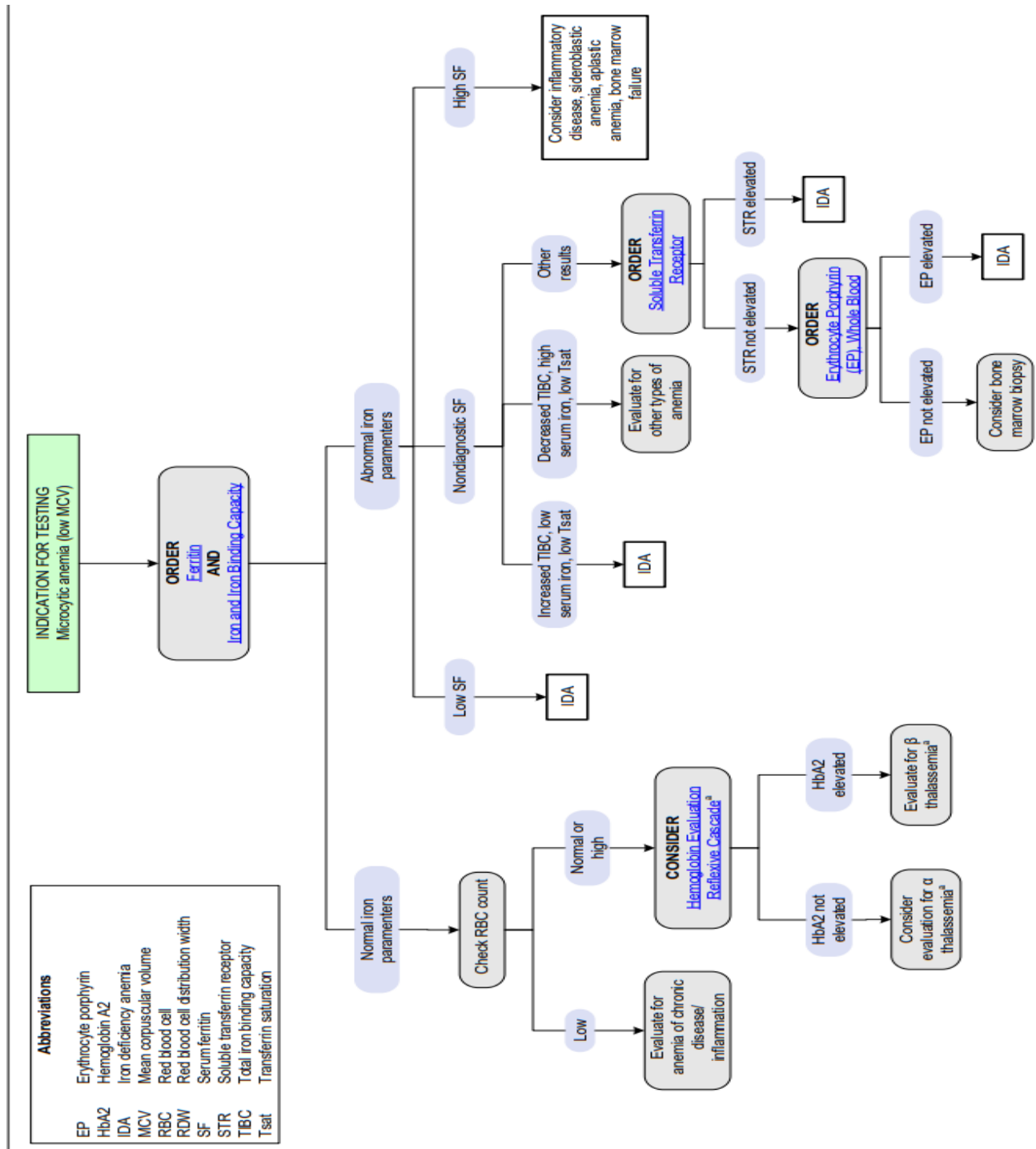


Figure 9: Algorithme décisionnel pour le diagnostic des anémies microcytaires(45)

6.1.3. Epidémiologie

6.1.3.1. Au niveau Mondiale

En 2019, il y avait 1,8 milliard cas prévalents d'anémie dans le monde (46). La prévalence de l'anémie augmente avec l'âge et en milieu hospitalier. L'anémie diminue la capacité de travail et augmente les coûts des soins de santé. La carence en fer est associée, à une diminution de la qualité de vie, à la fatigue, à une altération de la fonction cognitive et à l'infertilité, qui peuvent tous survenir en l'absence d'anémie et peuvent être inversés avec un traitement par le fer(47).

Dans les pays hautement développés la prévalence de l'anémie était de 9%, différemment des pays en voie de développement où la prévalence s'élevait à 43%. La carence en fer est la principale cause d'anémie dans tous les pays et chez les deux sexes, les femmes étant plus fréquemment atteintes. Les femmes en âge de procréation et les enfants sont des sujets à plus grand risque, vu leurs besoins accrus en fer. Ce besoin est commun comme chez les enfants pendant la croissance et chez les jeunes femmes pendant l'âge fertile, du aux règles et à des grossesses (48). Chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes en âge reproductif et les femmes enceintes la prévalence est de 42%, de 47% et de 38 % respectivement. Dans les pays à revenu élevé également, les enfants et les femmes, en particulier les femmes enceintes, restent les principales catégories à risque. L'anémie ferriprive peut coexister avec d'autres anémies nutritionnelles, en particulier dans les pays en développement ou chez les personnes âgées(41,49,50) .

En 2019, la prévalence ponctuelle de l'anémie normalisée selon l'âge (pour 100 000 habitants) était la plus élevée en Asie du Sud 41 646,1, ensuite on retrouve l'Afrique subsaharienne occidentale 40 977,0 et Afrique subsaharienne centrale 36861,4. L'Europe de l'Ouest 4880,1, l'Australasie 6765,7 et l'Amérique du Nord à revenu élevé (6920,0)(46).

La prévalence ponctuelle nationale de l'anémie normalisée selon l'âge variait de 3 118,0 à 49 327,1 cas pour 100 000 habitants. La Zambie 49327,1 le Mali 46 890,1 et le Burkina Faso 46 117,2 avaient les taux de prévalence ponctuelle d'anémie les plus élevés en 2019. En revanche, La France 3118,0 , l'Islande 3622,1 et la Belgique 3778,9 avaient les taux les plus faibles (46).

6.1.3.2. Au Maroc

Au Maroc, comme dans tous les pays en voie de développement, l'anémie représente le problème de santé le plus fréquent, malgré l'amélioration des conditions de vie, de la disponibilité alimentaire, l'accroissement du taux d'instruction des femmes, le développement de l'accès aux soins, l'encouragement de la planification familiale et les efforts déployés dans le domaine de la santé maternelle en général(51). Le Maroc est parmi les pays les plus touchés par l'anémie selon l'étude réalisée par le Ministère de la Santé, elle affecte tous les groupes d'âges de la population, avec une prédominance chez les femmes et les enfants avec de grandes disparités selon les zones géographiques. La prévalence de l'anémie et surtout de l'anémie ferriprive est élevée chez les différentes catégories de la population étudiée : elle est de 25% chez les femmes enceintes, de 21% chez les enfants de moins de 5 ans et de 12 % chez les hommes.

Connaitre la prévalence et la sévérité des carences au niveau de chaque région est nécessaire pour développer des stratégies d'intervention adaptées aux contextes locaux et régionaux, car elle est source de complications pendant la grossesse et peut être à l'origine de décès maternels par aggravation de l'hémorragie du postpartum(52). (Tableau I)

Tableau I : Prévalence de l'anémie selon l'âge et le milieu de résidence selon une enquête du ministère de santé faite en 2012(52)

Catégorie	Pourcentage national (%)	Pourcentage urbain (%)	Pourcentage rural (%)
Enfants entre 6 mois et 5 ans	31,6	31,6	31,1
Femmes en âge de procréation	33	33,9	31,9
Femmes enceintes	37,2	34,8	39,5

6.2. Anémie de maladie chronique ou anémie d'inflammation

L'anémie des maladies chroniques ou l'anémie inflammatoire est une anémie modérée, généralement observée chez les patients atteints d'affections pathologiques cliniquement pertinentes telles que le cancer, les infections chroniques, les maladies auto-immunes, l'IRC et en général dans toutes les affections caractérisées par une production persistante et élevée de pro -des cytokines inflammatoires. La production de cytokinines inflammatoires tels que d'IL-6, IL-1beta et IL-22 augmente l'expression de l'hepcidine, provoquant une dégradation de la ferroportine, une

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

diminution de l'absorption intestinale du fer, une rétention du fer dans les macrophages et une érythropoïèse restreinte en fer. Pour cette raison, la ferritine sérique est généralement élevée, tandis que la saturation de la transferrine est diminuée. L'anémie reflète la gravité de la maladie basale et s'inverse lorsque la maladie basale est traitée avec succès. Cependant, une véritable identification peut se développer dans le même contexte, remettant en cause le diagnostic correct. Elle se caractérise par (44):

- Une ferritine normale ou élevée,
- Un fer sérique bas,
- Une transferrine ou une capacité de fixation de la transferrine diminuée,
- Un coefficient de saturation de la transferrine normal ou diminué (mais moins élevé qu'en cas de carence martiale),
- Des récepteurs solubles de la transferrine normaux

Ci-dessous un algorithme permettant de distinguer une anémie ferriprive, inflammatoire ou mixte.

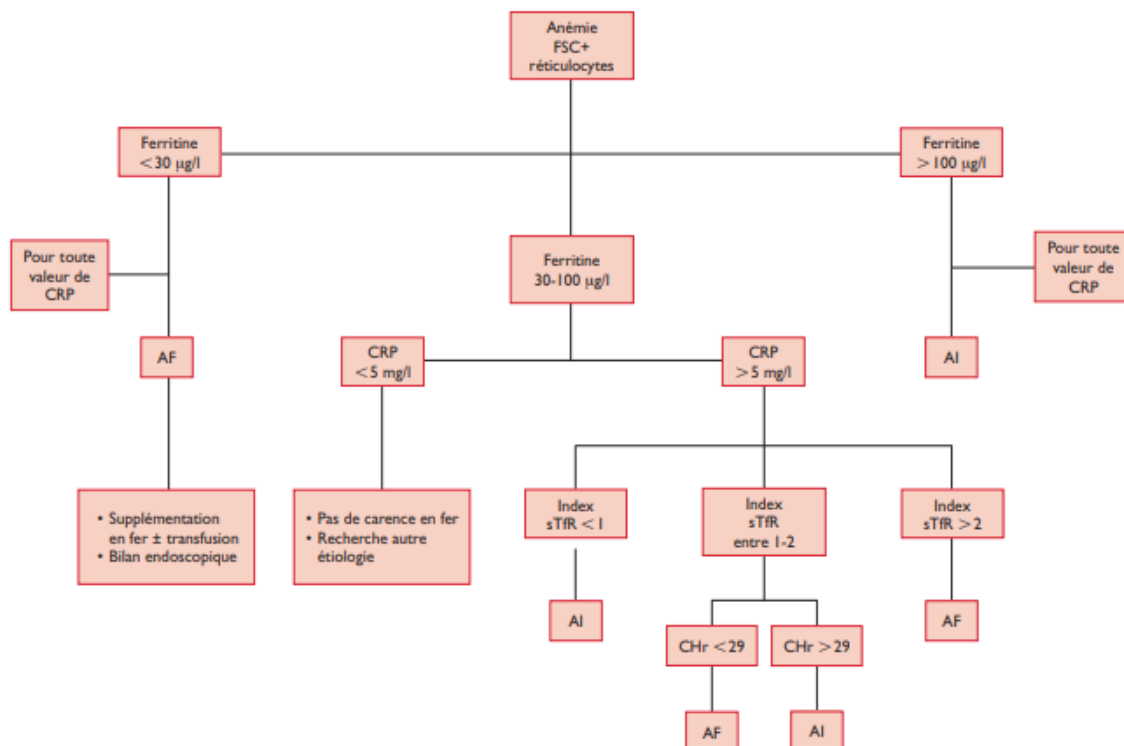


Figure 10: Algorithme décisionnel permettant de distinguer une anémie ferriprive, inflammatoire, ou mixte(53)

Anémie : F l 120 g/l, H l 140 gl ; FSC : formule sanguine complète ; AF : anémie ferriprive ; AI : anémie inflammatoire ; index sTfR : index des récepteurs solubles à la transferrine ; CHR : contenu en Hb des réticulocytes.

6.3.Surcharge martiale

6.3.1. Hémochromatose

L'hémochromatose est un trouble de l'homéostasie du fer plus fréquente chez les Caucasiens, et que se traduit par une absorption excessive du fer aboutissant à une surcharge en fer organique. Au fil du temps, cet excès de fer conduit à un état de "suraccumulation de fer", qui est toxique. Surtout chez les patients homozygotes, la maladie peut présenter des symptômes cliniquement significatifs. Si elle n'est pas traitée à temps, l'hémochromatose héréditaire peut être mortelle. Ce trouble peut être divisé en trois groupes, selon les nombreuses causes qui ont été identifiés : l'hémochromatose héréditaire ou primaire (dérégulation de l'absorption du fer), l'hémochromatose acquis ou secondaire (anémies de surcharge en fer, surcharge en fer parentérale, maladie hépatique) et l'hémochromatose du a des causes diverses. L'une des particularités des irrégularités du taux de fer est que la suraccumulation est lente et asymptomatique(39,54).

L'hémochromatose a été mentionné pour la première fois par Trousseau en 1865 et Troisier en 1971, lorsqu'ils ont cité des cas d'autopsies des patients diabétiques présentant des caractéristiques d'accumulation de fer, et des lors des nombreux études ont permis de comprendre la physiopathologie sous-jacente. L'expression hémochromatose n'a été définie qu'en 1889 par Von Recklinghausen, un pathologiste allemand (55,56).

6.3.2. Hémochromatose héréditaire

L'hémochromatose héréditaire est une maladie génétique généralement caractérisée par un stockage excessif du fer total dans l'organisme. Initialement l'hémochromatose héréditaire était associée à une augmentation des dépôts de fer dans les tissus organiques, entraînant une cirrhose, une insuffisance cardiaque, du diabète, de l'arthrite et un risque élevé de carcinome hépatocellulaire (CHC).

L'hémochromatose héréditaire (HH) est associée à des mutations génétiques, liées ou non au gène HFE et divisées en plusieurs sous-types, et c'est ne qu'en 1935 que Sheldon a défini l'origine de la maladie comme héréditaire. En 1996, Feder et al ont publié un article montrant

qu'ils avaient identifié une mutation du gène HFE, sur le bras court du chromosome 6p21.3 (55). Il s'agissait d'une mutation faux-sens de la guanine en adénine (G en A) en position nucléotidique 845 dans la séquence du gène et qui provoque une substitution de la tyrosine par la cystéine en position 282 dans la séquence des acides aminés de la protéine (C282Y). Par la suite, deux mutations supplémentaires ont été découvertes l'aspartate pour l'histidine (H63D) et la cystéine pour la sérine (S65C). La première respectivement est un changement de cytosine en guanine (C à G) en position nucléotidique 187 qui provoque une substitution d'acide aspartique (D) en position 63 dans la séquence des acides aminés pour l'histidine (H63D). La deuxième est due à la cystéine (C) substituée à la sérine (S) en position 65(S65C) dans la séquence des acides aminés. La forme la plus courante de l'hémochromatose héréditaire lié au gène HFE est associé à la mutation homozygote C282Y, et moins souvent hétérozygotes composés avec C282Y/ H63D ou C282Y/S65C. Ces deux mutations génétiques supplémentaires ne sont généralement pas à l'origine d'une surcharge en fer, à défaut qu'ils ne soient combinés avec une mutation C282Y formant un composé hétérozygote (c'est-à-dire C282Y/H63D ou C282Y/S65C) ou en conjonction avec des raisons secondaires de surcharge en fer telles que les maladies chroniques du foie. L'hémochromatose héréditaire non liée au gène HFE associée est rare, représentant moins de 15 % des surcharges en fer héréditaires, contre les 80% correspondant à celles liées au gène HFE. La pénétrance du gène homozygote C282Y est variable et donc toutes les personnes porteuses du génotype n'exprimeront pas la maladie(54,56).

6.3.2.1. Classification de l'hémochromatose héréditaire

Il existe 4 principaux types de HH qui ont été classés en fonction des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer qui sont affectées :

a. Hémochromatose héréditaire (TYPE 1, HFE1,)

L'hémochromatose de type 1 est liée à des mutations du gène HFE. Des plusieurs types de mutations identifiées dans ce gène les plus fréquentes sont C282Y, H63D et S65C.

L'HH de type 1 est la forme héréditaire de surcharge en fer la plus fréquente, elle se transmet de manière autosomique récessive. La mutation la plus courante est liée à la protéine (C282Y) et correspond à une transition de G à A au niveau du nucléotide 845 du HFE. Un autre sous-type génétique connu est la mutation H63D, qui elle seule ne provoque pas de surcharge en fer significative mais peut agir comme cofacteur de l'expression phénotypique de la surcharge en

fer, lorsqu'il elle est en association avec C282Y. Ce génotype de C282Y/ H63D est classé comme HH de type 1b ou hétérozygote composé. Les hétérozygotes composites peuvent avoir des indices de fer accrus, y compris la saturation en fer de transfert (TS) et les taux de ferritine sérique (SF) ; toutefois, la pénétrance pour développer une surcharge en fer cliniquement significative est rare chez les patients atteints de ce génotype (0,5 % à 2 %), sauf si on est en présence des cofacteurs tels que l'alcool ou le virus de l'hépatite C (VHC). Les patients homozygotes ou hétérozygotes pour la substitution H63D sont épargnés du risque accru de développer une surcharge en fer clinique par rapport à ceux sans cette mutation, bien qu'ils puissent toujours présenter une élévation des taux de TS et de SF. Un tiers HFE génotype, connu sous le nom de type 1c, est lié à la mutation S65C. La mutation S65C peut entraîner une augmentation des taux sériques de fer et de ferritine, mais n'a pas été associée à un excès de réserves de fer dans les tissus et peut donc être considérée comme un polymorphisme sans signification clinique (57). A la fin du 19e siècle, la triade de symptômes d'hémochromatose héréditaire (HH) a été signalé pour la première fois, cette triade se caractérisait par une glycosurie, la pigmentation cutanée cuivrée et la cirrhose du foie. L'HH est décrite comme l'un des principaux syndromes de surcharge en fer attribués à des variantes génétiques dans les gènes liés au métabolisme du fer.

b. Hémochromatose de type IIa et IIb

Les hémochromatoses de types IIA et B sont également appelés d'hémochromatose juvénile, elles sont autosomiques récessive et sont associées à des mutations dans deux gènes différents : il s'agit des variations pathogéniques du HJV gène (type 2A) qui code pour l'hémojuvéline ou des variations pathogéniques dans la protéine antimicrobienne hépatique (HAMP) Heparin Antimicrobial Peptide gène (type 2B), conduisant à un déficit en hepcidine. Cette mutation a tendance à conduire à la forme la plus grave de surcharge en fer primaire, survenant principalement chez les personnes plus jeunes qui vont présenter des symptômes cliniques généralement avant l'âge de 30 ans(39,57). Ces personnes présenteront des manifestations cliniques plus graves avec un tableau sévère de l'hémochromatose. L'évolution de la maladie sera rapide, et affectera principalement les hépatocytes, les glandes endocrines et les cellules cardiaques. Le type IIA est dû à une mutation dans le bras court du chromosome 1q21 du gène de l'hémojuvéline (HJV) tandis que dans le type IIB, il y a une mutation dans le chromosome 19q31 du gène de l'hepcidine (HAMP) (55).

c. Mutation du récepteur de la transferrine (TYPE 3)

L'hémochromatose de type III survient dans le gène du récepteur 2 de la transferrine (RTF2), situé sur le bras long du chromosome 7q22, où les mutations Y250X et Q690P ont été observées, entraînant également une carence en hepcidine. TRF2 est exprimé dans les cellules hépatiques, il est lié à l'absorption hépatique du fer, et à un rôle régulateur lié à la transferrine, lorsqu'il est muté, réduit la synthèse de l'hepcidine, qui régule la ferroportine. Comme conséquence le fer sera moins stocké sous forme de ferritine et il aura une augmentation conséquente du fer sérique(55) .

L'hémochromatose héréditaire de type 3 se manifeste à un âge plus jeune et affecte les personnes âgées entre 30 et 40 ans. A ce stade elle est similaire à l'hémochromatose juvénile, cependant avec une progression plus lente. Les symptômes sont similaires à ceux de l'hémochromatose HFE(39) .

d. Mutation ferroportine (TYPE 4)

Le type 4AHH, également connu sous le nom de maladie de la ferroportine, est la seule forme autosomique dominante d'hémochromatose caractérisée par des mutations du gène SLC40A1 qui produit la ferroportine (FPN1). Il existe plusieurs mutations (A77D, V162del, D157G, N174I, Q182H et G323V) qui sont liées à ce type d'hémochromatose. Le type 4B HH est une surcharge en fer due à la résistance de FPN1 à l'hepcidine (55,57). La maladie de la ferroportine entraîne des évolutions différentes de l'hémochromatose, selon le type de mutation, elle peut présenter des caractéristiques cliniques similaires à l'hémochromatose de type I, et contrairement aux types 2 et 3, survient à l'âge adulte. L'hémochromatose de type 4 est subdivisée en 2 types. Le premier est caractérisé par une baisse saturation en transferrine avec une accumulation de fer dans les macrophages provoquant une légère anémie due à la réduction de l'exportation de fer vers la circulation sanguine, rendant ainsi impossible le traitement par saignée. Le deuxième est le sous type B, on observe une grosse saturation en transferrine avec une accumulation de fer dans les hépatocytes (58). Des mutations dans ce gène entraînent une altération de l'exportation du fer, avec un dépôt de fer noté dans les hépatocytes et dans les cellules réticulo-endothéliales, plutôt que parenchymateuses (39,56).

Dans cette condition, on observe une rétention de fer intracellulaire avec de faibles niveaux de fer plasmatique et des niveaux normaux ou faibles de TS mais des niveaux élevés de fer sérique

et de la ferritine (57,58). Les tests génétiques pour toutes ces mutations sont souvent indisponibles dans le cadre clinique, en particulier pour la mutation du gène SLC40A1. La biopsie hépatique peut être un outil de diagnostic utile chez les patients atteints d'HH non HFE pour déterminer l'étendue de la surcharge en fer et sa distribution. À l'heure actuelle, il n'existe aucune recommandation pour dépister les patients HH non liés à HFE (56).

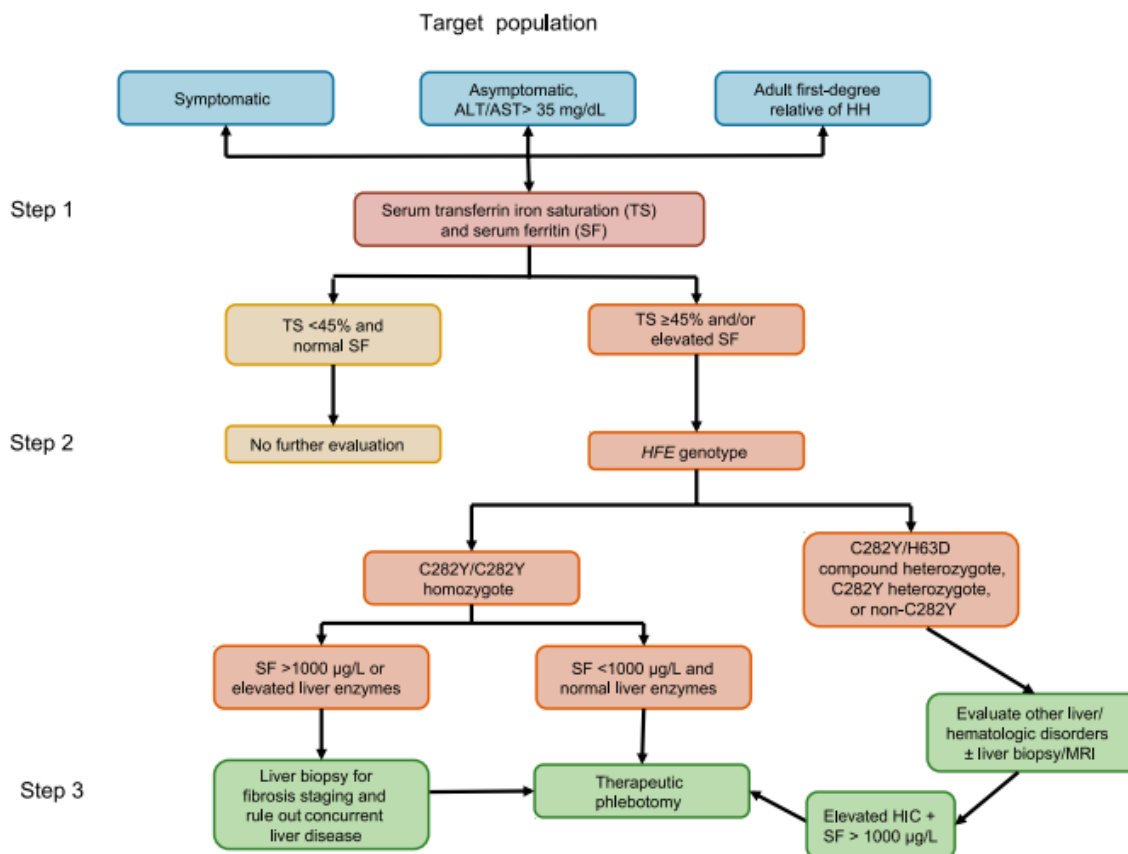


Figure 11 : Algorithme concernant le diagnostic et le traitement de l'HH

Étape 1 : Chez le patient suspecté d'HH en raison de symptômes, d'enzymes hépatiques élevées ou d'antécédents familiaux, le test de dépistage initial suggéré doit être le niveau de TS (serum transferrine iron saturation), le coefficient de saturation de la transferrine et SF (serum ferritin), la ferritine sérique. Étape 2 : Si TS est de 45 % et que SF est normal, aucune évaluation supplémentaire n'est nécessaire. Si TS est de 45 % et que SF est élevée, HFE des tests génétiques doivent être effectués. Étape 3 : Tous les patients homozygotes C282Y doivent subir une phlébotomie. Si SF est. 1 000mg/L, une biopsie hépatique est suggérée pour la stadification de la

fibrose. Les patients atteints de cirrhose doivent subir un dépistage du carcinome hépatocellulaire. Une biopsie du foie peut également être envisagée avant d'initier une phlébotomie chez les homozygotes C282Y avec des enzymes hépatiques élevées pour exclure d'autres causes de maladie du foie. Chez le patient qui n'est pas un C282Yhomozygote, une évaluation des autres causes d'indices de fer élevés doit être effectuée, y compris des troubles hépatiques et hématologiques. Si d'autres causes de surcharge en fer ont été exclues, le HIC doit être évalué par biopsie hépatique ou IRM (Imagerie par résonance magnétique). Les patients avec un HIC et une SF élevée de 0,1 000mg/mL doivent procéder à une phlébotomie thérapeutique. ALT, alanine aminotransférase ; AST, aspartate transaminase ; HH, hémochromatose héréditaire ; HIC, (Hepatic iron content) concentration hépatique en fer ; SF, ferritine sérique ; TS, coefficient de saturation de la transferrine (57).

6.3.2.2.Epidémiologie

L'incidence de l'HH varie de 1,5 à 3 cas pour 1 000 personnes jusqu'à 1 cas pour 200 à 400 personnes, bien que la véritable incidence soit difficile à déterminer car elle ne peut être évaluée que dans des études de dépistage néonatal(57).

La prévalence de cette mutation est plus élevée chez les Caucasiens, ou on estime que 3 à 10 personnes sur 1000 sont atteints de la maladie, ce qui donne à l'HH l'une des premières places en termes d'incidence des maladies métaboliques génétiquement déterminées(59).

La prévalence de HH-HFE apparenté a été observée comme étant similaire aux États-Unis, en Europe et en Australie, d'environ 1 cas sur 200 à 400 personnes. La prévalence la plus élevée existe chez les personnes d'origine irlandaise et scandinave, tandis que la plus faible est parmi celles d'ascendance africaine. De plus, la prévalence de HH HFE-Le apparenté est plus faible chez les Blancs qui ne sont pas d'origine nord européenne, comme ceux d'origine est-européenne ou méditerranéenne. Selon une méta-analyse utilisant une cohorte regroupée de 127 613 individus à travers l'Europe, la fréquence allélique de C282Y dans la population générale approche 6,2 %, néanmoins selon une méta-analyse de 2 802 patients le pourcentage augmente vers 80,6%. La mutation homozygote C282Y est significativement plus répandue chez les Blancs non hispaniques (0,44 %) que chez les Amérindiens (0,11 %), les Hispaniques (0,027 %), les Afro-Américains (0,014 %), les insulaires du Pacifique (0,012 %) ou les Asiatiques (0,000039%) (57).

6.3.3. Surcharge de fer secondaire

La surcharge en fer secondaire est un phénomène d'absorption excessive et de dépôt de fer dans les organes, qui n'est pas lié à l'une des mutations génétiques conduisant à l'HH de type 1 à 4 vu précédemment. Le plus souvent, cela est dû à des anémies de surcharge en fer, telles que la thalassémie ou la drépanocytose, l'anémie sidéroblastique, l'anémie hémolytique, l'anémie aplasique, l'anémie sensible à la pyridoxine, le déficit en pyruvate kinase, ainsi que les transfusions excessives de globules rouges, les injections de fer-dextran, l'hémodialyse à long terme. La surcharge en fer peut aussi être due à l'administration parentérale de fer ou à des maladies chroniques du foie telles que les hépatites B et C, les maladies alcooliques du foie, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), et la porphyrie cutanée tardive (PCT). Les conditions supplémentaires pouvant entraîner une surcharge en fer secondaire comprennent la malignité et les états inflammatoires chroniques. Les causes diverses de la surcharge en fer comprennent la surcharge en fer néonatale, la céruloplasminémie et la transferrinémie congénitale (39,57).

Chapitre II : La Protéine ferritine

1. Structure Chimique

La superfamille des protéines ferritines peut être divisée en trois sous-classes principales : les ferritines classiques (Ftn), les bactérioferritines (Bfr) et les protéines de liaison à l'ADN à partir de cellules affamées, également appelées Dps. Les ferritines classiques Ftn et Bfr appartiennent à la famille des maxi-ferritines, car structurellement elles sont légèrement plus grosses. En revanche, les protéines Dps appartiennent à la famille des mini-ferritine. Les Ftn se trouve dans les plantes, les bactéries et les animaux, tandis que Bfr et Dps sont limités aux procaryotes (60).

Les structures tertiaires des différentes ferritines sont remarquablement similaires, cependant des remarquables différences dans la structure quaternaire et primaire ont été observées. Les protéines Bfr semblent posséder une structure quaternaire presque identique aux protéines Ftn classiques et les deux sont assemblés à partir de 24 sous-unités, cependant, les bactérioferritines ne se trouvent que dans archées et bactéries. La différence majeure entre Bfr et Ftn réside dans la possession de fractions hémiques : Bfr contient 12 groupes hèmes, par rapport aux ferritines classiques, qui manquent de molécules hème dans leur structure (61).

A la superfamille de la ferritine appartiennent aussi les protéines Dps (protéine de liaison à l'ADN des cellules affamées, également connue comme sous le nom de ferritine de petite taille. Du point de vue structural, chaque Dps comprend uniquement 12 sous-unités similaires qui sont organisées en symétrie octaédrique 3/2, et son diamètre extérieur est d'environ 8 nm, formant une cage plus petite. Ainsi, la capacité de stockage de fer par la ferritine est supérieure à celle de la DPS qui ne peut stocker qu'environ 500 atomes de fer par cage et ne contient qu'un seul site de feroxydase. Chaque monomère de Dps possède également une hélice à quatre plis en faisceau, typiquement caractéristique de la superfamille des ferritines (60–62).

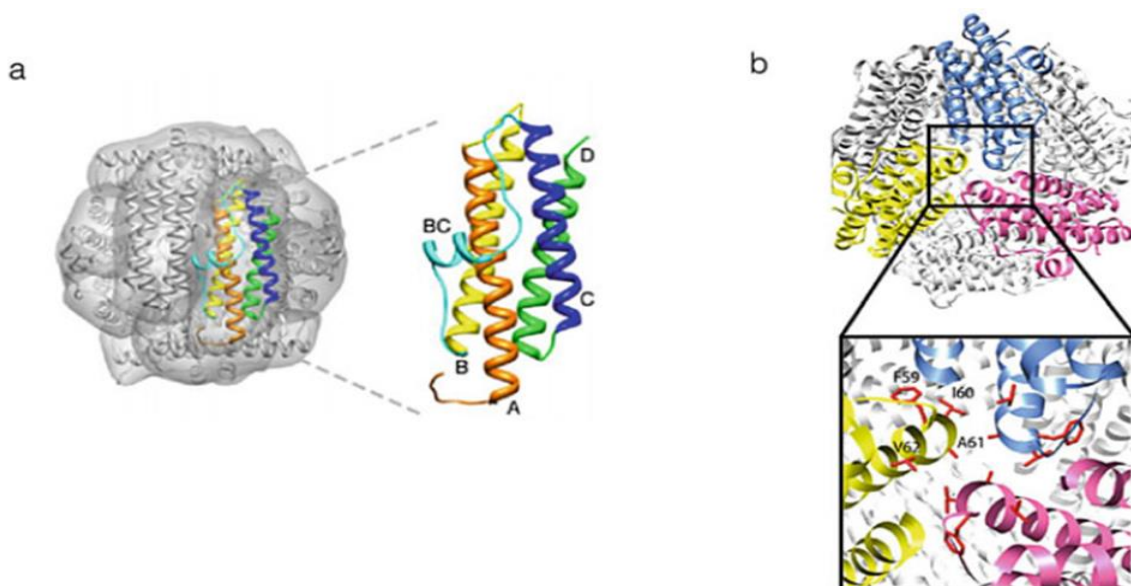


Figure 12 : (a) Typical tetrahedral structure of mini-ferritin (Dps). Les monomères du faisceau à quatre hélices sont représentés sous forme de rubans. (b) cages à protéines de mini-ferritine Dps vues à travers le triple axe; l'image montre le positionnement des acides aminés hydrophobes le long du pore (61).

La fonction principale de la ferritine à petite taille est la prévention de réaction nocive de Fenton par le peroxyde et le fer, $(\text{Fe (II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ ---- } \text{Fe (III)} + \text{OH}^- + \text{OH} \cdot)$. Les Dps se lie à l'ADN sans séquence en formant de grands complexes Dps DNA dans lesquels l'ADN est physiquement protégé contre les dommages oxydatifs induits par le fer. Dps contiennent également un site unique de ferroxidase, ces protéines protègent non seulement les bactéries des dommages oxydatifs, mais établissent également des complexes de haute affinité avec l'ADN sans spécificité de séquence. Par rapport à la ferritine, citée ci-dessus, la Dps est une protéine de type ferritine par contre atypique(61,62).

La ferritine est une macromolécule sphérique de 24 sous unités de types différents délimitant une cavité centrale où le fer est stocké sous forme de micelles d'oxydes de fer hydraté et phosphaté. Les 24 sous unités sont disposées en symétrie octaédrique (4/3/2) pour former une coquille sphérique. Le diamètre externe de la ferritine classique est d'environ 12 nm et la cavité interne est d'environ 8 nm. Dans la structure quaternaire de la ferritine chaque sous-unité est caractérisée par quatre hélices α antiparallèles (A – D) étroitement compactées, une séquence en boucle reliant les hélices B – C, une longue séquence reliant C – D, et une courte cinquième hélice α (E) qui adopte un angle aigu par rapport au faisceau près de la queue C-terminale. Il existe deux

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

sous-unités fonctionnellement et génétiquement distinctes de ferritine : la L-ferritine(liver) forme basique, ayant un poids moléculaire de (21 kDa) et la H-ferritine(heart) forme acide ayant un poids moléculaire de 19kda(63). Les gènes (FTH1 et FTL) sont situés sur les chromosomes 11q et 19q. Le rapport de ces 2 sous unités peut varier considérablement, selon le type de tissu et de l'état physiologique de la cellule(64). Dans les tissus tels que le foie et rate on retrouve la sous unité L et la sous unité H dans les organes comme le cœur et les reins dont Le monomère L (liver) est également connu sous le nom de ferritine à chaîne légère(light) et possède 178 acides aminés, alors que le monomère H (heavy) est connue comme étant de la ferritine à chaîne lourde et possède 174 acides aminés. Le rapport H / L n'est pas fixe, il est dépendant de l'expression des gènes codant pour les monomères H et L et du type de tissu, la sous unité H est surtout retrouvée dans les reins et le cœur. Des phénomènes comme des conditions inflammatoires et infectieuses, la réponse au stress xénobiotique, ainsi qu'à d'autres stimuli peuvent également modifier ce rapport (65,66).

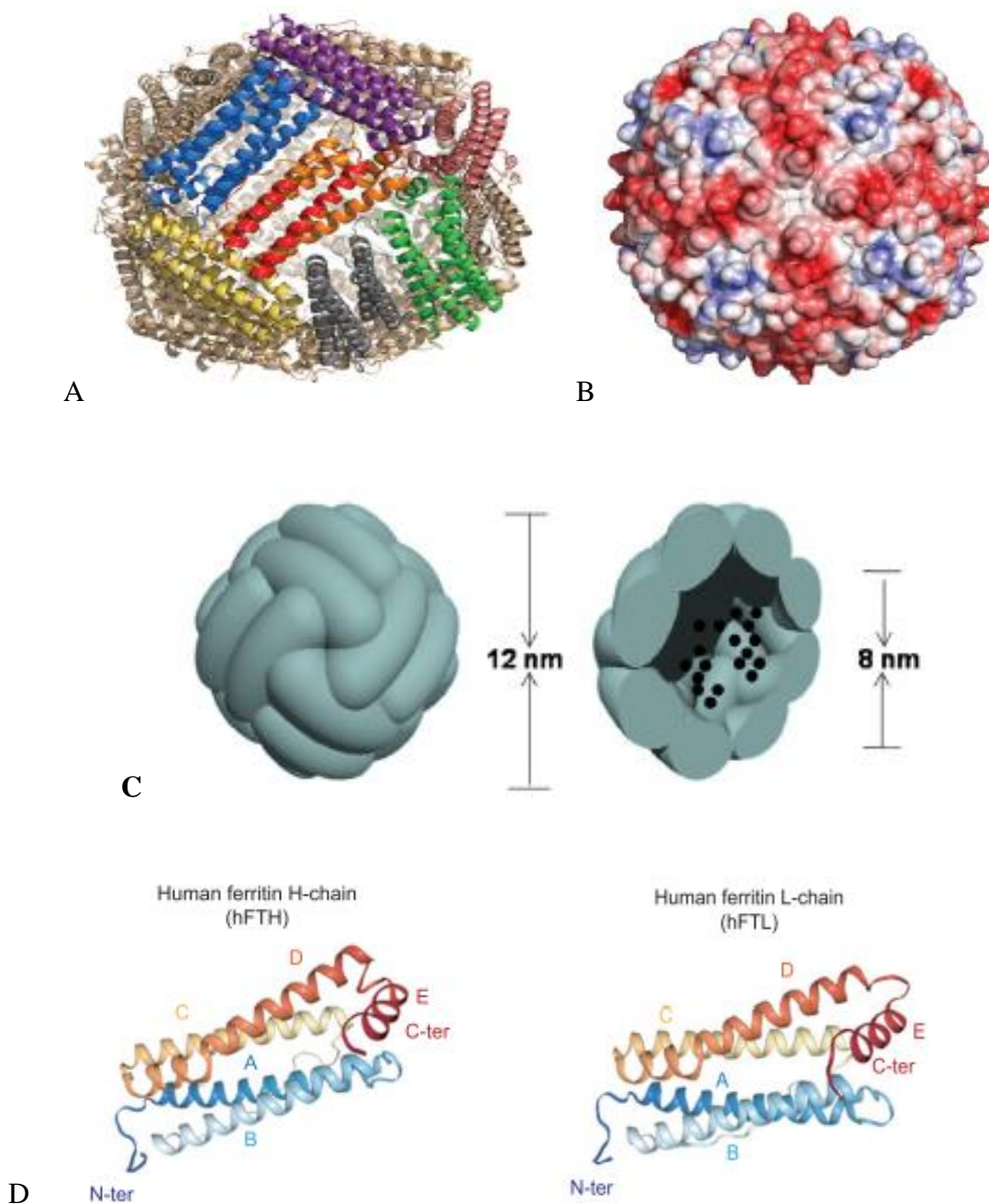


Figure 13 : (a) Structure cristalline de la ferritine (PDB 2ffx). Chacune des 24 chaînes est colorée individuellement. La structure est montrée regardant vers le bas de l'axe quadruple. (b) Structure de la ferritine avec un potentiel électrostatique cartographié sur la surface accessible aux solvants. Rouge : -5 e-1 kT , bleu : $+5 \text{ e-1 kT}$ (67). (c) La structure en forme de cage et le diamètre extérieur/intérieur de la ferritine (62). (d) Structures of human H-ferritin (PDB ID: 4ZJK) and L-ferritin (PDB ID: 6T5F) (68).

Pour la sous unité alpha, la disposition des acides aminés dans les divers -hélices alpha est la suivante : hélice alpha A (résidus d'acides aminés 10 - 39), longue hélice alpha B (résidus d'acides aminés 45-72), longue hélice alpha C (résidus d'acides aminés 92-120), longue une-hélice D (résidus d'acides aminés 124-155) et courte une-hélice E (résidus d'acides aminés 160-169). Le groupe d'acides aminés n'ayant pas été cité précédemment, notamment (acide glutamique 27, acide glutamique 61, acide glutamique 62, histidine 65 et acide glutamique 107) sont contenus dans le centre de ferroxidase. Ce centre présent dans la sous unité H comprend diverses chaînes latérales d'acides aminés hydrophiles, intégrés dans chacun des quatre une alpha-faisceaux d'hélices comprenant la sous-unité en tant que ligands de fer importants dans l'oxydation en plusieurs étapes de Fe^{2+} à Fe^{3+} , la première étape du processus de séquestration du fer par la ferritine. Le centre de ferroxidase est présent dans la sous-unité H, mais absent dans la sous-unité L. Le stockage du fer est assuré par ces 2 sous unités : la sous-unité H grâce à son activité catalytique ferroxidase, est capable transformer le Fe^{2+} en Fe^{3+} et la sous-unité L favorise la formation d'un noyau d'hydroxy-phosphate ferrique. Par sa capacité à limiter le fer libre intracellulaire, la sous-unité H joue un rôle dans les défenses anti-oxydantes de la cellule (69).

L'activité ferroxidase potentielle de la sous-unité L est perdue vu les changements d'acides aminés, y compris l'acide glutamique 62 en lysine et l'histidine 65 en glycine, la formation d'un pont salin entre la lysine 62 et l'acide glutamique 107 et se balançant d'acide glutamique 61 en position face à la cavité. Le Fe (III) au site A est coordonné à Glu23, Glu58, qui relie les deux ions de fer et His61. Au site B, Fe (III) est coordonné par les ponts Glu58 et Glu103 (70).

L'apoferritine est une cage protéique vide dépourvue d'ions ferriques. Afin d'obtenir l'apoferritine, des agents réducteurs (tels que l'acide ascorbique) et des chélateurs de fer (tels que le 2, 2-bipyridyle) sont ajoutés à la solution de ferritine pour réduire et chélater les ions fer, un diagramme schématique pour la préparation de l'apoferritine a été montré dans Fig.14. Cette cage d'apoferritine dote un nano-espace pour encapsuler et accueillir des molécules bioactives, et sa coque protéique de 2 nm d'épaisseur peut protéger et protéger les molécules internes de l'impact de facteurs environnementaux externes (62).

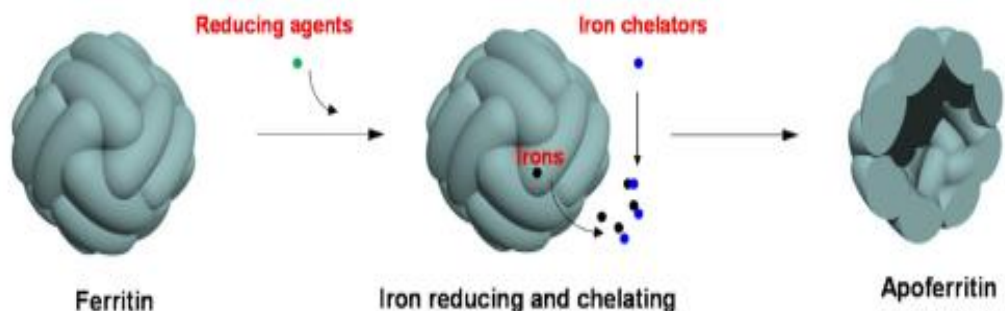


Figure 14 : Un diagramme schématique pour la préparation de l'apoferritine (62)

2. Synthèse de la ferritine

2.1.1. Assemblage supramoléculaire de la ferritine

L'autoassemblage de protéines en complexes à petite échelle joue un rôle biologique crucial. Pour produire une grande variété d'architectures protéiques, grandes, complexes et hautement symétriques, la nature utilise les propriétés d'autoassemblage des protéines. Les protéines peuvent dans certaines conditions, s'auto-assembler en plusieurs structures telles que les cristaux, cages protéiques et des super structures protéiques, dont la taille varie de nanomètre à millimètre. La structure protéique tridimensionnelle des protéines naturelles, est obtenue à travers le repliement de manière écoénergétique de la chaîne polypeptidique formée d'acides aminés. La thermodynamique du repliement des protéines est tel que certains de ses résidus s'orientent et se projettent à la surface de façon à ce qu'ils puissent interagir avec d'autres protéines(61,71).

L'autoassemblage des protéines est essentiel à la biologie structurale. La cristallographie aux rayons X, utilisée pour déterminer la plupart des structures, a besoin que la production de cristaux de protéines soit de haute qualité, ce qui nécessite une compréhension du processus de l'autoassemblage.

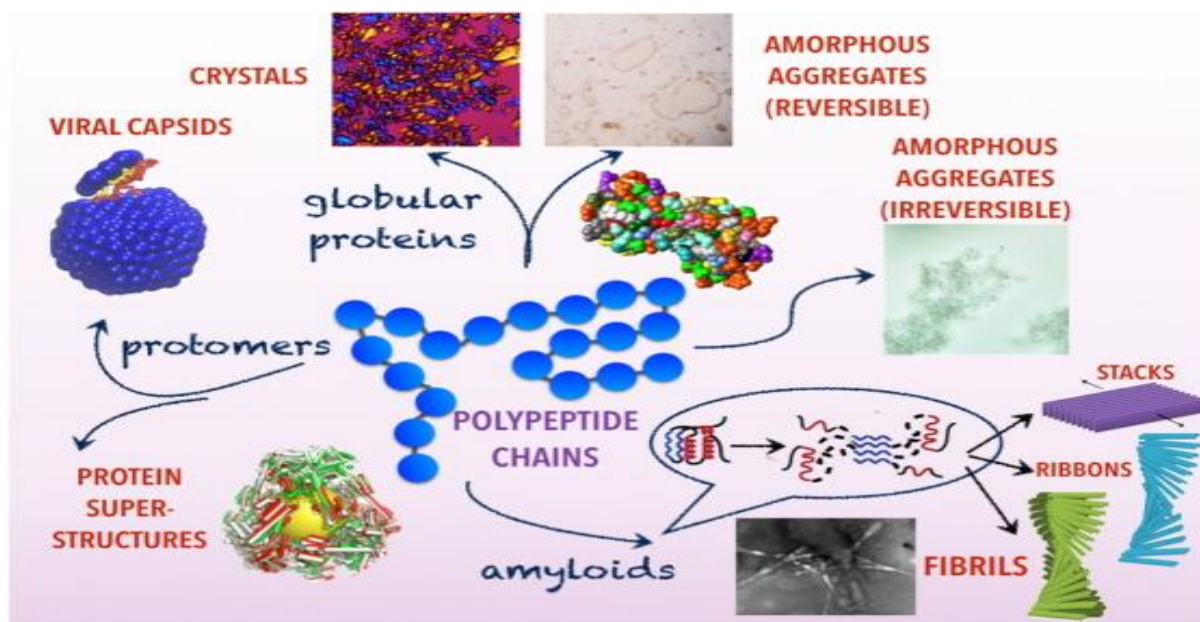


Figure 15 : Un certain nombre assemblages différents peuvent être formés par des protéines ou des peptides(71)

Les protéines globulaires peuvent s'assembler pour devenir soit des cristaux, soit des agrégats amorphes; les deux types de montage sont réversibles (en haut). Lors d'un changement de conformation d'une protéine ou d'un peptide, des agrégats amorphes (qui sont irréversibles) ou des fibrilles amyloïdes peuvent se former (à droite). Pour certains peptides, une gamme de différentes structures torsadées a été observée, notamment des rubans, des fibrilles et des empilements (en bas à droite). Des assemblages d'ordre supérieur comprenant des capsides virales (en présence d'un acide nucléique) et des superstructures protéiques (y compris des microcompartiments bactériens) peuvent également se former naturellement ou de manière dirigée, par exemple par mutagenèse (à gauche)(71).

Une bonne compréhension de l'auto-assemblage des protéines est aussi fondamentale pour des nombreux processus physiologiques et industriels. Lors de la production industrielle de protéines, le mécanisme l'auto-assemblage peut être exploré pour la réalisation des processus purification des protéines par cristallisation ou séparation de phase liquide-liquide. Comprendre les détails de ce processus qui est essentiel à la biologie, ne pas seulement importants pour la science fondamentale, mais cette connaissance est également nécessaire pour construire des technologies innovantes et stimulantes, telles que des nano-machines programmables.

Les cages protéiques sont une large gamme de structures protéiques ayant comme caractéristique commune l'autoassemblage des sous unités protéiques en nano-objets creux possédant au moins une cavité. Ces cavités comptent tenu de leur taille peuvent contenir par exemple des nanoparticules inorganiques, des acides nucléiques et autres protéines. Les cages à protéines sont des structures fortement symétriques, et chaque type est de taille uniforme. Les cages protéiques peuvent être classées en cages non virales et en particules pseudo virales (VLP). La ferritine intègre le groupe des cages protéiques non virales (72).

La molécule d'apoferritine, constituée de 24 sous-unités H et L, est assemblée à partir d'un pool cytosolique de sous-unités H et L disponibles. Pour que ce pool cytosolique soit maintenu il faut que lors de la traduction de l'ARNm des sous-unités H et L des polyribosomes libres garantisse l'apport de ces sous-unités, et le repliement approprié des chaînes polypeptidiques. La composition et la quantité des sous unités H et L disponibles dans ce pool détermine la composition de la molécule de ferritine. Entre temps cette quantité et composition est régulée aux niveaux d'expression transcriptionnelle et traductionnelle des gènes des sous unités H et L de la ferritine (72). La teneur en ferritine cytoplasmique est régulée par la traduction des ARN messenger (ARNm) de la ferritine H et L en réponse à un pool intracellulaire de fer labile. Ainsi, on observe une diminution de la synthèse de ferritine lorsque les taux de fer sont bas ; à l'inverse, lorsque le taux de fer est élevé, la synthèse de ferritine augmente. Il existe un équilibre fort entre le fer lié à la ferritine (Fe^{3+}) et le pool de fer labile contenu dans les cellules (Fe^{2+}), par lequel la ferritine empêche la formation d'espèces réactives de l'oxygène, induites par la réaction de Fenton. Différents types de cellules contiennent un pool cytosolique transitoire de fer, probablement lié à des chélateurs intracellulaires de faible masse moléculaire, tels que le citrate, divers peptides, l'ATP (Adénosine-Triphosphate), l'AMP (l'adénosine monophosphate) ou le pyrophosphate. Ce pool de fer labile à une activité redox et sa concentration est déterminé par les taux d'absorption du fer, son utilisation pour l'incorporation dans les enzymes du fer, le stockage dans la ferritine et l'export de la cellule.

Bien que dans certaines circonstances, il y ait une augmentation de l'ARNm de la ferritine en réponse au fer, la réponse régulatrice de la ferritine au fer est largement post-transcriptionnelle, et est due au recrutement de l'ARNm stocké des monosomes aux polysomes en présence de fer. Ce processus est médié par l'interaction entre les protéines de liaison à l'ARN (Acide ribonucléique

) et une région de la région 5 non traduite de l'ARNm de la ferritine H et L appelé l'élément sensible au fer (IRE) qui a une structure secondaire "tige boucle"(73).

Une deuxième caractéristique structurale de la superfamille des ferritines est la propension à former des dimères. Il existe un consensus général approuvant l'idée que les dimères sont le premier intermédiaire dans la voie d'auto-assemblage de la ferritine. Les dimères s'assemblent en outre pour former des 6-mères en tant qu'intermédiaire suivant, avec une probabilité égale de formation directe de 6-mères par rapport à la formation de 6-mères via des 4-mères. Le prochain intermédiaire important dans la voie d'assemblage est le 12-mer, formé via l'amarrage de deux 6-mers(60,61).

En 2016 Fernando Carmona et All ont mené des études ayant comme objectif une meilleure compréhension de l'auto-assemblage de la ferritine. Ces études ont été réalisées en utilisant le FRET suivant le schéma illustré dans Figure 16. Pour cela les molécules de ferritines marquées avec le FRET donneur (FTH-488) et FRET-accepteur (FTH-555) ont été désassemblées, mélangées à des proportions adéquates et ensuite réassemblé surveillé par FRET. Le protocole utilisé a été le même décrit par et al, une fois qu'il présentait des meilleurs résultats. De la sorte, pour vérifier si un signal FRET évident a été produit après le co-assemblage de sous-unités portant le donneur et l'accepteur FRET, les homopolymères FTH-488 et FTH-555 ont été dénaturés séparément, mélangés dans une proportion de 1:1 puis réassemblés, formant ainsi la structure de 24-mères. Des spectres d'émission sous excitation directe du donneur à 480 nm ont été collectés après 48h. L'interprétation des changements spectraux lors du remontage indiquais le transfert d'énergie non radiatif (FRET) entre Alexa-488 et Alexa-555 vu la proximité des sondes conjuguées dans les coquilles de ferritine, et donc de leur co-assemblage (70,74).

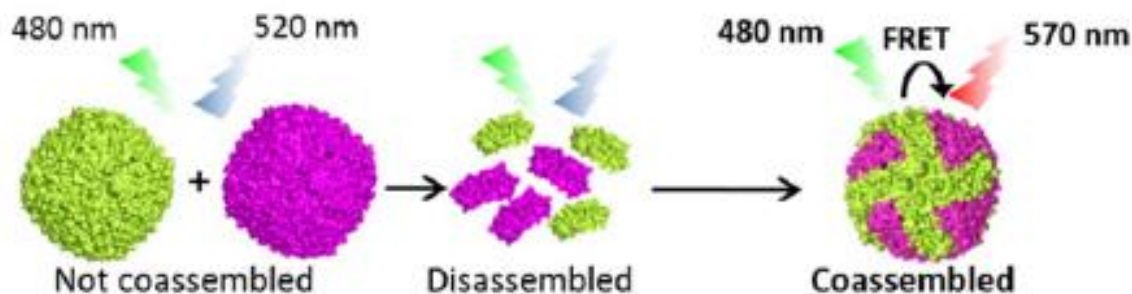


Illustration schématique de la réaction réalisée pour ces expériences de FRET. Le donneur FTH-488 est représenté par des structures vertes et l'accepteur FTH-555 par des structures roses

Figure 16 : Détection par FRET de l'assemblage de ferritine (70).

Les études réalisées ont permis de montrer que la formation d'hétéropolymères H/L est préférentielle à celle d'aux homopolymères H/H, étant donné que l'assemblage de l'hétéropolymère H/L était plus rapide que celui des homopolymères H/H. Lors de la synthèse des sous-unités H et L par des polyribosomes libres une concentration basale de sous-unités H et L libres, doit être maintenue dans ce pool cytosolique de sous unités. Une fois, cette concentration augmente en raison de la synthèse de nouvelles sous-unités H et L par des polyribosomes libres, les sous-unités seront assemblées en apoferritine dans le cytosol à proximité des polyribosomes. Pour que le fer soit incorporé dans des molécules d'apoferritine ou de ferritine pauvre en fer il faut que l'enveloppe de ferritine soit totalement assemblée à partir des sous-unités H et L disponibles. Les polyribosomes libres synthétisent une fraction de sous-unités H et L qui est réservé à la séquestration intracellulaire du fer. Les polyribosomes liés à la membrane synthétisent une fraction beaucoup plus petite des sous-unités H et L est synthétisée et après l'assemblage, la ferritine est sécrétée par la cellule vers le liquide extracellulaire (70,74).

3. Rôles de la ferritine dans la cellule

3.1.1. Localisations et rôles de la ferritine dans la cellule

La ferritine lorsqu'elle a été découverte au départ, était considérée comme une protéine cytosolique avec une fonction générale de stockage du fer. Cependant elle peut être trouvée dans d'autres compartiments cellulaires tels que : le noyau, les mitochondries et les lysosomes, où elle peut jouer divers rôles en fonction du contexte cellulaire. La ferritine mitochondriale peut protéger les cellules des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc de la ferroptose. Comme mentionné

précédemment dans le chapitre " Structure de la ferritine ", l'expression de la L-ferritine et de la H-ferritine peut différer entre les compartiments cellulaires. Il a été découvert que la ferritine H se trouve principalement dans le noyau, par contre la ferritine L se trouve principalement dans le cytosol, à la fois dans les cellules humaines et animales. De plus, la ferritine exogène peut être capturé via des récepteurs spécifiques par endocytose. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment cela affecte l'homéostasie du fer cellulaire et comment cela se rapporte à l'endocytose du fer médiée par les récepteurs de la transferrine ou les hyaluronates, ainsi qu'à l'absorption du fer via les canaux membranaires du fer. Devant une situation d'appauvrissement en fer, la ferritine peut être retrouvée dans les compartiments lysosomiques, plus précisément dans les autophagosomes et les autolysosomes, lors d'un processus appelé ferritinophagie, qui génère du fer labile à partir d'une réserve de ferritine.

La ferritine nucléaire peut protéger l'ADN (Acide désoxyribonucléique) en séquestrant le fer et en empêchant la réaction de Fenton, ou en se liant directement à l'ADN. La ferritine nucléaire a tendance à être principalement de la ferritine H et non de la ferritine L, ce qui peut suggérer que le rôle de la ferritine nucléaire n'est pas simplement pour le stockage du fer. Afin d'affirmer cette hypothèse, les auteurs X ont montré que dans les cellules épithéliales cornéennes (CE), la ferritine nucléaire empêchait l'apoptose en réponse aux dommages cellulaires, en particulier aux rayons UV en régulant négativement la voie de signalisation de la kinase N-terminale c-Jun (JNK). Fait important, des recherches récentes ont montré que la ferritine nucléaire joue un rôle dans la plasticité des cellules cancéreuses. Cependant, la façon dont la ferritine transloque du cytosol au noyau n'est actuellement pas claire.

La famille Ftn comprend également la ferritine mitochondriale (FtMt), codée par le gène FTMT sans intron sur le chromosome 5q du génome humain. FtMt est situé dans la matrice mitochondriale et exprimé dans les cellules à activité métabolique élevée, telles que le cœur et le cerveau. La ferritine mitochondriale est une ferritine de type H, ce qui suggère que son rôle n'est pas simplement de stocker le fer, mais peut-être de contrôler la LIP mitochondriale, nécessaire à divers processus métaboliques. L'ARN messager FtMt (ARNm) n'a pas la boucle souche classique de l'élément réactif au fer (IRE) et ne semble donc pas être régulé par la traduction par les niveaux de fer cellulaire contrairement à la H- et L-ferritine. FtMt présente une séquence leader N-terminale pour l'importation mitochondriale. Une fois dans les mitochondries, la séquence leader

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

est clivée et les peptides FtMt forment la structure de la coque de ferritine 24-mer pour incorporer des éléments de fer dans un processus similaire à celui des H/L ferritines cytosoliques. La séquence d'acides aminés mature de FtMt partage 77 % d'identité avec la H-ferritine et contient tous les résidus du centre de la ferroxidase. Cependant, malgré leurs similitudes dans les centres de ferroxidase, la H-ferritine et la FtMt présentent des différences dans leur chimie d'oxydation et d'hydrolyse. FtMt ne régénère pas son activité ferroxidase après oxydation du Fe initial²⁺ et a des taux de ferroxidation et de minéralisation du fer plus lents. Par conséquent, FtMt est capable de contrôler les niveaux de fer labile dans les mitochondries. Fait intéressant, il a été découvert que FtMt protège les cellules des dommages oxydatifs et de la ferroptose induite par l'éraстine dans les cellules neuronales (68).

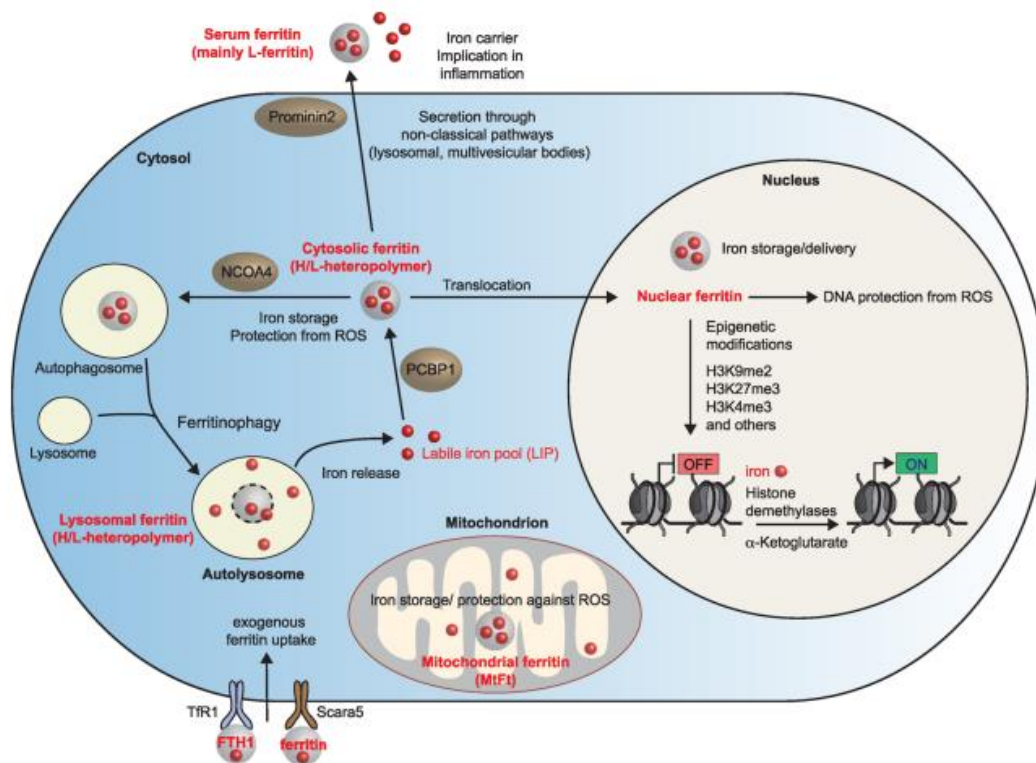


Figure 17 : Localisations et fonctions de la ferritine dans la cellule(68)

Schéma illustrant la localisation et la composition de la ferritine dans la cellule (écrit en rouge). Les différentes fonctions de la ferritine sont indiquées. La ferritine exogène peut être internalisée via les récepteurs membranaires TfR1 et le récepteur piègeur de classe A membre 5 (Scara5) et excrétée via une voie dépendante de la protéine Prominin2. L'excrétion de la ferritine se fait par des voies non classiques. La ferritine peut être trouvée dans différents compartiments cellulaires,

y compris le cytosol, les mitochondries et le noyau, et peut agir comme une installation de stockage du fer. La ferritine se déplace vers le noyau avec un mécanisme inconnu. Dans le noyau, la ferritine peut protéger l'ADN des dommages oxydatifs et fournir un réservoir de fer et potentiellement du fer pour des processus tels que la déméthylation des histones et de l'ADN. Le fer est un acteur central contrôlant la plasticité épigénétique. La ferritine mitochondriale peut protéger les cellules contre les ROS et donc la ferroptose. Le PCBP1 est un chaperon qui délivre le fer à la ferritine. La dégradation de la ferritine est médiée par NCOA4, qui est un récepteur de fret apportant la ferritine aux autophagosomes. La dégradation du multimère de ferritine dans les autolysosomes libère du fer qui fera partie du pool de fer labile (68).

3.1.2. Ferritine Sérique

Une petite quantité de ferritine se trouve dans le sérum. La ferritine peut également être sécrétée par les cellules, et est observée dans le sérum, où elle est principalement composée de sous-unités de L-ferritine et a une demi-vie de 30 h (75). Il a été proposé que les macrophages soient responsables d'une partie importante de la ferritine sérique. Les ferritines de mammifères manquent d'un signal peptidique pour la voie traditionnelle de sécrétion du réticulum endoplasmique-Golgi. Au lieu de cela, un motif de 13 acides aminés unique aux ferritines a été découvert sur la boucle des sous-unités H et L, qui semble être critique pour la séquestration de la ferritine. Nous ne savons pas si le fer est sécrété sous une forme monomérique ou multimérique. On ne sait pas non plus si le fer est lié à la ferritine tout au long du processus de sécrétion ou si le fer peut être chargé sur la ferritine dans le sérum, ce qui soulève la question de savoir dans quelle mesure les taux de ferritine sérique indiquent les concentrations de fer sériques (68).

4. Dégradation de la Ferritine

Les cellules utilisent plusieurs systèmes pour décomposer les protéines, dont l'un appelé autophagie. L'autophagie, littéralement « se manger soi-même » (76), est un processus d'homéostasie cellulaire, une voie catabolique (77) qui permet la dégradation et le recyclage des composants cellulaires. Ce mécanisme très conservé au sein des cellules eucaryotes (78), joue un rôle important dans le contrôle de qualité cellulaire et permet en conditions physiologique ou de stress, l'élimination et le remplacement en continu des protéines et des organites devenus non fonctionnels. Des protéines, des lipides, et même des organites entiers sont ainsi pris en charge par les autophagosomes et transportés dans les lysosomes afin d'être éliminées. Les produits de

dégradation obtenus (acides aminés, nucléotides, etc.) sont alors recyclés dans le cytoplasme. Ils seront utilisés pour la synthèse de nouvelles macromolécules(79,80).

Selon le type de substrat et de la méthode de séquestration, l'autophagie peut être subdivisée en plusieurs catégories : macro autophagie, micro autophagie, l'autophagie via une protéine chaperonne etc. La macro autophagie est responsable de l'élimination des cellules endommagés et la séquestration des parties du cytoplasmes, des grands complexes protéiques et des organelles (mitochondrie et peroxysomes) (79,81).

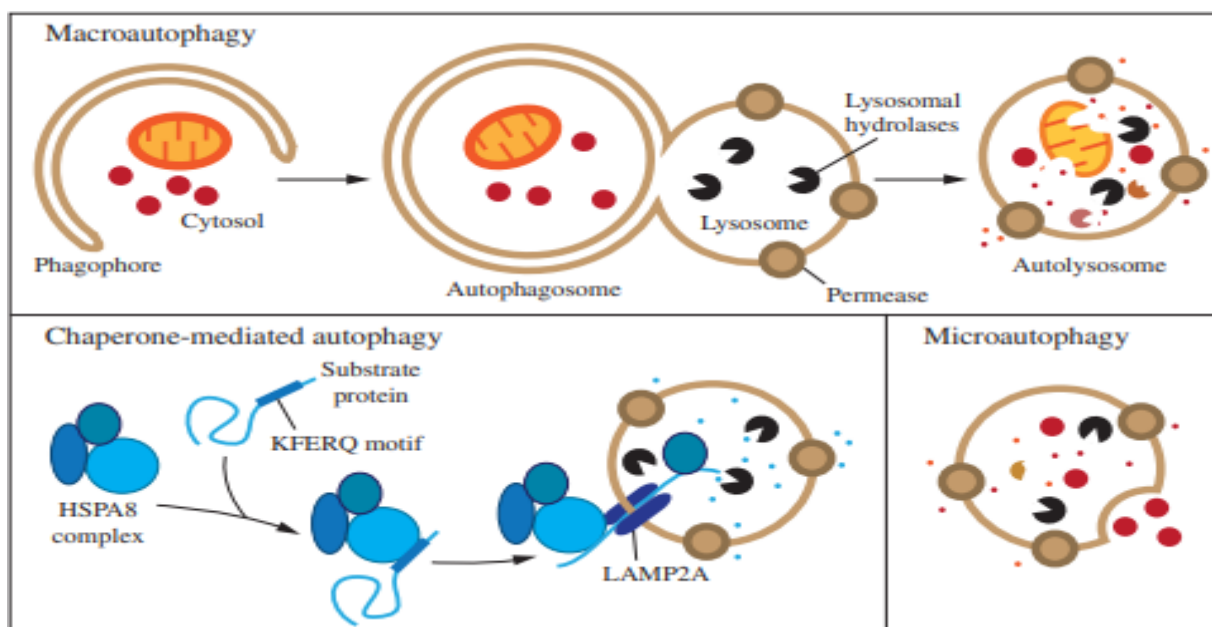


Figure 18 : Trois types d'autophagie dans les cellules de mammifères

La macroautophagie repose sur la formation de novo de vésicules cytosoliques à double membrane, les autophagosomes, pour séquestrer et transporter la cargaison vers le lysosome. L'autophagie médiée par le chaperon transporte les protéines individuelles dépliées directement à travers la membrane lysosomale. La microautophagie implique l'absorption directe de la cargaison par invagination de la membrane lysosomale. Les trois types d'autophagie conduisent à la dégradation de la cargaison et à la libération des produits de dégradation dans le cytosol pour une réutilisation par la cellule (82).

L'autophagie regroupe trois processus différents : La macroautophagie permet la dégradation lysosomiale de protéines ou d'organelles par formation d'un autophagosome,

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

transport puis fusion avec le lysosome. La microautophagie permet la dégradation d'éléments similaires par endocytose directement au niveau de la membrane du lysosome. Enfin, l'autophagie médiée par les chaperons (CMA), permet la translocation dans la lumière du lysosome par reconnaissance de protéines marquées par des protéines chaperonnes (83).

L'autophagie a été considérée comme une voie de dégradation en vrac strictement non sélective, cependant, des études complètes ont révélé une nature sélective. La découverte de récepteurs spécifiques de l'autophagie (ou des protéines adaptatrices autophagiques), qui séquestrent le matériel à dégrader (encore appelé substrat) dans le phagophore, a été décisive pour la compréhension des mécanismes de la macroautophagie sélective, dont la ferritinophagie. La ferritinophagie est une forme de macroautophagie sélective par laquelle la ferritine, la protéine de stockage du fer, est dégradée dans le lysosome (84,85). La ferritine est dégradée dans deux circonstances très différentes et sur deux sites différents dans les cellules animales. Deux mécanismes distincts sont à l'origine de la dégradation de la ferritine. La dégradation s'effectue lors d'une carence en fer, ou en raison d'un excès de fer. Lors d'une carence martiale, le fer contenu dans la ferritine est libéré afin d'être utilisé par la cellule. De ce fait, les cages de protéines ferritine vides seront postérieurement dégradées dans le cytoplasme à l'intérieur du protéasome. Lorsque la quantité de fer dans la cellule atteint des niveaux toxiques, la synthèse des protéines de ferritine augmente au maximum, à travers le mécanisme d'activation de la traduction de l'ARNm (ARN messenger) par un Fe^{2+} e-dépendant. Lorsque les cages protéiques forment des minéraux plus gros, la ferritine apparaît dans les lysosomes des cellules (86).

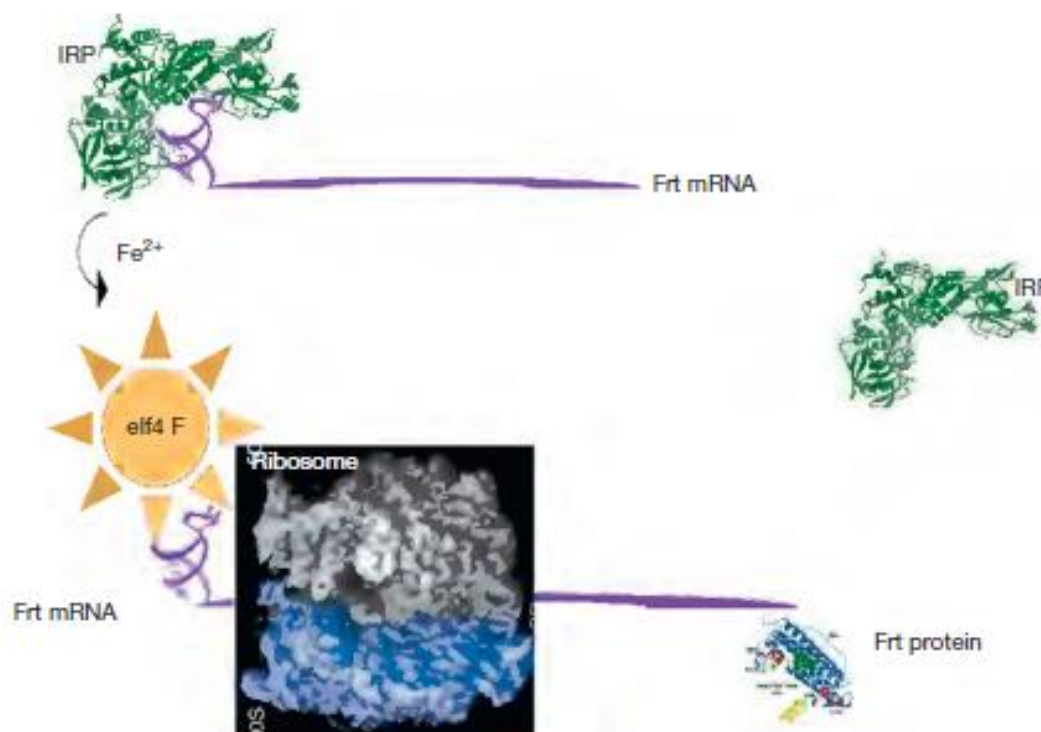


Figure 19 : Taux de contrôle de la liaison Fe²⁺-ARN de la synthèse de la protéine ferritine.

Une structure tige-boucle d'ARN non codante dans l'ARNm de ferritine, appelée IRE, qui est proche l'extrémité 5' de l'ARNm, peut se lier à deux protéines régulatrices : un inhibiteur de la synthèse des protéines, IRP, et un activateur de la synthèse des protéines, eIF4F, qui contient la sous-unité de liaison au ribosome eIF4G. Le résultat est une augmentation de la synthèse des protéines de ferritine lorsque les concentrations de Fe²⁺ libre dans les cellules augmentent (86).

L'ubiquitination est souvent une condition préalable à la reconnaissance du substrat. Elle détermine également la sélectivité de la macroautophagie chez les eucaryotes supérieurs. Selon la façon dont le substrat est reconnu, on distingue 2 grandes types d'autophagies sélective, dépendante ou indépendante de l'ubiquitine (84).

En fonction du type d'autophagie sélective des nombreuses voies d'autophagie ont été caractérisées et nommées selon le type de cellule cible et des différents récepteurs spécifiques : dont la voie de dégradation de la ferritine (ferritinophagie). La ferritine est dégradé via autophagie sélective médiée par NCO4(coactivateur de récepteur nucléaire 4) (87). Les facteurs spécialisés tels que les récepteurs autophagiques, qui lient physiquement le matériel cellulaire défini (ferritine,

acides nucléiques, entre autres) avec le compartiment d'autophagie en interagissant simultanément avec des protéines de type cargo et Atg8 ou LC3/GABARAP sur les autophagosomes, contrôlent la sélectivité de l'autophagie (84).

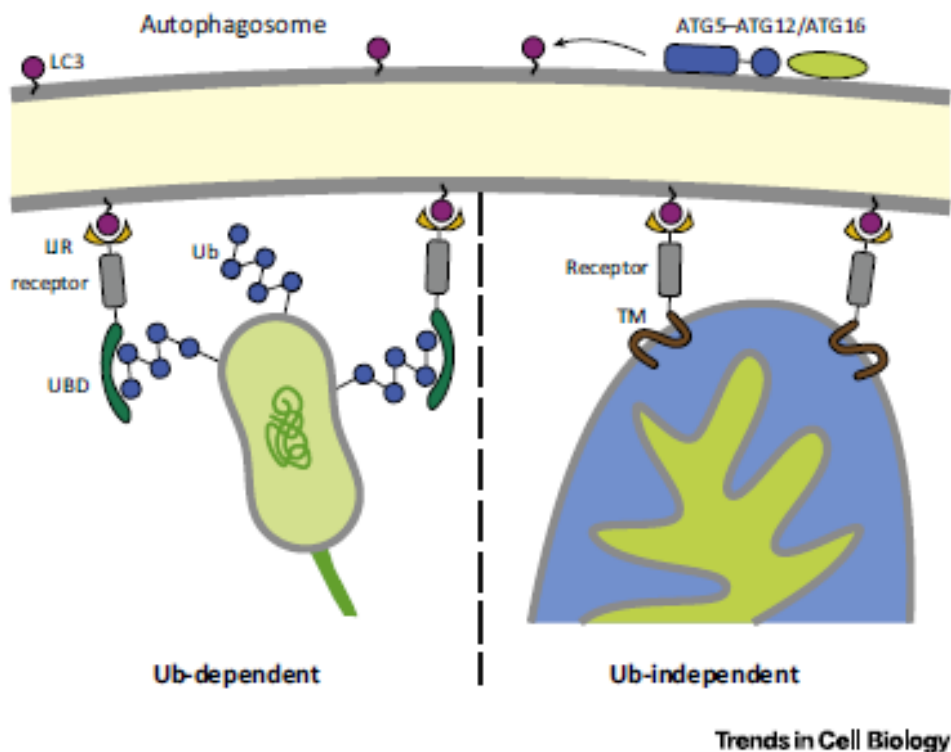


Figure 20 : Les protéines de type ATG8/LC3/GABARAP sont d'une importance cruciale dans l'autophagie sélective

Les modificateurs de type LC3 sont conjugués à la phosphatidyléthanolamine (PE) dans une cascade de type Ub like nécessitant l'activité de type E3 du complexe ATG5-ATG12/ATG16. Des modificateurs de type LC3 modifiés par PE sont incorporés dans le phagophore et médient l'autophagie sélective en interagissant avec les récepteurs de l'autophagie équipés de régions interagissant avec LC3 (LIR, jaune). Dans l'autophagie sélective dépendante de Ub (partie gauche), les récepteurs de l'autophagie reconnaissent simultanément les chaînes Ub (Ub, bleues) attachées à la cargaison intracellulaire (par exemple, des bactéries) via des domaines de liaison Ub (UBD, vert), reliant ainsi le matériel ciblé à la membrane autophagosomique. Dans l'autophagie indépendante d'Ub (partie droite), les récepteurs de l'autophagie se lient directement à la cargaison intracellulaire (par exemple, les mitochondries), dans certains cas via des domaines

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

transmembranaires (TM, brun). Les récepteurs de l'autophagie ont tendance à regrouper leur cargaison à travers des domaines d'oligomérisation spécialisés (gris). Abréviations : ATG, gène lié à l'autophagie ; GABARAP, g-protéine associée au récepteur d'acide aminobutyrique; LC3, chaîne légère 3 de la protéine 1 associée aux microtubules ; Ub, ubiquitine(84).

Tableau II : Récepteurs spécifiques de l'autophagie(84)

Voie d'autophagie	Récepteur	Substrat
Ferritinophagie	NCOA4	Ferritine
Mitophagie	OPTN, NDP52, Tax1BP1, NIX, BNIP3, FUNDC1, Atg32	Mitochondrie
Xenophagie	p62, NDP52, OPTN	Bactéries
Virophagie	TRIM[3TD\$DIF]5/, SMURF1	Composants viraux

En 2014, des chercheurs ont montré qu'une protéine appelée NCOA4 (coactivateur de récepteur nucléaire 4) ayant été initialement découvert comme coactivateur des récepteurs d'androgènes et que si située à la surface des autophagosomes, cible la ferritine pour la destruction. La non expression du gène Ncoa4 entraîne une augmentation d'expression d'IRP2 et de TFR1, probablement par diminution du fer labile suite à l'accumulation de ferritine (88).

Le domaine ubiquitin-binding domain (UBD) est absent sur NCOA4, de ce fait la dégradation de la ferritine par la ferritinophagie faisant intervenir de NOCA4 est une forme de macroautophagie sélective indépendante de l'ubiquitine. Les récepteurs autophagiques interagissent avec autophagosomes via les régions interagissant avec LC3 (LIR), qui est aussi présent sur certaines protéines ATG, et les GAP (Rab GTPase-activating protein). L'interaction se repose du fait qu'ils partagent une séquence conservée consensus Trp/Phe/Tyr-x-x-Leu/Ile/Val, la séquence (W/F/YxxL/I/V), qui assure le ciblage des récepteurs de l'autophagie vers LC3 qui est ancré dans la membrane du phagosome. Permettant ainsi une élimination efficace, précise et rapide des substrats. NCOA4 interagit directement avec une sous-unité particulière de ferritine, la sous unité H (FTH1) via son domaine c terminal, cette interaction est nécessaire pour libérer la ferritine aux autophagosomes (89).

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

Dans la cellule, la quantité de NCOA4 est sous le double contrôle de l'autophagie et du système ubiquitine-protéasome et son renouvellement, qui dépend de l'ubiquitine et du fer. Lorsque les niveaux de fer sont élevés dans la cellule, la quantité de NCOA4 disponible va diminuer, car ce récepteur sera dégradé. Alors le nombre de molécules de ferritine décomposés ne sera pas élevé. Par contre, les faibles quantités de fer conduisent à une augmentation de NCOA4 sur les autophagosomes, ce qui favorise ferritinophagie et augmentation de la quantité de fer dans la cellule. Le contrôle de la quantité de NCOA4 par le système ubiquitine-protéasome implique son interaction avec la ligase ubiquitine HERC2 (HECT and RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 2) qui a été découverte lors des études protéomiques et reconnaît NCOA4 par son domaine CUL7 (Cullin 7)-homology (85,89).

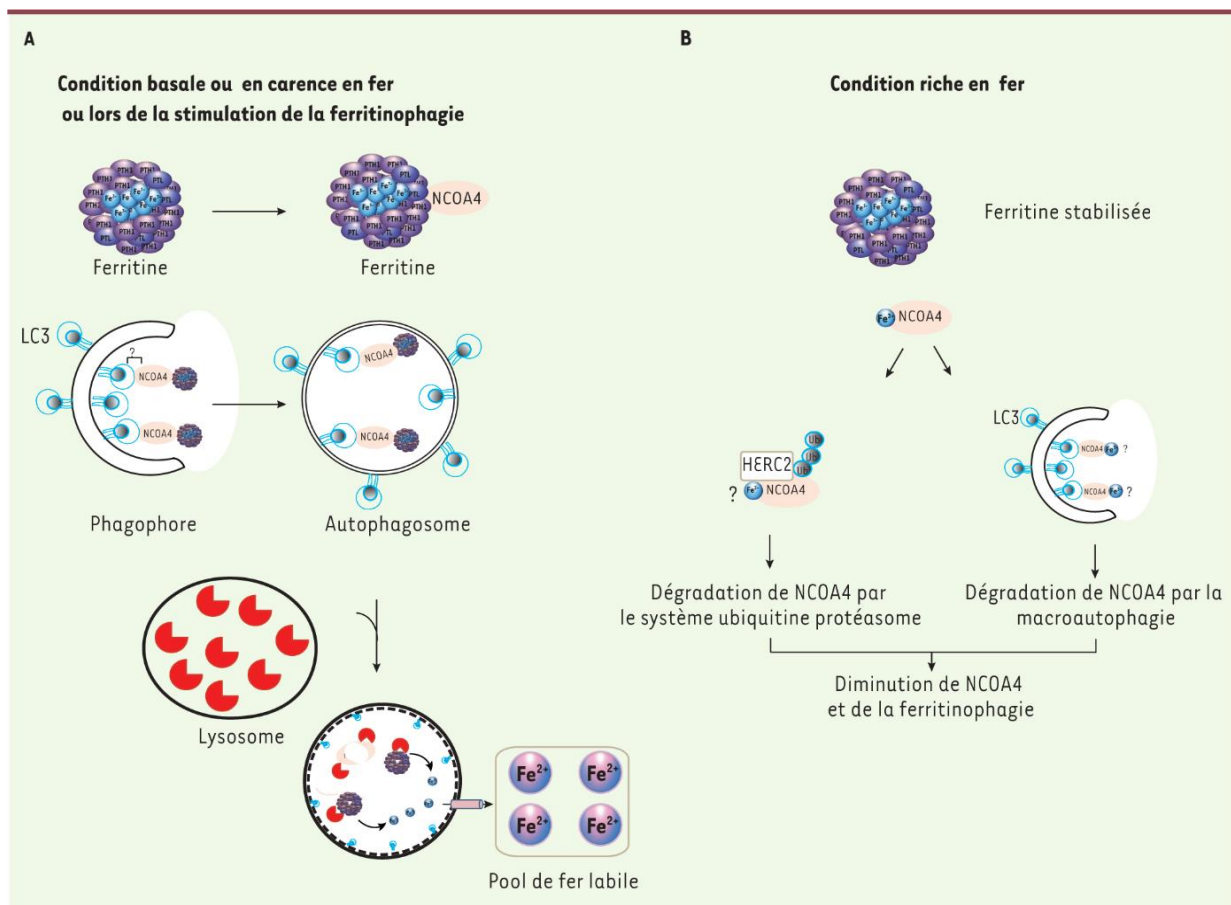


Figure 21 : En condition basale ou en carence martiale, le fer hémunique est stocké dans la ferritine, une molécule multimérique capable de chélater 4 000-4 500 atomes de fer par molécule.

NCOA4 reconnaît la ferritine et l'achemine au phagophore. La nature moléculaire de l'interaction NCOA4-autophagosome est incertaine, mais probablement implique une interaction avec LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)-II/GABARAPL (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein) 1/2 potentiellement via un motif LIR (LC3-interacting region) d'expression non-canonique. La dégradation de la ferritine dans l'autolysosome libère le fer non hémique, qui est exporté vers le cytosol. B. Le niveau de NCOA4 ainsi que la ferritinophagie sont régulés par la quantité du fer dans la cellule. En conditions riches en fer, NCOA4 est reconnu par HERC2 (HECT and RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 2), une ubiquitine ligase E3, d'une manière dépendante du fer, et ciblé pour sa dégradation par le protéasome. En parallèle, NCOA4 se lie au fer (la forme ferreux ou ferrique n'est pas encore déterminée) et emprunte la voie de macroautophagie non sélective pour être dégradé. Le niveau plus faible de NCOA4 dans la cellule amène à une diminution de la ferritinophagie (89).

Chapitre III : Techniques d'analyses de la Ferritine

Lorsque des bioindicateurs sanguins sont utilisés pour catégoriser le statut en fer, ils sont supposés être exacts. La capacité d'atteindre un niveau de précision souhaité dépend de la qualité du dosage et de l'approche d'étalonnage du signal de dosage en une concentration. Les concentrations mesurées au cours des études de recherche clinique doivent être significatives par rapport aux concentrations mesurées après le déploiement des tests en milieu clinique (90).

1. Intérêt du dosage de la ferritine

1.1.1. Circonstances de prescription

On peut distinguer 3 principales circonstances dans lesquelles les résultats du dosage de la ferritine sérique, sera utilisé par le clinicien :

- 1) Etablissement et confirmation du diagnostic de la carence martiale/anémie ferriprive. Dans certains cas en présence de carence martiale aucun autre paramètre hématologique ne sera pas perturbé. En dosant la ferritine le diagnostic de la carence pourra être établi à l'exception de certains cas, ce qui permettra la mise en route précoce d'un traitement.
- 2) A l'inverse, ce dosage pourra confirmer un diagnostic de surcharge en fer idiopathique ou post-transfusionnelle et le suivi d'une thérapeutique destinée. Déterminer l'organisme en fer sera également une application de ce dosage simple.
- 3) En dehors de l'exploration du métabolisme martial, les grands syndromes inflammatoires bénéficient également de ce dosage, la ferritine en tant qu'une protéine inflammatoire. En outre, parce qu'elle est présente dans toutes les cellules de l'organisme, la ferritine sera également élevée en cas de lyse cellulaire (hépatite virale etc.).

Tout ceci fait qu'actuellement le dosage de la ferritine sérique est très fréquemment demandé par les cliniciens bien qu'il ne soit pas encore suffisamment prescrit.

1.2. Rappels sur la valeur diagnostique d'un test biologique (91)

La valeur diagnostique d'un test de laboratoire dépend de différents paramètres qui permettent de dire si ce test est fiable. Nous allons définir les termes sensibilité, spécificité et précision.

- La sensibilité exprime le pourcentage de résultats anormaux trouvés chez des patients atteints par une affection.
- La spécificité exprime le pourcentage de faux positifs, c'est-à-dire des résultats anormaux trouvés chez des patients exempts de maladie ;
- La valeur prédictive positive, (reliée à la spécificité) exprime la valeur diagnostique d'un test positif.
- La valeur prédictive négative (reliée à la sensibilité) indique qu'un résultat normal permet d'exclure le diagnostic avec un risque d'erreur de x %, généralement 5%.
- Le terme précision a de nombreuses connotations. Du point de vue de la chimie analytique, la précision peut être définie comme l'écart entre le résultat du test et le vrai résultat(90).

2. Les méthodes de dosage de la ferritine :

La ferritine a été découverte en 1937, cependant pour quelle puisse être quantifiée, il a fallu attendre le développement de techniques d'immunodosage sensibles. Ce n'est qu'en 1972, qu'Addison et ses collègues ont démontré que la ferritine pouvait être détectée de manière fiable dans le sérum humain à l'aide d'un test immunoradiométrique. Depuis le développement de ce test immunoradiométrique sensible, la mesure de la ferritine sérique en tant que mesure de substitution des réserves corporelles en fer a largement remplacé les dosages en laboratoire du fer sérique et de la transferrine ou de la capacité totale de fixation du fer dans la pratique clinique. Ces dosages sont des dosages immunologiques en sandwich dans lesquels un anticorps est l'anticorps « de capture » et un autre anticorps est l'anticorps « de détection ». La spécificité épitopique du test est déterminé par ces anticorps qui peuvent être polyclonaux et/ou monoclonaux. De nombreuses variantes ont été décrites et, à ce jour, la ferritine sérique est incluse dans les derniers analyseurs automatisés par lots et à accès aléatoire pour les dosages immunologiques de plusieurs fabricants tels que (Abbot Architect)*, (Roche diagnostic)* et (Beckman)*(92).

Le dosage de la ferritine est réalisé par différents méthodes divisées en 3 groupes :

- Méthodes radiométriques, qui sont désormais rarement utilisés en raison des risques pour la santé et la sécurité du personnel de laboratoire associés à l'utilisation de substances radiomarquées.
- Non radiométriques chimiluminescence (dosage Abbott Architect, dosage ADVIA Centaur)*, électrochimiluminescence (dosage Roche ECLIA)* et immuno-enzymatique (ELISA)
- Agglutination (immunoturbidimétrie, immunonéphélométrie)

La plupart des dosages immunologiques utilisent des anticorps contre la ferritine de la rate ou du foie. Les dosages doivent être calibrés par rapport au troisième étalon international de la ferritine.

Avant de détailler les méthodes il est important de décrire le principe des techniques immunoprécipitation en milieu liquide et des immunoanalyses avec un marqueur.

3. Immunoprécipitation en milieu liquide (93)

Les applications cliniques des techniques d'immunoprécipitation en milieu liquide ont vu le jour progressivement au milieu du 19^e siècle vers les années 1948. Avec la mise au point d'appareils de lecture de plus en plus performants elles ont pu se développer, ce qui a permis d'atteindre des limites de sensibilité de l'ordre du mg/L.

Principe : Les dosages par immunoprécipitation en milieu liquide se réalisent au niveau de la zone I de la courbe d'Heidelberger (figure 22). La concentration en l'immun complexe (IC) augmentera avec la concentration en antigène (Ag), pour une concentration d'anticorps (Ac) définie et en excès. Les IC formés, vu leur taille, ont la capacité de diffuser ou d'absorber une lumière incidente et cette diffusion/absorption est proportionnelle (jusqu'à une certaine limite) à la concentration d'Ag à doser. Il en résulte une courbe de calibration analogue à la partie ascendante de la figure 22.

Réaction Ag/Ac en milieu liquide : courbe de précipitation d'Heidelberger

En solution pour former des agrégats (IC) de taille variable les nombreux déterminants antigéniques ou épitopes d'une protéine peuvent s'associer avec les paratopes correspondants d'Ac spécifiques. Grâce à leur propriété de diffusion (néphélométrie) ou d'atténuation (turbidimétrie) d'une lumière incidente, ces agrégats pourront être détectés/dosés. Les concentrations relatives en Ag et en Ac. détermineront la taille et la masse des IC formés. En conséquence pour une concentration fixée en Ac et pour des concentrations croissantes en Ag on distingue 3 zones en fonction de la taille des IC.

- 1) Zone I : grand excès d'Ac $\rightarrow (Ac) \gg (Ag)$. Au niveau de la partie ascendante de la courbe les molécules d'Ag ajoutées sont rapidement saturées par les molécules d'Ac qui sont en excès. Les IC sont en moyenne de petites tailles, e.g. Ag-(Ac) n et isolés (pas ou peu de ponts Ac entre les molécules d'Ag). On note la présence de molécules d'Ac libres. Avec l'ajout d'Ag, on constatera une augmentation de la taille des IC, à travers l'établissement progressif de ponts Ac entre les molécules d'Ag et ce jusqu'à épuisement des molécules d'Ac libres.
- 2) Zone II : zone d'équivalence ou d'excès modéré d'un des partenaires par rapport à l'autre. Dans cette zone les IC forment des réseaux ou agrégats qui atteignent une taille et une masse maximale lorsque les concentrations en Ag et en Ac sont dans un rapport d'équivalence. NB : au point d'équivalence l'IC précipitant peut être emprisonné dans les mailles d'un gel et ainsi être visualisé. C'est le principe de l'immunochimie en milieu gélifié.
- 3) Zone III : grand excès d'Ag $\rightarrow (Ac) \ll (Ag)$. Les molécules d'Ag ajoutées satureront progressivement les molécules d'Ac. Cette saturation entraîne une décomposition des réseaux avec formation d'IC isolés et de petites tailles, et présence de molécules d'Ag libres en excès.

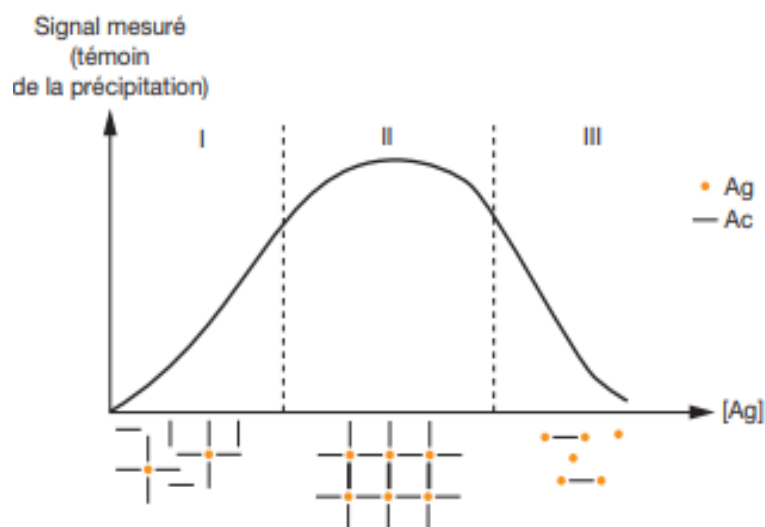


Figure 22 : Courbe de précipitation du complexe Ag-Ac (94)

Zone I : zone d'excès relatif en Ac par rapport à l'Ag. Les épitopes de l'Ag sont saturés par les paratopes de l'Ac. L'immun-complexe (IC) est de faible taille et précipite peu.

Zone II : zone d'équivalence. La proportion en épitopes et en paratopes est optimale pour former un réseau tridimensionnel. L'IC est de grande taille et précipite.

Zone III : zone d'excès relatif en Ag par rapport à l'Ac. Les paratopes de l'Ac sont saturés par les épitopes de l'Ag. L'immun-complexe (IC) est de faible taille et précipite peu.

3.1. Agglutination par des particules en latex (95)

Cette méthode utilise des particules en latex pour la détection d'une grande variété d'analytes. Le test qualitatif a un format simple. Sur une lame noire, par exemple, quelques gouttes de latex sensibilisées avec le réactif et l'échantillon peuvent être mélangées avec un bâtonnet. L'agglutination par inversion de phase provoquée par l'immunoréaction peut être observée à l'œil nu deux à trois minutes plus tard. L'agglutination au latex a été adaptée pour des essais quantitatifs utilisant la turbidimétrie (absorption de la lumière) ou la néphélométrie comme méthodes de détection de la lumière (diffusion de la lumière).

L'agglutination au latex donne une sensibilité inférieure au nanogramme par millilitre, mais la sensibilité du test de précipitation du complexe Ag-Ab reste inférieure à 0,5 g/mL.

3.2. Immunoprécipitation en milieu liquide et détection par néphélobimétrie ou turbidimétrie

La diffusion de la lumière est un phénomène physique qui résulte de l'interaction de la lumière avec des particules en solution. La néphélobimétrie et la turbidimétrie sont des techniques analytiques qui permettent de mesurer la lumière diffusée. Ces 2 techniques sont basées sur l'incidence de particules dispersées en solution, e.g. immunocomplexes, sur la diffusion ou la transmission d'une radiation lumineuse incidente. A l'opposé de l'émission de fluorescence, la longueur d'onde de la lumière diffusée est la même que celle de la lumière incidente. En biochimie médicale cette technique est essentiellement utilisée pour effectuer le dosage des protéines et d'haptènes spécifiques (93,96).

Principe : La néphélobimétrie et la turbidimétrie sont basées sur la diffusion du rayonnement par des particules en suspension. Lorsqu'un faisceau lumineux collimaté rencontre une particule en suspension, il absorbe, reflète, diffuse et transmet des parties de la lumière. La mesure de la lumière diffusée par une solution particulière est connue sous le nom de néphélobimétrie. Selon la taille relative de la longueur d'onde de la lumière, il existe trois types de diffusion de la lumière.

Selon la taille relative de la longueur d'onde lumineuse, il existe trois types de diffusions lumineuses. La diffusion de la lumière est symétrique autour de la particule si la longueur d'onde de la lumière est sensiblement plus grande que le diamètre (d) de la particule ($d \ll \lambda$). Rayleigh a caractérisé la diffusion minimale de la lumière comme se produisant à 90 degrés par rapport au faisceau incident.

Nombreux facteurs influencent la diffusion de la lumière : la taille des particules, la dépendance à la longueur d'onde, la distance d'observation, la polarisation de la lumière incidente, la concentration des particules et le poids moléculaire des particules. L'équation de diffusion de Rayleigh nommée ainsi car c'est John William Strutt Rayleigh qui en a fait la découverte, s'applique lorsque la diffusion de la lumière à partir de petites particules, qui ont des dimensions bien inférieures à la longueur d'onde de la lumière incidente (par exemple, une taille de particule inférieure à $\lambda/10$). Dans ces conditions, chaque particule est soumise à la même intensité de champ électrique au même moment. Les ondes lumineuses réirradiées ou diffusées de la petite particule sont en phase et se renforcent mutuellement. Au fur et à mesure que les particules deviennent plus grosses que l'onde lumineuse incidente, toutes les ondes lumineuses rayonnées ne sont pas en

phase. Le renforcement du rayonnement se produit dans certaines directions, tandis que des interférences destructives se produisent dans d'autres. Les modèles de diffusion de ces grosses particules sont caractéristiques de la taille et de la forme de la particule.

Les réactifs comprennent un anticorps contre l'analyte d'intérêt et un réactif contenant l'analyte d'intérêt lié à une bille de latex. En l'absence d'analyte dans un échantillon, l'anticorps du réactif se lie au réactif contenant l'analyte lié à la perle de latex, ce qui entraîne augmentation de la turbidité. Lorsqu'un échantillon avec des concentrations élevées d'analyte est ajouté au mélange de réactifs, l'anticorps réactif est lié par l'analyte dans l'échantillon et non par le réactif contenant l'analyte lié à la bille de latex. Ainsi la présence d'analyte de l'échantillon entraîne moins de turbidité. Limites de détection d'environ 10 mg/L sont atteints avec des mesures néphélométriques et turbidimétriques de routine méthodes utilisant des anticorps en solution. Liaison des anticorps aux particules de latex ou d'autres matériaux améliorent la diffusion de la lumière et peut abaisser les limites de détection de 10 à 100 fois. Tels dosages peuvent être décrits comme des dosages à base de latex ou à base de particules. Dosages néphélométriques et turbidimétriques offrent généralement des coefficients de variation intra-série (CV) de moins de 5 %, sauf lorsque les limites de détection sont proches.

Pour la turbidimétrie comme pour la néphélométrie, tous les réactifs et sérums doivent être libres de particules susceptibles de diffuser la lumière. Prétraitement du sérum avec du polyéthylène glycol, un polymère hydrophile non ionique, améliore l'interaction Ag-Ab.

Comme le polymère est plus hydrophile que l'Ag ou l'Ab, l'eau est attirée de l'Ag et de l'Ab au polyéthylène glycol. Il en résulte un rythme plus rapide et plus grande quantité de formation de complexe Ag-Ab (93,97).

3.2.1. Immunoturbidimétrie

La turbidimétrie entraîne une diminution de l'intensité du faisceau lumineux qui traverse une solution trouble en raison de la diffusion, de la réflectance et de l'absorption de la lumière, du a des particules qui conduisent à la turbidité de la solution. La mesure de cette diminution de l'intensité lumineuse est mesurée par des dosages turbidimétriques, à travers un analyseur d'immunoessai, tel que (Roche Hitachi 912)*, (Abbott ARCHITECT ci8200)* et (Beckman UniCel DXC 800)*. Des tests immunoturbidimétriques pour de nombreuses protéines sériques ont déjà été développés, la ferritine y compris (98).

Principe : La turbidimétrie est la mesure de la perte de transmission de la lumière due à la formation de particules. La quantité de lumière absorbée par une suspension de particules est également déterminée par la concentration de l'échantillon, ainsi que la taille des particules. Des photomètres visibles ou des spectrophotomètres visibles sont utilisés pour mesurer des solutions qui seront quantifiés par la turbidimétrie. Des photodétecteurs capables de détecter de légers changements dans les signaux photoniques ont été utilisés pour atteindre une sensibilité plus élevée. De faibles longueurs d'onde et des spectrophotomètres de haute qualité peuvent permettre à la turbidimétrie d'atteindre une sensibilité comparable à la néphélogétrie.

3.2.1.1. Turbidimétrie utilisant des particules en latex.

La technique utilisant adsorption de lumière (perte de lumière due à la diffusion sur la surface d'une particule) est proportionnelle au diamètre de la particule et dépend de la longueur d'onde de la lumière utilisée. La plupart des réactifs au latex disponibles sur le marché sont constitués de latex d'un diamètre inférieur à 1 µm et sont utilisés dans des analyseurs chimiques automatisés qui utilisent des méthodes de mesure photométriques (99).

Principe : Mesure en point final de la concentration en ferritine par la mesure photométrique de la réaction antigène - anticorps entre les anticorps anti-ferritine portés par des particules de latex et la ferritine présente dans l'échantillon (100). La ferritine humaine s'agglutine avec des particules de latex recouvertes d'anticorps anti-ferritine (101).

Pour augmenter encore plus la sensibilité, des efforts ont été entrepris pour moderniser les réactifs et les appareils, ainsi que pour optimiser la taille des particules, la sélection de la longueur d'onde et les logiciels informatiques pour l'intégration des données (96).

3.2.1.2. Avantages de la turbidimétrie

Néanmoins, les avantages majeurs de l'immunoturbidimétrie par rapport à la néphélogétrie sont des analyses relativement rapides, des volumes de tests élevés, une réduction des coûts, l'élimination des analyseurs hautement spécialisés pour un faible champ d'applications et des analyses à accès aléatoire au lieu de tests par lots (98).

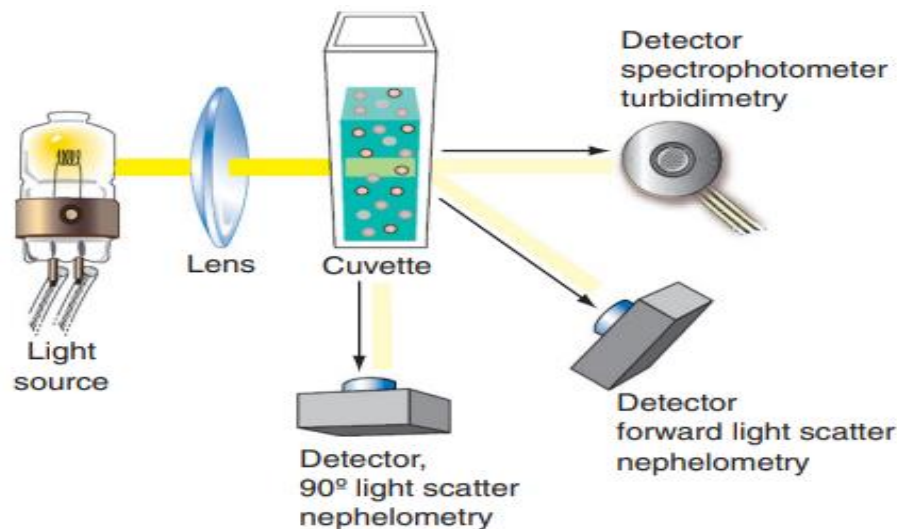


Figure 23 : Arrangements optiques de néphélogétrie et de turbidimétrie.

La néphélogétrie détecte la lumière diffusée (angle droit ou avant) et la turbidimétrie mesure une réduction de la lumière transmise vers l'avant (95)

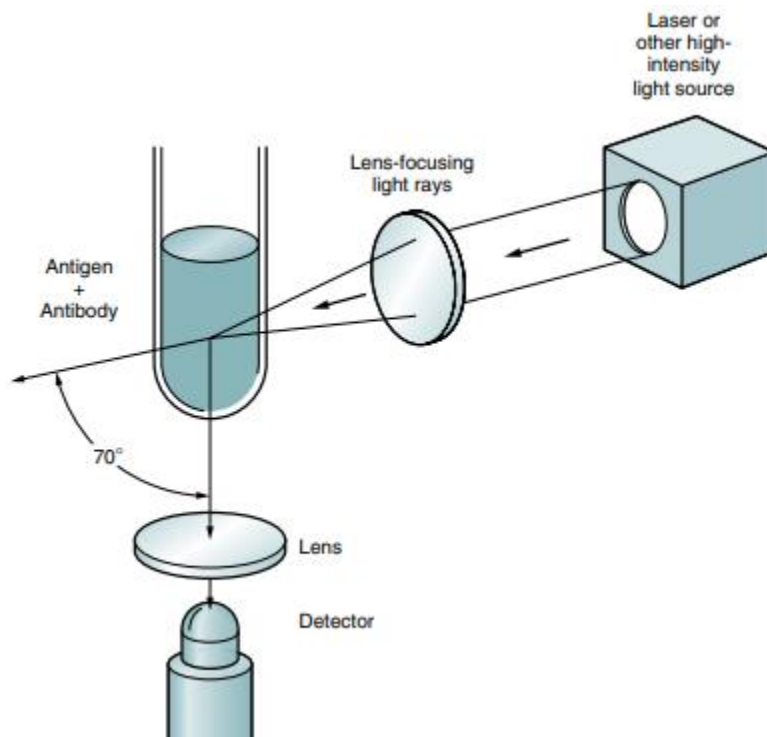
3.2.2. Immunonéphélogétrie

Les laboratoires cliniques utilisent largement les mesures de protéines par néphélogétrie dû au fait que la méthode peut être facilement automatisée. Basée sur le principe de la diffusion de la lumière (généralement en appliquant un laser comme source lumineuse) par des particules formées de complexes anticorps-antigène en solution, cette méthode a d'abord été appliquée aux immunoessais, une application que l'on trouve encore aujourd'hui(102). La néphélogétrie permet la détection d'antigènes ou d'anticorps cependant, la plupart du temps, la concentration d'antigènes. Au fur et à mesure que des complexes antigène-anticorps (complexes immuns) se forment, ils précipitent et la turbidité résultante diffuse la lumière incidente.

Principe : La néphélogétrie est une modification de la réaction basique de précipitation qui repose sur la diffusion de la lumière par des complexes immuns solubles en solution. Le principe se repose sur la réaction entre la protéine à doser (ex : ferritine) et un antisérum spécifique. La protéine dans l'échantillon d'un patient réagit avec un antisérum néphélogétrie spécifique aux protéines humaines et comme résultat on a la formation des complexes insolubles(103). A la différence des turbidimètres, la mesure la lumière diffusée par les néphélogétries courants se fait perpendiculairement à la lumière incidente. La néphélogétrie est une modification de la détection de point final photo-optique dans laquelle la quantité de diffusion de la lumière à 90 degrés ou à

l'angle avant produite par les complexes immuns solubles est mesurée dans une cellule photoélectrique en tant que densité optique. Certains néphélomètres ont été conçus pour mesurer la lumière diffusée à un angle autre que 90 afin de tirer parti de l'intensité de diffusion vers l'avant accrue causée par la diffusion de la lumière à partir de particules plus grosses (par exemple, des complexes immuns) (96,104).

Une diode électroluminescente produit une lumière incidente à environ 600 nm, et un photodétecteur détecte les variations de diffusion de la lumière à 90 degrés (diffusion latérale) et 180 degrés (diffusion à l'angle avant). L'augmentation de la quantité de lumière diffusée sera proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'antigène. Dans les réactions de précipitation standard les concentrations d'antigène et d'anticorps doivent être équivalentes, néanmoins la néphélométrie donne souvent de meilleurs résultats avec un excès d'anticorps. Lors d'un dosage néphélométrique typique pour certaines protéines (ex : l'immunoglobuline) une courbe standard est développée en faisant réagir des concentrations croissantes de l'antigène (protéine) d'intérêt avec une grande quantité constante d'antisérum spécifique. Plus de lumière est diffusée en présence des quantités croissantes de complexes immuns, et l'intensité de la lumière diffusée est directement liée à la concentration d'antigène (protéine). La courbe de précipitation possède une zone d'excès d'anticorps dans laquelle l'antigène peut être mesuré avec précision, pour maintenir cette relation, une concentration d'antigène accrue nécessite des dilutions supplémentaires de l'échantillon. Néphélométrie à point final (ou à temps fixe) mesure la lumière diffusée maximale après qu'une réaction antigène-anticorps a atteint l'équilibre, ou après un temps de réaction fixe, tandis que fréquence ou néphélométrie cinétique est une méthode alternative dans laquelle le taux maximal de formation de complexes immuns est mesuré (104,105).



Les rayons lumineux sont collectés dans une lentille de focalisation et peuvent finalement être liés à la concentration d'antigène ou d'anticorps dans un échantillon.

Figure 24 : Principe de la néphélométrie pour la mesure des réactions antigène-anticorps (103)

Etant donné que le principe de conception d'un néphélomètre est similaire au principe de conception appliqué dans les mesures de fluorescence, l'utilisation des fluorimètres pour effectuer des mesures néphéométriques est souvent courante.

Néanmoins, vu la dépendance angulaire de l'intensité de diffusion de la lumière, la conception de néphélomètres spéciaux a été indispensable. Le détecteur PMT est placé par ces dispositifs à des angles appropriés par rapport au faisceau lumineux d'excitation. Ce qui diffère opérationnellement un fluorimètre d'un néphélomètre est le réglage des longueurs d'onde d'excitation et de détection. Dans le cas d'un néphélomètre le réglage des longueurs d'onde d'excitation et de détection d'un néphélomètre se fait sur la même valeur (96).

Les principales préoccupations de l'instrumentation de diffusion de la lumière sont : l'intensité d'excitation, la longueur d'onde, la distance du détecteur par rapport à la cuvette d'échantillon, la minimisation de la lumière parasite externe.

Les composants de base d'un néphélomètre comprennent : une source de lumière, une optique de collimation, une cellule d'échantillonnage. Sur le plan opérationnel, les composants optiques utilisés dans les turbidimètres et les néphélomètres sont similaires à ceux utilisés dans les fluorimètres ou les photomètres.

Les sources lumineuses les plus couramment utilisées sont des lampes halogène quartz des lampes xénon ou des lasers. Les lasers [He-Ne], qui fonctionnent à 633 nm, ont généralement été utilisés pour applications de diffusion de la lumière, telles que les dosages immunologiques néphélométriques et les déterminations de la taille et de la forme des particules.

A cause de sa haute intensité le faisceau laser est utilisé spécifiquement dans certains néphélomètres. Vu la nature cohérente de la lumière laser, elle est idéale pour les applications néphélométriques. De plus, les fluorimètres à rapport de référence sont bien adaptés aux mesures néphélométriques(96).

3.2.2.1. Avantages de la néphélométrie

La néphélométrie représente un système automatisé qui est rapide, reproductible, relativement simple à utiliser et courant dans les laboratoires à volume élevé(103).

3.2.3. Limitations des techniques de néphélométrie et de turbidimétrie(93,96)

Lors de l'utilisation des turbidimètres et des néphélomètres pour la mesure des analytes d'intérêt clinique, des limitations souvent rencontrées étaient l'excès d'antigène et les effets de matrice.

3.2.3.1. Risque de faux négatif par excès d'Ag

Les réactions antigène-anticorps sont complexes et d'elles obtiennent un mélange de tailles d'agrégats. Le signal dans ce cas émane d'un point situé dans la zone III de la courbe de précipitation mais est lu dans la zone I. On observe un biais important par défaut. L'augmentation du signal se fait au fur et à mesure que la turbidité augmente, lors de l'addition de l'antigène à l'anticorps. Après avoir atteint la valeur maximale, le signal diminue. Le point marquant le début de la décroissance indique le commencement de la phase d'excès d'antigène. En conséquence, les méthodes de diffusion de la lumière pour la quantification des réactions antigène-anticorps doivent inclure une méthode qui permet la détection de l'excès d'antigène. La cinétique de formation des complexes immuns mesurée par néphélométrie ou turbidimétrie est suffisamment différente dans

chacune des trois phases - excès d'anticorps, équivalence et excès d'antigène pour que des algorithmes informatiques aient été développés pour signaler automatiquement l'excès d'antigène. Pour les analytes présentant de fortes variations physiopathologiques, e.g. marqueurs tumoraux, étalées sur plusieurs ordres de magnitude, la vigilance est très importante.

Possibles Solutions

- Doser systématiquement sur 2 dilutions différentes (cette résolution implique une augmentation du coût).
- Être vigilant lors de la validation des résultats (chercher à se renseigner relativement à l'historique, et renseignements cliniques du patient).

3.2.3.2.Effets matrice

Les particules, les solvants et toutes les macromolécules sériques diffusent la lumière. Les macromolécules de l'échantillon, les lipoprotéines, les chylomicrons IC endogènes, agrégats d'Ig (particulièrement après plusieurs cycles de congélation/décongélation) de l'échantillon dans le sérum lipémique produisent la turbidité de fond ou l'intensité néphélométrique la plus élevée. Ces interférences augmentent la valeur du blanc échantillon diminuant ainsi la sensibilité du dosage et rendent l'interprétation des résultats difficiles ou impossible.

Quelles sont les parades possibles ?

- Travailler si possible sur des prélèvements à jeun et dilués. Utilisation des dilutions appropriées, qui rendent l'intensité relative de la diffusion de la lumière à partir d'un échantillon lipémique, inférieure à celle du blanc d'antisérum. Malgré cela, à mesure que la concentration de l'antigène dans le sérum diminue et que des échantillons plus concentrés sont utilisés, l'interférence de fond des échantillons lipémiques devient plus grande. L'utilisation de mesures de débit, où le blanc d'échantillon initial est éliminé, est la méthode qui permet de minimiser cette interférence de fond.
- Délipider préalablement (e.g. traité par LipoclearR).
- Filtrer les réactifs pour éliminer les poussières. Les grosses particules, telles que la poussière en suspension, provoquent également des interférences de fond importantes. Cette interférence de fond est contrôlée par filtration de tous les tampons et les antisérums dilués avant l'analyse.

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

- Faire des lectures en mode cinétique et/ou en bi-chromatisme.

Sensibilité insuffisante pour beaucoup de biomarqueurs présents à faible concentration.

Solutions possibles

- Améliorer la qualité de l'IS (titre et avidité).
- Utiliser des polymères ou des particules (latex) recouvertes d'Ac. Actuellement la sensibilité optimale est de l'ordre de 0,2 mg/L. Ce seuil annoncé pour le dosage ultrasensible de la CRP correspond pour cette protéine à une concentration d'environ 1,4 nM.
- Utiliser la néphélométrie.

3.2.3.3. Inconvénients de la néphélométrie

Malgré le fait que la néphélométrie présente une meilleure sensibilité et précision que la turbidimétrie pour la détection de certains biomarqueurs, elle comprend certains inconvénients tels que des coûts accrus pour les instruments et les réactifs (105,106) .

Tableau III : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de la turbidimétrie et de la néphélométrie

Tableau Récapitulatif			
Technique	Principe	Avantages	Inconvénients
Turbidimétrie	Mesure turbidité due à la formation de particules en solution.	<ul style="list-style-type: none">• Analyses plus rapides• Volume des tests élevés• Analyses à accès aléatoire	<ul style="list-style-type: none">• Sensibilité insuffisante pour certains biomarqueurs• Effets matrices• Risque de faux négatif par excès antigène.
Néphélométrie	Mesure de la lumière diffusée par des complexes immuns perpendiculairement à la lumière incidente.	<ul style="list-style-type: none">• Très bonne sensibilité	<ul style="list-style-type: none">• Coûts élevés• Réalisation des tests par lot• Effets matrices• Risque de faux négatif par excès d'antigène.

4. Immunoanalyses avec marqueur

La majorité des dosages de marqueurs biologiques actuellement installés sur les machines d'immunoanalyses sont basés sur la mesure d'un Ag (ou d'un Ac) à l'aide d'un repère préalablement fixé sur l'un des partenaires de la réaction Ag/Ac. Des nombreux progrès réalisés au cours de années ont été multidirectionnels : production d'ac de haute spécificité (ac monoclonal), d'ac de haute affinité et d'ac de faible immunogénicité, évolution des marqueurs isotopiques traditionnels vers des systèmes très sensibles basés sur l'amplification enzymatique couplée à la détection par chimiluminescence ou fluorescence.

4.1.Chimiluminescence

La chimiluminescence fait référence à l'émission de lumière produite lors d'une réaction chimique, lorsqu'un substrat se désintègre à un état fondamental à partir d'un état excité, le plus souvent une réaction d'oxydation. L'émission est lue avec un luminomètre ou peut être capturé sur un film photographique. Cette méthode a une sensibilité et une plage dynamique excellentes. Elle ne nécessite pas de rayonnement d'échantillon et l'excitation non sélective et l'instabilité de la source sont éliminées. La chimiluminescence est une technique d'analyse très sensible et largement utilisée dans les dosages immunologiques automatisés ; puisque l'émission de lumière peut être détectée à des niveaux très faibles, et il y a peu de molécules naturelles qui émettent de la lumière sous la condition utilisée pour la chimiluminescence, conduisant à des bruits de fond très faibles. Les lectures chimiluminescentes peuvent utiliser soit une lecture chimiluminescente d'un dosage enzymatique ou un anticorps marqué directement par chimiluminescence. La plupart des réactifs et conjugués chimiluminescents sont stables et relativement non toxiques. Dans les dosages immunologiques, les marqueurs chimiluminescents peuvent être attachés à un antigène ou à un anticorps. Le plus commun des composés chimiluminescents sont des esters d'acridinium et des dérivés d'isoluminol, tous deux sont excités par la soude et le peroxyde d'hydrogène. Les esters d'acridinium sont des marqueurs d'activité hautement spécifiques qui peuvent être utilisés pour marquer des anticorps et des haptènes. Les marqueurs chimiluminescents sont utilisés pour détecter des protéines, des virus, des oligonucléotides et des séquences d'acides nucléiques génomiques (107). Les avantages des tests de chimiluminescence comprennent la détection sous-picomolaire, la vitesse (avec des réactions de type flash, la lumière n'est mesurée que pendant 10

secondes), facilité d'utilisation (la plupart des tests sont des procédures en une étape) et instrumentation simple.

Le principal inconvénient est que les impuretés peuvent provoquer un signal de fond qui dégrade la sensibilité et la spécificité(108).

4.1.1. Dosage immunoenzymatique par chimiluminescence (99)

Les CLEIA (Chemiluminescence enzyme immunoassay) utilisent des substrats chimioluminescents qui réagissent avec diverses enzymes utilisées comme marqueurs. Semblable à la bioluminescence, qui utilise des substrats naturels comme la luciférine-adénosine triphosphate pour produire de la lumière, la réaction enzymatique chimiluminescente génère de la lumière. La chimiluminescence dans les immunoessais a reçu beaucoup d'attention au cours des 20 dernières années, et une gamme de systèmes basés sur des substrats et des enzymes ont été créés.

Actuellement, des dosages immunologiques hautement sensibles sont réalisés en utilisant des dérivés de luminol comme activateur de la peroxydase ou des dérivés de dioxétane comme activateur de la phosphatase alcaline. Ces tests sont des outils utiles pour diagnostiquer dans le monde réel. Cette méthode s'est longtemps appuyé sur l'oxydation enzymatique des analogues du luminol.

Dans le dosage immunoenzymatique par chimiluminescence l'AMPPD est utilisé comme substrat et réagit avec la phosphatase alcaline qui est utilisé comme un marqueur enzymatique. Un appareil entièrement automatisé peut être utilisé pour effectuer cette réaction. Le développement d'un système d'immunodosage enzymatique chimiluminescent très sensible a été rendu possible grâce à ce substrat unique. En tant que phase solide, les particules de ferrite d'un diamètre de 0,3 μm réduisent le temps d'immunoréaction à moins de 30 minutes et augmentent la surface de l'immunoabsorbant.

Le signal chimiluminescent et la concentration d'analyte ont une relation linéaire jusqu'à environ sept ordres de plage dynamique. Lorsque l'AFP a été mesurée, la sensibilité du CLEIA était 10 fois supérieure à celle des RIA traditionnels ; L'AFP a été détectée à un niveau de 30 pg/mL avec une durée de test de 30 minutes.

4.1.2. Esters d'acridinium en tant qu'étiquettes dans un test immunochimiluminescent(95)

Les esters d'acridinium sont directement conjugués avec des molécules protéiques dans cette approche. Dans des conditions alcalines, les esters d'acridinium peuvent réagir par oxydation avec H₂O₂ pour former des intermédiaires à haute énergie qui se décomposent en fragment excité, générant de la lumière. L'émission de lumière des esters d'acridinium se produit très rapidement, dans les 5 à 10 secondes suivant le début de l'événement d'oxydation. Le spectre d'émission de lumière par rapport au temps de réaction dans la chimiluminescence de type flash est sensiblement plus raide que dans la chimiluminescence de type luminescent déclenchée par des enzymes.

Ce test a une sensibilité plus élevée que le RIA (radioimmunoassay) et nécessite moins de temps pour le test. Des modifications de la molécule et de la chimie de conjugaison ont augmenté la solubilité des esters d'acridinium et la stabilité au stockage des conjugués avec des protéines. Le dosage des haptènes, comme les hormones, est susceptible de s'améliorer grâce à cette technologie.

4.1.3. L'immunodosage électrochimiluminescent (99)

L'immunodosage électrochimiluminescent (ECLIA) utilise des produits chimiques électrochimiques qui produisent de la lumière électrochimiquement et sont liés à la réaction du cycle de réduction oxydative. Il a été possible d'utiliser la technologie électrochimiluminescente pour les dosages immunologiques après avoir optimisé les solutions de réaction, sélectionné un processus de conjugaison adéquat et développé des produits chimiques appropriés tels que complexe - Ruthenium Ru (bpy)₃²⁺ (Tris (bipyridine) ruthenium (II) chloride) et tripropylamine (TPA) .

L'efficacité de la création de lumière (rendement quantique) est déterminée par la distance entre l'électrode et le conjugué, et donc par la mobilité de diffusion du conjugué. Suite à l'immunoréaction, les conjugués libres peuvent générer plus de lumière que les conjugués fixés à la phase solide. Cela facilite l'accès au format de test homogène, mais le bruit de fond relativement important, comme dans d'autres tests homogènes, interfère avec la sensibilité du test.

Voici la méthodologie de dosage pour déterminer les analytes : pour l'immunoréaction, des microparticules magnétiques recouvertes d'anticorps servent de phase solide, tandis que l'échantillon sert de phase liquide. La suspension en phase solide est injectée dans le détecteur

avec l'électrode pour mesurer la chimioluminescence après lavage pour les conjugués liés et libres par séparation magnétique selon le format de dosage. Il a été rapporté que les ECLIA avaient des limites de détection de 0,2 à 0,4 ng/mL pour le dosage du carcinome embryonnaire. Ce dosage ne nécessite pas l'utilisation d'appareillage complexe. Un autre avantage est que, les ECLIA nécessitent moins de temps pour la détection du signal.

5. Intervalles de référence

Les intervalles de référence sont dérivés de populations qui semblent être en bonne santé et ont deux limites (limites inférieure et supérieure). La Fédération internationale de chimie clinique (IFCC) a établi la théorie des intervalles de référence en 1987, et l'Institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI) fournit des lignes directrices pour établir et vérifier les intervalles de référence. Ces directives couvrent des sujets tels que la sélection des sujets de référence, les méthodes statistiques, y compris les exigences de taille d'échantillon, les méthodes de regroupement des résultats par catégories telles que l'âge et le sexe, et les méthodes de détection et de suppression des valeurs aberrantes (109).

Les intervalles de référence diffèrent des limites de décision. Les limites de prise de décision fournissent un (ou plusieurs) seuils pour distinguer ceux qui sont malades de ceux qui ne le sont pas. Selon une hiérarchie de qualité récemment publiée, les limites de décision basées sur les études de résultats cliniques sont considérées comme étant de la plus haute qualité ; ceux-ci sont suivis d'intervalles de référence et de valeurs seuils basés sur des opinions de cliniciens ou des recommandations professionnelles publiées (109).

Les intervalles de référence et les seuils de diagnostic publiés, recommandés par les différents fabricants d'immunodosages de la ferritine, et ceux utilisés dans les laboratoires varient nettement. Cette diversité est due à un large éventail de seuils et d'approches de leur définition. Cela peut être attribué à différents facteurs :

- Les laboratoires définissent les intervalles de référence différemment (p. ex., 2,5 % à 97,5 % ou 5 % à 95 % ou moyenne \pm 1 ou 2 SD). Les intervalles de référence sont dérivés d'échantillons provenant de la communauté ou de laboratoires de référence (avec des populations différentes), et les valeurs en dehors de cet intervalle sont considérées comme une déficience ou une surcharge pathologique en Fe plutôt que comme des seuils définis par leur capacité à détecter

des états pathologiques dans des études de précision diagnostique correctement conçues. Par exemple, certains fabricants et laboratoires définissent une plage normale comme la concentration de ferritine trouvée chez des sujets non sélectionnés, apparemment normaux. Or, une partie de la population normale, en particulier les jeunes femmes, n'ont quasiment pas de stockage de Fe sans être anémiques. La plage normale chez les jeunes femmes inclura donc les concentrations de ferritine trouvées dans la carence en Fe. De plus, avec l'épidémie émergente d'obésité, cette plage normale inclura également une proportion de la population qui a des concentrations élevées de ferritine liées à un indice de masse corporelle élevé. Ainsi, à l'instar des concentrations lipidiques, un intervalle de référence pour la ferritine, basée uniquement sur la population adulte, peut ne pas convenir et doit être remplacée par une valeur seuil diagnostique inférieure et supérieure basée sur des estimations de risque. En utilisant des intervalles de référence basés sur la population, ce risque peut être caché dans la ou les parties extérieures de l'intervalle de référence conventionnel. Pour pouvoir faire face à ce problème plusieurs études ont été réalisées afin de pouvoir établir des valeurs convenables en fonction et de l'âge (110) du pays. Comme exemple nous avons : Parkin PC, Hamid J, Borkhoff CM, et al qui ont établi des intervalles de référence pour évaluer le statut en fer chez les enfants de moins de 10 ans en utilisant les lignes directrices du (CLSI) Clinical and laboratory standards institut (109). Daniel Kin-Ho Yeung, John Kam-On Chung et al qui ont réalisé une étude dans l'objectif de comparer les intervalles de référence recommandés par l'OMS et les différents fabricants de réactifs et leur niveau applicabilité à la population chinoise en Hong Kong (111). Omuse G, Ichihara K, Maina D, Hoffman M, Kagotho E, Kanyua A, et al. qui ont établi les intervalles de référence pour la ferritine des adultes Kenyans âgées entre 18 et 68 ans (112).

- Des valeurs qui sont aggravées par la variation et l'évolution des techniques et des plateformes de dosage et l'utilisation limitée des matériaux de référence de l'OMS. La standardisation de la ferritine pose des problèmes car différents laboratoires évaluent différentes isoformes de ferritine et utilisent différents anticorps et standards dans les dosages immunologiques, ce qui complique et peut induire en erreur l'interprétation et la comparabilité des résultats.

Les concentrations sériques de ferritine sont généralement comprises entre 12 et 300 g/L, et elles sont plus faibles chez l'enfant (surtout ceux âgés de plus de 6 mois) que chez l'adulte. Les valeurs moyennes sont plus faibles chez les femmes avant la ménopause que chez les hommes,

indiquant des réserves de Fe plus faibles chez les femmes en raison des pertes menstruelles et de l'accouchement. Les différences de concentration de ferritine sérique au cours du développement, de la naissance à la vieillesse, reflètent les variations de Fe stocké dans les tissus.

La plupart des publications s'accordent à dire que des concentrations de ferritine inférieures à 12 à 30 $\mu\text{g/L}$ identifient une carence absolue en Fe. Dans les populations exposées aux infections et chez les patients souffrant d'insuffisance rénale, de maladies inflammatoires de l'intestin, d'insuffisance cardiaque chronique ou d'autres maladies inflammatoires (de bas grade), les valeurs seuils indiquant une carence en Fe sont généralement considérées comme plus élevées que chez les personnes sans ces maladies.

Dans ces situations, des concentrations supérieures à 100 $\mu\text{g/L}$ excluent généralement une carence absolue en Fe, et pour des concentrations comprises entre 30 et 100 $\mu\text{g/L}$, d'autres paramètres sont nécessaires pour diagnostiquer une carence en Fe. Des valeurs supérieures à 200 et 300 $\mu\text{g/L}$ sont souvent appliquées, respectivement pour les femmes et les hommes, pour définir la surcharge en Fe (97).

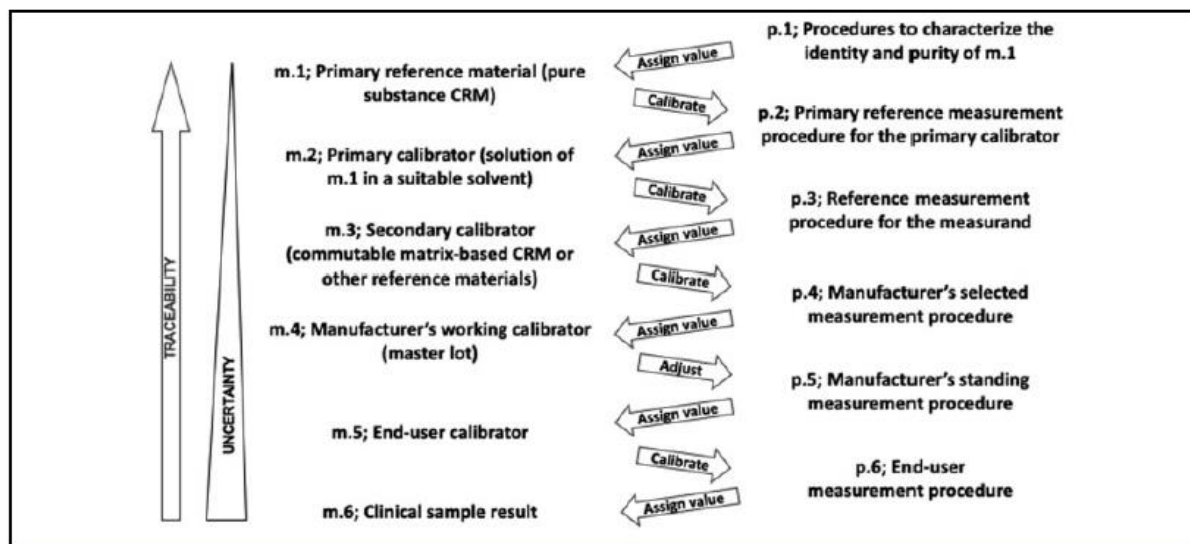
6. Standardisation

Le terme « harmonisation » fait référence à tout processus permettant d'établir l'équivalence des valeurs déclarées entre les différents utilisateurs finaux des procédures de mesure. Le terme « standardisation » fait référence à la réalisation d'une harmonisation par la traçabilité métrologique des résultats des patients à des matériaux de référence d'ordre supérieur et/ou à des procédures de mesure de référence.

L'harmonisation des résultats entre les différentes procédures de mesure est une caractéristique essentielle lors de l'utilisation des valeurs de décision médicale des lignes directrices de pratique clinique. Des résultats harmonisés sont également nécessaires pour permettre l'utilisation d'intervalles de référence communs pour différentes procédures de mesure lorsque les valeurs de décision basées sur des critères cliniques lignes directrices ne sont pas disponibles.

6.1. Traçabilité métrologique et hiérarchies d'étalonnage

La norme ISO 17511:2020 de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) décrit 6 catégories de hiérarchies d'étalonnage métrologiquement traçables pour les utilisateurs finaux des procédures de mesure, dont 5 sont capables d'obtenir des résultats harmonisés ou standardisés pour le même mesurant parmi différents utilisateurs finaux. La catégorie la plus souhaitable pour la traçabilité métrologique est la hiérarchie d'étalonnage pour l'utilisateur final des procédures de mesure qui fournissent la traçabilité des résultats d'échantillons cliniques à un matériel de référence et une procédure de mesure de référence primaires, comme indiqué dans Fig 25. Les termes p.1, p.2, etc., et m.1, m.2, etc., sont utilisés pour désigner respectivement les procédures et les matériaux dans la hiérarchie d'étalonnage (113).



Les termes p.1, p.2, etc., et m.1, m.2, etc., sont utilisés pour désigner la séquence alternée de procédures et de matériaux, respectivement, dans la hiérarchie d'étalonnage.

Figure 25 : Une hiérarchie d'étalonnage complète avec une traçabilité métrologique au SI(113)

Depuis les années 1970, les résultats des dosages de la ferritine dans le sang varient considérablement selon le type d'isoferritine de la ferritine marquée, la spécificité des anticorps et le type de ferritine utilisé comme étalon. Étant donné que la faible comparabilité des résultats analytiques est susceptible de brouiller l'interprétation des données rapportées, un projet de développement d'un matériau de référence pour la ferritine a été lancé dans les années 1980 ; afin de garantir une interprétation plus significative des données rapportées et assurer une meilleure

comparabilité des résultats analytiques des différentes méthodes de dosages provenant des différents laboratoires. Cela a conduit à la publication de trois préparations, établies par la suite comme étalons internationaux (IS) par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Le premier IS (international standards) pour la ferritine (foie humain, code 80/602) a été établi en 1985. Sept ans après, il a été remplacé par le deuxième IS (rate humaine, code 80/578). Malheureusement la chaîne de traçabilité a été interrompue, de ce fait la valeur de ce dernier n'était pas tracée jusqu'au 1er IS. Alors une nouvelle chaîne de traçabilité a dû être mise en place, augmentant les valeurs de ferritine de 5 % à 10 % si le deuxième IS était utilisé pour l'étalonnage. Le deuxième IS a été remplacé par le troisième IS pour la ferritine (chaîne L recombinante, code 94/572) en 1997. Cette fois, la valeur de ferritine attribuée au 3e SI était traçable au 2e SI, de sorte que la continuité entre les deux matériaux était garantie et la chaîne de traçabilité ayant en tête le 2e SI définitivement établie compte tenu de l'approvisionnement illimité en matériel recombinant. À cette époque, la valeur de ferritine attribuée au troisième SI traçable au deuxième SI, de sorte que la continuité entre les deux matières est garantie et que la chaîne de traçabilité reste intacte. En 1999, les exigences en matière de traçabilité des tests, telles que décrites dans la directive de la Communauté européenne sur le diagnostic in vitro, ont incité les fabricants à aligner leurs systèmes analytiques sur l'étalon d'ordre supérieur, le troisième IS (97,114).

7. Comparaison entre les différentes techniques

Une autre étape importante dans le développement des méthodes de détermination de la ferritine a été l'automatisation. Les méthodes radioactives ont débuté artisanalement dans quelques laboratoires, suivies quelques années plus tard par des tests colorimétriques. Les deux méthodologies ont été améliorées et commercialisées, les rendant largement disponibles. Plus récemment, des équipements automatisés permettant le dosage de divers métabolites, dont la ferritine, ont été développés. La méthode de détection de ces équipements varie, mais repose principalement sur la turbidimétrie et la chimiluminescence.

Publié en 2018 une revue systématique intitulée « Performance and comparability of laboratory methods for measuring ferritin concentrations in human serum or plasma » avait comme objectif l'évaluation de l'exactitude et la comparabilité des méthodes les plus utilisées pour la détection de la ferritine ; 252 études ont été évaluées, dont 187 études dans l'analyse qualitative et 148 dans la méta-analyse, les méthodes les plus utilisées comprenaient les tests radiométriques,

non radiométriques et d'agglutination. L'analyse comprenait la comparaison entre au moins 2 méthodes détaillant : la sensibilité, la précision et l'exactitude.

Cette étude comparative avait des limites. Il était impossible d'identifier une méthode de référence pour les dosages de la ferritine. Cela a éliminé la possibilité de comparer les méthodes de ferritine à une méthode de référence. Au lieu de cela, les performances des méthodes individuelles et les comparaisons entre toutes les méthodes disponibles contenant des données cohérentes ont été analysées.

A la fin il a été possible de démontrer que les méthodes de laboratoire les plus utilisées pour déterminer les concentrations de ferritine ont une précision et des performances comparables, néanmoins il n'y a pas de méthode de laboratoire préférée/recommandée. Ces résultats sont en accord avec notre mémoire (115).

Une autre étude a été réalisée plus récemment en 2021 par Dahman, LS et All comparant 3 méthodes de laboratoire différentes, qui mesurent la ferritine sérique : un dosage immuno-enzymatique (ELISA) par rapport à des méthodes à des méthodes d'immunochimiluminescence (Cobas e411)* et d'immunoturbidimétrie (Cobas Integra 400)* en termes de sensibilité, de spécificité et de précision, et si elles peuvent être utilisées de manière interchangeable. En conclusion les auteurs ont affirmé que les différences dans les niveaux de ferritine sérique reflètent probablement les différentes isoformes de ferritine, les anticorps et les calibrateurs utilisés dans les tests par différents laboratoires. Cependant, les concentrations sériques de ferritine mesurées par les méthodes (Cobas e411)* et (Cobas Integra 400)* était fortement corrélées aux résultats ELISA, avec une sensibilité, une spécificité et une précision supérieures ; toute fois des investigations supplémentaires avec des échantillons plus importants sont nécessaires pour une meilleure précision, des résultats plus précis et pour déterminer s'ils peuvent être utilisés de manière interchangeable (116).

Conclusion

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

L'anémie touche 1,8 milliards de personnes dans le monde. L'OMS estime que 40% des femmes enceintes et 42% des enfants ayant moins de 5 ans sont atteints de l'anémie (117). Cette pathologie a des énormes conséquences sur la qualité de vie et la productivité de l'individu. L'anémie ferriprive est la plus courante des anémies.

La ferritine est le biomarqueur le plus fiable et le plus demandé par le clinicien lors du diagnostic de la carence martiale. Depuis sa découverte en 1937 elle a vite remplacé d'autres biomarqueurs de carence martiale tels que le coefficient de saturation de la transferrine et le fer sérique. La ferritine est aussi cruciale dans le diagnostic des hyperferritinémies tels que l'hémochromatose.

Plusieurs techniques permettent le dosage de la ferritine sérique, toutes fois les plus utilisées de nos jours sont la turbidimétrie et la chimiluminescence.

Malgré des énormes avancées en terme d'amélioration de la qualité au cours des dernières années, les laboratoires cliniques subissent toujours une pression croissante pour atteindre l'efficacité, la rapidité et la sécurité (118).

Toute technique détaillée dans cette thèse présente une bonne efficacité et sensibilité. Pour permettre une meilleure comparaison entre les différentes techniques de dosage, l'OMS a établi 3 étalons internationaux et le quatrième est en cours de réalisation.

Néanmoins les résultats du dosage de la ferritine présentent toujours des variations du à l'existence d'énormes isoformes de la ferritine, et l'utilisation des différents anticorps et calibrateurs dans les tests par différents laboratoires. Du à cela et un manque d'une technique de référence permettant le dosage de la ferritine il est difficile d'estimer laquelle des techniques est la meilleure.

Lors du suivi d'un patient il est conseillé d'utiliser toujours la même technique de dosage.

Références

1. Gudjoncik A. Marqueurs du métabolisme du fer et dérivés de la L-arginine dans la cardiopathie ischémique : mise en évidence, intérêt de leur évaluation et rôle du stress oxydant en phase aiguë d'infarctus du myocarde. Université de Grenoble. :247.
2. Iwasaki K, Ray PD, Huang BW, Sakamoto K, Kobayashi T, Tsuji Y. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Ferritin H Gene Expression by Resveratrol in Human T Cells. *Biochemistry*. 30 juill 2013;52(30):5075-83.
3. Gore GC, Jones J. Systematic Reviews and Librarians: A Primer for Managers. *Partnership [Internet]*. 10 juill 2015;10(1). Disponible sur: <https://journal.lib.uoguelph.ca/index.php/perj/article/view/3343>
4. Fovet-Rabot C. Rédiger un article de synthèse (review paper), en 7 points. 2019;6.
5. Bouti K. How to Write a Case Report. *Integr J Med Sci [Internet]*. 17 déc 2018 [cité 9 juin 2022];5. Disponible sur: <https://mbmj.org/index.php/ijms/article/view/121>
6. Baudin B. Homéostasie du fer et aspects nutritionnels. *Revue Francophone des Laboratoires*. mai 2012;2012(442):55-9.
7. Belot A. Régulation du métabolisme du fer et nouvelles stratégies thérapeutiques. Université de TOULOUSE; 2020.
8. Cacoub P. La carence martiale et son traitement. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. juin 2012;47(3):134-8.
9. Vallet N. Rôle de l'érythroferrone dans le métabolisme du fer : des résultats expérimentaux aux modèles physiopathologiques. *La Revue de Médecine Interne*. mars 2018;39(3):178-84.
10. Arlet JB, Pouchot J, Lasocki S, Beaumont C, Hermine O. Supplémentation en fer : indications, limites et modalités. *La Revue de Médecine Interne*. janv 2013;34(1):26-31.
11. Cozon GJN. Carence en fer et troubles digestifs. *Transfusion Clinique et Biologique*. nov 2014;21(4-5):189-92.
12. Gigliotti P. ESTUDO DO METABOLISMO DO FERRO. :7.
13. Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. :12.
14. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. févr 2020;105(2):260-72.
15. Vaulont S. Métabolisme du fer. *Archives de Pédiatrie*. mai 2017;24(5):5S32-9.
16. Negri JL. Metabolismo do ferro e eritropoiese. :10.

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

17. Prentice AM. Clinical Implications of New Insights into Hepcidin-Mediated Regulation of Iron Absorption and Metabolism. *Ann Nutr Metab.* 2017;71(Suppl. 3):40-8.
18. Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* juin 2012;26(2-3):115-9.
19. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* déc 2017;106(Supplement 6):1559S-1566S.
20. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life.* juin 2017;69(6):399-413.
21. Pizarro F, Olivares M, Hertrampf E. Heme-Iron Absorption Is Saturable by Heme-Iron Dose in Women. :4.
22. Milman NT. A Review of Nutrients and Compounds, Which Promote or Inhibit Intestinal Iron Absorption: Making a Platform for Dietary Measures That Can Reduce Iron Uptake in Patients with Genetic Haemochromatosis. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 14 sept 2020;2020:1-15.
23. Bonaccorsi di Patti MC, Polticelli F, Cece G, Cutone A, Felici F, Persichini T, et al. A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *FEBS J.* juin 2014;281(12):2851-60.
24. Kasvosve I. Effect of ferroportin polymorphism on iron homeostasis and infection. *Clinica Chimica Acta.* févr 2013;416:20-5.
25. Beaumont C, Karim Z. Actualité du métabolisme du fer. *La Revue de Médecine Interne.* janv 2013;34(1):17-25.
26. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer.* mai 2013;13(5):342-55.
27. Brissot P, Brissot É. How we interpret transferrin saturation. *Hématologie.* nov 2017;23(6):406-12.
28. Grandchamp Desraux B. *Metabolisme du fer: physiologie et pathologie.* Paris: Bioforma; 2011.
29. El Manouni O. *Anomalies du métabolisme du fer.* [Rabat]: Université Mohammed V Rabat - Faculté de Médecine et de Pharmacie; 2020.
30. AZZA H. *La surcharge en fer.* [Rabat]: Université Mohammed V de Rabat Faculté de Médecine et de Pharmacie- RABAT; 2017.
31. Ganz T. Macrophages and Systemic Iron Homeostasis. *J Innate Immun.* 2012;4(5-6):446-53.

32. Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 15 août 2014;307(4):G397-409.
33. Lefebvre T, Lasocki S, Fénéant-Thibault M, Lamy PJ, Cunat S, Ropert-Bouchet M, et al. Added value of hepcidin quantification for the diagnosis and follow-up of anemia-related diseases. *Annales de biologie clinique*. janv 2017;75(1):9-18.
34. Zhou ZD, Tan EK. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegeneration*. déc 2017;12(1):75.
35. Malerba M, Peyssonnaud C. Rôle de l'hepcidine dans les infections cutanées. *Med Sci (Paris)*. mars 2020;36(3):222-4.
36. Lasocki S. Fer et inflammation, mariage impossible ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. juin 2012;47(3):125-33.
37. Antunes SA, Canziani MEF. Hepcidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease. *Jornal Brasileiro de Nefrologia [Internet]*. 2016 [cité 10 févr 2022];38(3). Disponible sur: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002016000300351
38. Cioccia AM, Hevia P. Papel de la hepcidina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro. (Revisión). :21.
39. Katsarou MS, Pappasavva M, Latsi R, Drakoulis N. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. In: *Vitamins and Hormones [Internet]*. Elsevier; 2019 [cité 24 févr 2022]. p. 201-22. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008367291930010X>
40. Auerbach M, Adamson JW. How we diagnose and treat iron deficiency anemia: Diagnose and treat iron deficiency anemia. *Am J Hematol*. janv 2016;91(1):31-8.
41. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Reviews*. juill 2017;31(4):225-33.
42. Anemia: Clinical Approach Algorithm | Flowchart Diagram - Medical case consultation - www.MedicalTalk.Net the Best Medical Forum for Medical Students and Doctors Worldwide [Internet]. [cité 11 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.medicaltalk.net/t/anemia-clinical-approach-algorithm-flowchart-diagram/7525>
43. Johnson-Wimbley TD, Graham DY. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap Adv Gastroenterol*. mai 2011;4(3):177-84.
44. CIANGURA C, DAVID DJ, LEE-ROBIN SH, BENE MC, ROUDOT-THORAVAL F, LASCOLS S, et al. Choix des examens du métabolisme du fer en cas de suspicion de carence en fer. *Haute Autorité de Santé/Service évaluation des actes professionnels*; 2011 mars.

45. Arup Laboratoires. Anemia Testing Algorithm | Choose the Right Test [Internet]. 2019 [cité 5 mai 2022]. Disponible sur: <https://arupconsult.com/algorithm/anemia-testing-algorithm>
46. Safiri S, Kolahi AA, Noori M, Nejadghaderi SA, Karamzad N, Bragazzi NL, et al. Burden of anemia and its underlying causes in 204 countries and territories, 1990–2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. *J Hematol Oncol*. déc 2021;14(1):185.
47. Appui à la politique du Maroc pour lutter contre les carences en micronutriments [Internet]. IAEA; 2018 [cité 11 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.iaea.org/fr/newscenter/news/appui-a-la-politique-du-maroc-pour-lutter-contre-les-carences-en-micronutriments>
48. Zinebi A, Eddou H, Moudden KM, Elbaaj M. Profil étiologique des anémies dans un service de médecine interne. *The Pan African Medical Journal* [Internet]. 4 janv 2017 [cité 11 mai 2022];26(10). Disponible sur: <https://www.panafrican-med-journal.com/content/article/26/10/full>
49. Jimenez K, Kulnigg-Dabsch S, Gasche C. Management of Iron Deficiency Anemia. :10.
50. Balarajan Y, Ramakrishnan U, Özaltın E, Shankar AH, Subramanian S. Anaemia in low-income and middle-income countries. *The Lancet*. déc 2011;378(9809):2123-35.
51. Ouzennou N, Tikert K, Belkedim G, Jarhmouti FE. Prévalence et déterminants sociaux de l'anémie chez les femmes enceintes dans la Province d'Essaouira, Maroc: *Santé Publique*. 19 déc 2018;Vol. 30(5):737-45.
52. KAZOUINI I. Les anémies en Médecine interne : Expérience du service de Médecine interne de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech (Expérience de 10 ans). [Marrakech]: Université Cadi Ayyad; 2021.
53. Celi J, Reny JL, Perrier A, Samii K. Anémie ferriprive, inflammatoire ou mixte : comment orienter le diagnostic ? *Revue Medicale Suisse* [Internet]. 2011 [cité 12 juill 2022];(313). Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2011/revue-medicale-suisse-313/anemie-ferriprive-inflammatoire-ou-mixte-comment-orienter-le-diagnostic>
54. Golfeyz S, Lewis S, Weisberg IS. Hemochromatosis: pathophysiology, evaluation, and management of hepatic iron overload with a focus on MRI. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 3 août 2018;12(8):767-78.
55. Holland J, Fernandes ABB. HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA. São Paulo. :16.
56. Salgia RJ, Brown K. Diagnosis and Management of Hereditary Hemochromatosis. *Clinics in Liver Disease*. févr 2015;19(1):187-98.
57. Kowdley KV, Brown KE, Ahn J, Sundaram V. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. *Am J Gastroenterol*. août 2019;114(8):1202-18.
58. Aymone WC, Valiati V. Hemocromatose hereditária. 2013;101(6):7.

59. Banaszekiewicz K, Sikorska K, Panas D, Sworczak K. The Role of the Trabecular Bone Score in the Assessment of Osteoarticular Disorders in Patients with HFE-Hemochromatosis: A Single-Center Study from Poland. *Genes*. 25 août 2021;12(9):1304.
60. Yévenes A. The Ferritin Superfamily. In: Harris JR, Marles-Wright J, éditeurs. *Macromolecular Protein Complexes* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cité 1 févr 2022]. p. 75-102. (Subcellular Biochemistry; vol. 83). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-46503-6_3
61. Perrett S, Buell AK, Knowles TPJ, éditeurs. *Biological and Bio-inspired Nanomaterials: Properties and Assembly Mechanisms* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cité 29 janv 2022]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1174). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9791-2>
62. Liu Y, Yang R, Liu J, Meng D, Zhou Z, Zhang Y, et al. Fabrication, structure, and function evaluation of the ferritin based nano-carrier for food bioactive compounds. *Food Chemistry*. nov 2019;299:125097.
63. Biamonte F, Zolea F, Bisognin A, Di Sanzo M, Saccoman C, Scumaci D, et al. H-Ferritin-Regulated MicroRNAs Modulate Gene Expression in K562 Cells. Pantopoulos K, éditeur. *PLoS ONE*. 27 mars 2015;10(3):e0122105.
64. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 15 mai 2002;99(10):3505-16.
65. Levi S, Rovida E. Neuroferritinopathy: From ferritin structure modification to pathogenetic mechanism. *Neurobiology of Disease*. sept 2015;81:134-43.
66. Huan H, Jiang Q, Wu Y, Qiu X, Lu C, Su C, et al. Structure determination of ferritin from *Dendrorhynchus zhejiangensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. oct 2020;531(2):195-202.
67. Beck T, Tetter S, Künzle M, Hilvert D. Construction of Matryoshka-Type Structures from Supercharged Protein Nanocages. *Angew Chem Int Ed*. 12 janv 2015;54(3):937-40.
68. Plays M, Müller S, Rodriguez R. Chemistry and biology of ferritin. *Metallomics*. 12 mai 2021;13(5):mfab021.
69. Yang R, Zhou Z, Sun G, Gao Y, Xu J. Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*. août 2015;44(2):189-200.
70. Carmona F, Poli M, Bertuzzi M, Gianoncelli A, Gangemi F, Arosio P. Study of ferritin self-assembly and heteropolymer formation by the use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) technology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. mars 2017;1861(3):522-32.

71. McManus JJ, Charbonneau P, Zaccarelli E, Asherie N. The physics of protein self-assembly. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. avr 2016;22:73-9.
72. Truffi M, Fiandra L, Sorrentino L, Monieri M, Corsi F, Mazzucchelli S. Ferritin nanocages: A biological platform for drug delivery, imaging and theranostics in cancer. *Pharmacological Research*. mai 2016; 107:57-65.
73. Huang BW, Miyazawa M, Tsuji Y. Distinct regulatory mechanisms of the human ferritin gene by hypoxia and hypoxia mimetic cobalt chloride at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Cellular Signalling*. déc 2014;26(12):2702-9.
74. Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*. juin 2017;69(6):414-22.
75. Cullis JO, Fitzsimons EJ, Griffiths WJ, Tsochatzis E, Thomas DW, the British Society for Haematology. Investigation and management of a raised serum ferritin. *Br J Haematol*. mai 2018;181(3):331-40.
76. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol*. oct 2013;13(10):722-37.
77. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Arencibia MG, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science*. 17 juin 2011 ;332(6036):1429-33.
78. Su T, Li X, Yang M, Shao Q, Zhao Y, Ma C, et al. Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Front Plant Sci*. 28 févr 2020; 11:164.
79. Buschiazzo A, Yefimova M, Bourmeyster N, Fautrel A, Burel A, Neyroud AS, et al. Autophagie et spermatozoïde. *Med Sci (Paris)*. nov 2019;35(11):852-8.
80. Joffre C, Djavaheri-Mergny M, Pattingre S, Giuriato S. L'autophagie : le yin et le yang des cancers. *Med Sci (Paris)*. mars 2017;33(3):328-34.
81. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, et al. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*. 2 juin 2016;85(1):685-713.
82. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20 janv 2014;20(3):460-73.
83. Klionsky DJ, Codogno P. The Mechanism and Physiological Function of Macroautophagy. *J Innate Immun*. 2013;5(5):427-33.
84. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent and Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*. janv 2016;26(1):6-16.

85. Mancias JD, Pontano Vaites L, Nissim S, Biancur DE, Kim AJ, Wang X, et al. Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis. *eLife*. 5 oct 2015;4:e10308.
86. Theil EC, Le Brun NE. Fe Transport and Storage Related to Humans and Pathogens and Oxygen. In: *Comprehensive Inorganic Chemistry II* [Internet]. Elsevier; 2013 [cité 3 févr 2022]. p. 21-33. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080977744003028>
87. Fujimaki M, Furuya N, Saiki S, Amo T, Imamichi Y, Hattori N. Iron Supply via NCOA4-Mediated Ferritin Degradation Maintains Mitochondrial Functions. *Mol Cell Biol* [Internet]. 15 juill 2019 [cité 3 févr 2022];39(14). Disponible sur : <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.00010-19>
88. Santana-Codina N, Mancias J. The Role of NCOA4-Mediated Ferritinophagy in Health and Disease. *Pharmaceuticals*. 23 oct 2018 ;11(4):114.
89. Hamai A, Mehrpour M. Homéostasie du fer et autophagie. *Med Sci (Paris)*. mars 2017;33(3):260-7.
90. Hoofnagle AN. Harmonization of blood-based indicators of iron status: making the hard work matter. *Am J Clin Nutr*. déc 2017;106(Supplement 6):1615S-1619S.
91. ABROUKI FE. Les D Dimères : Techniques de Dosage. [Rabat]: Université Mohammed V Rabat - Faculté de Médecine et de Pharmacie; 2013.
92. Cullis JO, Fitzsimons EJ, Griffiths WJ, Tsochatzis E, Thomas DW, the British Society for Haematology. Investigation and management of a raised serum ferritin. *Br J Haematol*. mai 2018;181(3):331-40.
93. Durand G, Beaudoux JL. Biochimie médicale : marqueurs actuels et perspectives. *Annales de biologie clinique*. juill 2009;67(4):487-487.
94. Baudin B, Pilon A. Interférences et pièges en immuno-analyse. *Revue Francophone des Laboratoires*. mars 2019;2019(510):60-6.
95. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 2017 ;1823.
96. Kricka LJ, Park JY. Assay Principles in Clinical Pathology. In: *Pathobiology of Human Disease* [Internet]. Elsevier ; 2014 [cité 4 févr 2022]. p. 3207-21. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864567063024>
97. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, Tietz NW, éditeurs. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Sixth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018. 1867 p.

98. Jirak P, Stechemesser L, Moré E, Franzen M, Topf A, Mirna M, et al. Clinical implications of fetuin-A. In: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Elsevier ; 2019 [cité 4 févr 2022]. p. 79-130. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242318300751>
99. McPherson RA, Henry JB, Abraham NZ, éditeurs. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 22. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders; 2011. 1543 p.
100. Dyasis Systems. Réactif de diagnostic in vitro pour la détermination quantitative de la ferritine dans le sérum ou le plasma sur systèmes photométriques. 2014.
101. Roche Diagnostics. Tina-quant Ferritin Gen.4. 2019 Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116.
102. Moticka EJ. Techniques to Detect and Quantify Host Defenses. In: *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology* [Internet]. Elsevier; 2016 [cité 4 févr 2022]. p. 353-64. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123983817000393>
103. Turgeon ML, Turgeon ML. *Immunology & serology in laboratory medicine*. 5th ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Mosby; 2014. 566 p.
104. Hoppensteadt DA, Molnar JA. Hemostasis and coagulation instrumentation. In: *Rodak's Hematology* [Internet]. Elsevier ; 2020 [cité 4 févr 2022]. p. 793-812. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323530453000519>
105. Abraham RS, Barnidge DR, Lanza IR. Assessment of proteins of the immune system. In: *Clinical Immunology* [Internet]. Elsevier ; 2013 [cité 4 févr 2022]. p. 1145-59. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780723436911001069>
106. Lawler DM. Turbidity, Turbidimetry, and Nephelometry. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [Internet]. Elsevier ; 2016 [cité 4 févr 2022]. p. B9780124095472110000. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472110066>
107. Turgeon ML, Turgeon ML. *Immunology & serology in laboratory medicine*. 5th ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Mosby; 2014. 566 p.
108. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE, éditeurs. *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations*. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. 736 p.
109. Parkin PC, Hamid J, Borkhoff CM, Abdullah K, Atenafu EG, Birken CS, et al. Laboratory reference intervals in the assessment of iron status in young children. *bmjpo*. août 2017;1(1):e000074.
110. Larsson SM, Hillarp A, Hellström-Westas L, Domellöf M, Lundahl T, Andersson O. When age really matters; ferritin reference intervals during infancy revisited. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 17 nov 2019;79(8):590-4.

ETUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FERRITINE

111. Yeung DKH, Chung JKO, Ng SWS, Pang EWH, Tam DCC. Validation of reference intervals of serum ferritin in Hong Kong. 15(1):10.
112. Omuse G, Ichihara K, Maina D, Hoffman M, Kagotho E, Kanyua A, et al. Determination of reference intervals for common chemistry and immunoassay tests for Kenyan adults based on an internationally harmonized protocol and up-to-date statistical methods. Szecsi PB, éditeur. PLoS ONE. 9 juill 2020;15(7):e0235234.
113. Miller WG, Greenberg N. Harmonization and Standardization: Where Are We Now? The Journal of Applied Laboratory Medicine. 1 mars 2021;6(2):510-21.
114. Kamei D, Mineshima M, Tsukada M, Miwa N, Hanafusa N, Tsuchiya K. Ferritin: Diversity and Management of Ferritin Measurement Methods. In: Nakamoto H, Nitta K, Tsuchiya K, Okada H, Hasegawa H, éditeurs. Contributions to Nephrology [Internet]. S. Karger AG; 2018 [cité 10 juin 2022]. p. 83-7. Disponible sur : <https://www.karger.com/Article/FullText/485704>
115. Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Urrechaga E, Escanero JF, Huo J, Martinez RX, et al. Performance and comparability of laboratory methods for measuring ferritin concentrations in human serum or plasma: A systematic review and meta-analysis. Szecsi PB, éditeur. PLoS ONE. 3 mai 2018;13(5):e0196576.
116. Dahman LSB, Sumaily KM, Sabi EM, Hassan MA, Thalab AMB, Sayad AS, et al. A Comparative Study for Measuring Serum Ferritin Levels with Three Different Laboratory Methods: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Cobas e411 and Cobas Integra 400 Methods. Diagnostics. 27 janv 2022;12(2):320.
117. Anaemia [Internet]. [cité 10 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/health-topics/anaemia>
118. Plebani M, Graziani MS, Tate JR. Harmonization in laboratory medicine: Blowin' in the wind. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 25 sept 2018;56(10):1559-62.