

Université de Montréal

**Caractérisation du statut en fer chez des chiennes en santé
avant et après une intervention chirurgicale**

par Liza Bau-Gaudreault

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc)
en sciences vétérinaires option pathologie

Décembre, 2017

© Liza Bau-Gaudreault, 2017

Résumé

Contexte: L'anémie d'inflammation est une condition fréquemment rencontrée en médecine vétérinaire et humaine. L'hepcidine est une protéine récemment découverte jouant un rôle prépondérant dans le métabolisme du fer et conséquemment l'anémie de condition inflammatoire.

Objectif: Caractériser le statut en fer chez des chiennes en santé avant et après une chirurgie d'ovariohystérectomie (OVH).

Méthode: Étude prospective. 29 chiennes en santé ont subi une chirurgie d'OVH. Avant et 14 à 18h après le début de la chirurgie, les tests suivants ont été réalisés sur du sang ou du sérum: hématologie, fer, ferritine, hepcidine, interleukine-6 (IL-6) ainsi que protéine C-réactive (CRP). Un ELISA canin pour l'IL-6 et un ELISA humain pour l'hepcidine ont été utilisés.

Résultats: Les concentrations moyennes des leucocytes, des neutrophiles, de la CRP et de l'IL-6 étaient significativement plus élevées après la chirurgie ($p < 0.0001$). Une diminution marquée et significative du fer sérique ($p < 0.0001$) accompagnée d'une augmentation significative de l'hepcidine ($p = 0.04$) sans changement au niveau de la ferritine ($p = 0.75$) étaient également notés après la chirurgie.

Conclusions: Les résultats indiquent qu'une chirurgie d'OVH est un modèle d'inflammation systémique ayant un impact sur le métabolisme du fer. Avec une validation complète chez le chien, l'hepcidine sérique pourrait devenir un élément clé dans la caractérisation des déficiences fonctionnelles en fer et de l'anémie d'inflammation chez ces sujets.

Mots-clés : Hpcidine, Fer, Anémie, Inflammation, Ovariohystérectomie, Chien, Protéine C-réactive, Interleukine-6

Abstract

Background: Anemia of inflammation is a frequent condition in veterinary and human medicine. Hepcidin, a recently discovered protein, is a key player in iron metabolism and consequently in anemia of inflammation.

Objective: To characterize the iron status in healthy female dogs before and after an ovariohysterectomy (OVH).

Methods: Prospective study. 29 healthy female dogs had an OVH surgery. Before and 14-18 hours after the beginning of the surgery, the following tests were performed on blood or serum: complete blood count, iron, ferritin, hepcidine, interleukin-6 (IL-6), and C-reactive protein (CRP). IL-6 and hepcidine were measured with a canine and human ELISA, respectively.

Results: Mean leukocytes, neutrophils, CRP and IL-6 concentration were significantly higher following the surgery ($p < 0.0001$). A marked and significant decrease in serum iron ($p < 0.0001$) accompanied by a significant increase in hepcidin ($p = 0.04$) without changes in ferritin concentration ($p = 0.75$) following the surgery were also observed.

Conclusion: The results indicate that OVH surgery is a model of systemic inflammation and that it has an impact on iron homeostasis. With further validation in dogs, a serum hepcidin assay may become a key tool in characterizing functional iron deficiency and anemia of inflammation in this species.

Keywords : Hepcidin, Iron, Anemia, Inflammation, Ovariohysterectomy, Dog, C-reactive protein, Interleukin-6

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Chapitre I : Recension de la littérature.....	3
1.1. Retour sur les concepts clés.....	3
1.1.1. Anémie.....	3
A. Généralités.....	3
B. Anémie régénérative.....	4
C. Anémie non-régénérative.....	4
1.1.2. Inflammation.....	5
A. Protéines de la phase aiguë.....	5
b. Protéine C-réactive.....	6
B. Les cytokines.....	7
a. Généralités.....	7
b. L'interleukine-6.....	8
c. L'interleukine-1 et le TNF- α	8
C. La cinétique des neutrophiles.....	9
a. Généralités.....	9
b. Stress.....	11
c. Inflammation.....	11
D. Modèles inflammatoires.....	12

1.1.3. L'homéostasie du fer.....	13
A. Généralités	13
a. Technique de mesure du fer	16
B. La ferritine.....	16
a. Technique de mesure de la ferritine	16
C. La transferrine	16
a. Technique de mesure de la transferrine	17
D. Formule sanguine.....	17
E. Évaluation de la moelle osseuse.....	18
F. Conclusion	18
1.2. L'hepcidine	19
1.2.1. Généralités	19
A. Mécanisme de régulation	19
B. Fonctions	21
C. Structure et séquence de nucléotides.....	22
a. Structure	22
b. Maturation.....	23
c. L'hepcidine mature	23
d. Homologie et phylogénie.....	24
D. Influence de l'expression de l'hepcidine	26
a. L'inflammation	26
b. Signaux érythropoïétiques	26
1.2.2. Le rôle de l'hepcidine lors de pathologie.....	27
A. Augmentation de l'hepcidine	27
a. Anémie d'inflammation	27
b. Maladie rénale.....	27
B. Diminution de l'hepcidine.....	28
a. Déficience en fer	28
b. Hémochromatose héréditaire	28
c. Érythropoïèse inefficace.....	29
d. Maladie hépatique chronique.....	29

1.2.3. Variation biologique	30
1.2.4. L'hepcidine en médecine vétérinaire	30
1.2.5. Technique de mesure	31
A. Généralités	31
B. Prohepcidine.....	32
C. Hecidine mature humaine.....	33
a. ELISA	33
b. Spectrométrie de masse.....	33
c. Mesure de l'expression génique par PCR quantitatif.....	34
D. Hecidine canine.....	34
a. PCR ARNm tissulaire	34
b. ELISA	35
c. L'immunotransfert (Western blot)	35
1.2.6. Importance clinique	36
Chapitre II : Méthodologie.....	39
2.1. Projet pilote.....	39
2.1.1. Échantillons.....	39
A. Immunotransfert (Western Blot).....	39
B. ELISA.....	40
2.1.2. Manipulations	40
A. Prélèvements sanguins	40
B. Immunotransfert (Western blot).....	41
C. ELISA.....	41
2.2. Projet principal.....	42
2.2.1. Animaux à l'étude.....	42
A. Sélection des sujets	42
B. Récolte de données descriptives.....	42
2.2.2. Manipulations	43
A. Prélèvements	43
B. Formule sanguine et biochimie	43

C. Marqueurs de l'inflammation.....	44
a. Leucogramme.....	44
b. Protéine C-Réactive	45
c. Interleukine-6	45
D. Paramètres du fer	46
a. Fer sérique.....	46
b. Ferritine.....	47
E. Hepsidine sérique	47
F. Résumé des tests effectués par sujet.....	48
2.2.3. Analyses statistiques	50
Chapitre III : Résultats	52
3.1. Projet pilote.....	52
3.1.1. Immunotransfert (Western Blot).....	52
3.1.2. ELISA	53
3.2. Projet principal.....	56
3.2.1. Animaux.....	56
3.2.2. Paramètres hématobiochimiques sélectionnés.....	57
A. Paramètres érythroïdes.....	57
B. Indices érythrocytaires et réticulocytaires.....	59
C. Créatinine	60
3.2.3. Marqueurs de l'inflammation	60
3.2.4. Paramètres du fer	62
3.2.5. Hepsidine	63
3.2.6. Corrélations.....	65
A. Paramètres érythroïdes.....	65
B. Marqueurs de l'inflammation.....	68
C. Paramètres du fer.....	69
D. L'hepsidine	71
E. Pourcentages de déviations.....	72
Chapitre IV: Discussion.....	73

4.1. Projet pilote	73
4.1.1. Immunotransfert (Western blot)	73
4.1.2. ELISA	74
4.2. Projet principal	76
4.2.1. Paramètres hématobiochimiques sélectionnés	76
A. Paramètres érythroïdes	76
B. Indices érythrocytaires et réticulocytaires	77
C. Créatinine	78
4.2.2. Statut inflammatoire	78
4.2.3. Statut en fer et hepcidine	80
4.2.4. Corrélations entre les paramètres	83
A. Paramètres érythroïdes	83
B. Marqueurs de l'inflammation	84
C. Paramètres du fer et l'hepcidine	85
D. Pourcentages de déviations	87
4.2.5. Limites de l'étude	87
Conclusion	89
Bibliographie	91
Annexe 1 : DRG Heparin 25 Bioactive (EIA-5258)	i
Annexe 2 : Cusabio Dog Heparin (HAMP) (CSB-EL010124DO)	x
Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé	xxiv
Annexe 4 : Quantikine, R&D systems, Minnesota, USA (CA6000)	xxv
Annexe 5 : DRG Heparin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)	xxxvii
Annexe 6 : Courbe standard de Cusabio Dog Heparin (HAMP) (CSB-EL010124DO)	xlvi
Annexe 7 : Courbe standard de DRG Heparin 25 Bioactive (EIA-5258)	xlix
Annexe 8 : Courbes standards de Quantikine, R&D systems, Minnesota, USA (CA6000)	l
Annexe 9 : Courbe standard de DRG Heparin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)	lii

Liste des tableaux

Tableau I. Résumé des tests effectués. T0 : pré-opératoire, T2 : post-opératoire, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.	48
Tableau II. Concentrations obtenues avec l'ELISA canin (Cusabio Dog Hepsidin (HAMP) (CSB-EL010124DO)) et l'ELISA humain (DRG Hepsidin 25 bioactive (EIA-5258)) par rapport aux concentrations attendues avec la protéine d'hepcidine recombinante (Hepsidin (dog), peptides international (PLP-3785-PI)).	54
Tableau III. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour l'hématocrite, l'hémoglobine, les érythrocytes et les réticulocytes. La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.	58
Tableau IV. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0.	58
Tableau V. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CHCM), la concentration globulaire moyenne en hémoglobine réticulocytaire (CHCMr) et la concentration en hémoglobine réticulocytaire (CHr). La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.	59
Tableau VI. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0 pour la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CHCM), la concentration globulaire moyenne en hémoglobine réticulocytaire (CHCMr) et la concentration en hémoglobine réticulocytaire (CHr).	60
Tableau VII. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour les leucocytes, les neutrophiles, l'interleukine-6 (IL-6) et la protéine C-réactive (CRP). La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.	61
Tableau VIII. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0 pour les leucocytes, les neutrophiles et l'interleukine-6 (IL-6)	62

Tableau IX. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour le fer et la ferritine. La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.	62
Tableau X. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0 pour le fer et la ferritine.	63
Tableau XI. Corrélations entre l'hématocrite et les autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.	67
Tableau XII. Corrélations entre les paramètres de l'inflammation et autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.	69
Tableau XIII. Corrélations entre les paramètres du fer et autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6..	70
Tableau XIV. Corrélations entre l'hepcidine et les autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.	71
Tableau XV. Corrélations entre les pourcentages de déviations au temps 2 (T2) par rapport au temps 0 (T0) pour des paramètres sélectionnés. IL-6 : Interleukine-6	72

Liste des figures

- Figure 1.** Maturation et cinétique des neutrophiles. Adapté de *Veterinary Hematology : A diagnostic Guide and Color Atlas* (p. 42) de John Wiliam Harvey, 2012, St-Louis : Elsevier. Copyright 2012 par Saunders. Blast : myéloblaste, Pro : promyélocytes, Myélo : myélocytes, Méta : métamyélocytes, Bands : neutrophiles bands, Segmentés : neutrophiles segmentés, CNC : compartiment circulatoire, CNM : compartiment marginal. Les flèches blanches rayées représentent l'ordre de maturation et le flot des neutrophiles..... 10
- Figure 2.** L'homéostasie du fer : une vue d'ensemble du rôle des interactions entre les différentes cellules et systèmes. Adapté de « Forging a field: the golden age of iron biology », Andrew NC, 2008, *Blood*, 112(2), 219-30. Copyright 2008 par l'American society of hematology et de « Iron and cancer: more ore to be minded », Torti SV, Torti FM, 2013, *Nat Rev Cancer*, 132(3), 342-55. DMT1 : Divalent Metal Transporter 1, RE : réticuloendothéliale, Fe²⁺ : fer ferreux, Fe³⁺ : fer ferrique. 15
- Figure 3.** Les mécanismes de régulation de l'hepcidine. Adapté de « Hpcidin and iron regulation, 10 years later », de Ganz T, 2011, *Blood*, 117(17), 4425-33. Copyright 2011 par l'American society of hematology. BMP6 : bone morphogenic protein 6, TMPRSS6: transmembrane protase serine 6, HJV : hemojuveline, Tfr2: récepteur de la transferrine 2, Tfr1: récepteur de la transferrine 1, HFE: gène de l'hémochromatose, Jak: Janus kinase, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, Smad: suppressor of mothers against decapentaplegic, ARNm: ARN messenger. 21
- Figure 4.** Séquence d'acides aminés de la préprohepcidine humaine. L'encadré rouge représente le site de clivage de la furine. 23
- Figure 5.** Séquence d'acides aminés de la préprohepcidine canine, l'hepcidine-25 canine et l'hepcidine-25 humaine. L'encadré rouge représente le site de clivage de la furine..... 25
- Figure 6.** Arbre phylogénique de l'hepcidine basé sur l'homologie des séquences entre l'humain, le porc, le chien, la souris et le rat. Adapté de « Molecular cloning and expression of canine hepcidin », de Fry MM, Liggett JL, Baek SJ, 2004, *Veterinary clinical pathology*, 33(4), 223-7. Copyright 2004 par l'American society for veterinary clinical pathology. 25

Figure 7. Résultats de l’immunotransfert. Deux bandes de faible intensité sont détectées à environ 24 kDa (flèche pointillés) et 32 kDa (flèche pleine) chez l’humain (verte) et chez les chiens (rouges). La flèche noire indique les bandes à environ 15 kDa présentes chez l’ensemble des chiens. 53

Figure 8. Comparaison des concentrations obtenues avec l’ELISA canin en bleu (Cusabio Dog Hepsidin (HAMP) (CSB-EL010124DO)) et l’ELISA humain en rouge (DRG Hepsidin 25 bioactive (EIA-5258)) par rapport aux concentrations attendues. Une corrélation (Spearman), $r = 0.886$, $p < 0.01$ est présente entre l’ELISA humain et les concentrations attendues. 55

Figure 9. Distribution des races des 29 sujets à l’étude. 57

Figure 10. Graphiques détaillés de la concentration d’hepcidine sérique (A) et du fer sérique (B) des 13 sujets avant (pré T0) et après (post T2) l’intervention chirurgicale. $p = 0.04$ et $p < 0.0001$ respectivement. 64

Figure 11. Graphiques détaillés de la concentration de la CRP (A) et de l’IL-6 (B) des 13 sujets avant (pré T0) et après (post T2) l’intervention chirurgicale. $p < 0.0001$ et $p = 0.04$ respectivement. 64

Figure 12. Graphiques détaillés de la concentration de la ferritine (A) et des neutrophiles (B) des 13 sujets avant (pré T0) et après (post T2) l’intervention chirurgicale. $p = 0.96$ et $p < 0.0001$ respectivement. 65

Liste des abréviations

/L : Par litre

22G : 22 gauge

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BMP : Bone morphogenic protein

C3 : Complément 3

CÉUA : Comité d'éthique de l'utilisation des animaux

CFU-G : Unités formant des colonies de granulocytes

CGMH : Concentration globulaire moyenne en hémoglobine

CHCMr : Concentration globulaire moyenne en hémoglobine réticulocytaire

CHr : Concentration en hémoglobine réticulocytaire

CNC : Compartiment circulatoire

CNM : Compartiment marginal

CRP : Protéine C-Réactive

DMT1 : Divalent metal transporter 1

DMV : Doctorat en médecine vétérinaire

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EPO : Érythropoïétine

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

H&E : Hematoxyline et eosine

HFE : Gène de l'hémochromatose

HJV : Hémojuveline

IL- : Interleukin-

Jak : Janus kinase

kDa : Kilodalton

LEAP-1 : Liver-expressed antimicrobial peptide-1

LPS : Lipopolysacharides
M/E : Myéloïde sur érythroïde
mL : Mililitre
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
ng : Nanogramme
NTpro-BNP : N-terminal pro-brain natriuretic peptide
OVH : Ovariohystérectomie
P53 : Protéine 53
SAA : Amyloïde A sérique
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SMAD : Suppressor of mothers against decapentaplegic
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
TfR : Récepteur de la transferrine
TfR1 : Récepteur de la transferrine 1
TfR2 : Récepteur de la transferrine 2
TIBC : Total iron binding capacity
TMPRSS6 : Transmembrane protease serine 6
TNF- α : Tumor necrosis factor- alpha
TNF- β : Tumor necrosis factor- beta
UIBC : Unsaturated iron binding capacity
USA : United States of America
VGM : Volume globulaire moyen
VGMr : Volume globulaire moyen réticulocytaire
 α_2 -m : Alpha-2-macroglobuline
 μ L : Microlitre
 μ mol : Micromole

À Sophie,

Mes parents et Globule

Remerciements

Au Dre Carolyn Grimes, ma directrice à la fois de maîtrise et de résidence. Merci d'avoir accepté et d'avoir relevé le défi (oui, un défi!) de ma supervision tout au long de ces années. Je suis la professionnelle que je suis grâce à tous nos projets, nos discussions et les embûches que nous avons rencontrées. Merci pour les encouragements constants et surtout les expérimentations impromptues (oui, je parle des crayons verts!) aussi enrichissantes et pertinentes les unes que les autres.

Au Dr Christian Bédard, mon codirecteur, mais également mon ami et confident, toujours prêt à aider et à présenter les éléments sur un angle nouveau pour surpasser les découragements. Merci!

Aux Dres Carolyn Gara-Boivin et Martine Boulianne pour avoir siégé à mon comité-conseil.

Aux Dres Marilyn Dunn et Mathilde Leclère d'avoir gentiment accepté d'évaluer mon mémoire, et ce en version électronique uniquement!

Au Dr Guy Beauchamps pour son aide précieuse et sa rapidité avec les analyses statistiques.

Aux Drs Derek Boerboom et Mayra Tsoi pour leurs judicieux conseils sur la quantification des protéines et leur support lors des manipulations pour les Western blot.

Au Dre Louise St-Germain et l'équipe des exercices chirurgicaux de nous avoir permit d'utiliser les chiens des exercices chirurgicaux et d'avoir tout fait pour faciliter nos manipulations.

Au personnel du laboratoire, Mario Guay, Nathalie Cusson, Sandrine Cros, Caroline Poirier et Marie-Josée Papineau, pour leur support à la réalisation de plusieurs manipulations avec rigueur et dextérité.

À mes co-résidentes les Dres Annie Deschamps, Déborah Culang et Annie Bédard qui ont participé de près ou de loin aux manipulations et m'ont supportée au cours de ces dernières années.

À Dre Émilie L. Couture pour ses conseils et sa disponibilité pour la révision des séminaires, même quelques heures avant le moment fatidique!

À mes amis, les Drs Raphaël Tremblay, Monica Aucoin et à leurs compagnons à quatre pattes, Yuka, John et feu Bruce pour leur participation!

À mes parents, Michel et Sylvie qui ont toujours été présents et m'ont toujours supporté, physiquement, mentalement et financièrement. Sans vous je ne serai pas où je suis présentement. Je ne pourrais jamais dire assez merci.

À mon amour, Sophie qui en a vu de toutes les couleurs au cours des dernières années et qui n'a pas hésité à enfiler un sarrau et manipuler des tubes quand le besoin était criant! Merci pour ta patience, ton soutien et ton amour. Merci d'être là!

Introduction

L'anémie est une condition non spécifique, fréquemment observée en médecine vétérinaire et humaine. Cette anomalie a des effets négatifs sur la santé générale des patients, notamment en diminuant l'immunité et en limitant leur qualité de vie.^{1,2} Les causes d'anémies sont diverses, toutefois l'anémie de condition inflammatoire est l'une des causes les plus fréquemment diagnostiquées en médecine humaine³ et suspectées en médecine vétérinaire.⁴ Le diagnostic exact de ce type d'anémie demeure toutefois un défi en médecine vétérinaire. Plusieurs éléments et mécanismes contribuent à l'anémie d'inflammation ou de condition chronique. Cette anémie est caractérisée par une diminution de l'érythropoïèse causée entre autres par une séquestration du fer et une augmentation des médiateurs de l'inflammation. Un des joueurs clés de ce processus est l'hepcidine, considéré comme l'élément central de l'homéostasie du fer. La production de cette protéine est stimulée lors de l'inflammation et entraîne la séquestration du fer en se liant et en dégradant la ferroportine, limitant ainsi la disponibilité du fer. Cette protéine est donc une cible thérapeutique intéressante chez l'humain lorsque la source de l'inflammation ne peut être directement ou complètement traitée.^{3,5,6} Bien que des informations préliminaires concernant l'hepcidine chez les animaux domestiques suggèrent une action similaire à celle des humains,⁷⁻¹⁰ les études en médecine vétérinaire sont peu nombreuses et beaucoup d'éléments doivent encore être explorés.

L'objectif principal de l'étude suivante est de caractériser le statut en fer chez des chiennes avant et après un stimulus inflammatoire pour établir des données de bases et ainsi faire des comparaisons avec celles disponibles en médecine humaine. L'étude est basée sur l'hypothèse de recherche que l'hepcidine sérique chez le chien joue le même rôle que l'hepcidine chez l'humain. L'étude comporte deux volets, dont un projet pilote et un projet principal. Les objectifs suivants sont à l'étude:

Projet pilote :

- Établir qu'un anticorps anti-hepcidine humain peut détecter l'hepcidine canine.
- Établir qu'un ELISA humain et qu'un ELISA canin peuvent détecter l'hepcidine canine.

Projet principal

- Confirmer qu'une chirurgie de stérilisation (ovariohystérectomie) est un modèle d'inflammation adéquat entraînant une augmentation de l'hepcidine sérique et de la ferritine et une diminution du fer sérique.
- Démontrer une corrélation entre l'hepcidine sérique et les paramètres du fer (fer sérique (inverse) et ferritine (positive)) et entre l'hepcidine et les paramètres de l'inflammation (IL-6, CRP).
- Démontrer une corrélation inverse entre le fer sérique et les paramètres de l'inflammation (IL-6, CRP).

Chapitre I : Recension de la littérature

1.1. Retour sur les concepts clés

1.1.1. Anémie

A. Généralités

L'anémie se définit par une diminution de la masse érythrocytaire et se caractérise par une diminution du comptage érythrocytaire, de l'hémoglobine ou de l'hématocrite. Au laboratoire de pathologie clinique du service diagnostique de la faculté de médecine vétérinaire, une diminution d'au moins deux de ces paramètres est requise. Une diminution de ces paramètres entraîne une hypoxémie et ultimement une hypoxie. Une anémie peut être causée par une ou plusieurs des situations cliniques suivantes : une perte de sang, une destruction accélérée des érythrocytes ou une diminution de production.

Les anémies sont classées selon deux approches. La première est l'évaluation de la réponse de la moelle osseuse permettant de déterminer si l'anémie est considérée comme régénérative ou non. Cette évaluation est généralement faite à partir d'un comptage réticulocytaire (c.-à-d. élevé lorsque régénérateur), mais peut également être effectuée avec une ponction de moelle osseuse et le calcul du ratio myéloïde : érythroïde (M/E). Bien qu'une ponction de moelle osseuse soit une procédure nettement plus invasive, elle est requise pour évaluer la réponse de la moelle osseuse chez les espèces n'ayant pas de réticulocytes en circulation, notamment chez les équins. La seconde classification est basée sur les indices de Wintrobe, soient le volume globulaire moyen (VGM) et la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CGMH). Ces indices nous permettent de classer les anémies en microcytaire/macrocyaire et hypochrome/hyperchrome. Cette classification permet de préciser la nature de l'anémie, mais ne devrait pas être utilisée pour déterminer son caractère régénérateur. Ces classifications sont communément utilisées en combinaison et permettent de formuler une liste de diagnostics différentiels.^{11,12}

B. Anémie régénérative

Lorsqu'une anémie est régénérative, cela indique que la moelle osseuse tente de rétablir la population d'érythrocytes en stimulant l'érythropoïèse. Le test usuel pour déterminer si une anémie est régénérative ou non chez le chien est le comptage manuel des réticulocytes suivant une coloration au bleu de méthylène ou via une méthode automatisée disponible sur certains automates d'hématologie (Ex. Advia 120). L'expansion de la population érythroïde de la moelle osseuse n'est pas instantanée et requiert 3 à 5 jours pour être évidente dans le sang périphérique. Cela signifie que lors d'une anémie aiguë, il est possible que le comptage réticulocytaire soit faible malgré une réponse adéquate de la moelle osseuse. Les principales causes d'anémie régénérative sont une perte de sang (interne ou externe) et une hémolyse.

C. Anémie non-régénérative

Ce type d'anémie est le plus fréquemment rencontrée chez les animaux de compagnies^{12,13} et est le résultat d'un défaut ou d'une diminution de la production de globules rouges; les réticulocytes sont donc absents ou en nombre insuffisant. Considérant que la durée de vie d'un globule rouge est d'environ 105 jours chez le chien (plus court chez les Greyhounds),¹⁴ plusieurs semaines sont parfois requises avant qu'une telle anémie soit cliniquement significative. Toutefois, plusieurs maladies qui affectent la production de globules rouges diminuent également leur demi-vie et comme la majorité des érythrocytes présents en circulation le sont depuis un moment, le reste de leur vie est déjà réduit et donc l'apparition de l'anémie peut être plus rapide.

Les conditions entraînant une anémie non-régénérative sont diverses. Certaines vont causer une diminution de l'érythropoïèse (ex. anémie d'inflammation, maladie rénale) alors que d'autres résulteront en une érythropoïèse inefficace (ex. destruction à médiation immunitaire des précurseurs érythroïdes, certaines myélodysplasies).

1.1.2. Inflammation

A. Protéines de la phase aiguë

a. Généralités

L'intérêt pour les protéines de la phase aiguë de l'inflammation est depuis longtemps présent en médecine humaine et de plus en plus en médecine vétérinaire. La mesure de ces protéines permet d'évaluer la réponse de l'organisme lors d'une maladie. Par définition, elles sont des protéines dont la concentration est augmentée ou diminuée de plus de 25 % en réponse à l'inflammation, une infection ou un trauma.¹⁵ Lorsqu'il y a une augmentation sérique de ces protéines, elles sont considérées comme des protéines positives de la phase aiguë, et lors d'une diminution sérique, elles sont considérées comme négatives.

Elles peuvent être utilisées comme marqueur quantitatif pour évaluer l'état de santé d'un patient, la réponse au traitement ou pour déterminer un pronostic. Malgré leur forte sensibilité pour les processus inflammatoires, leur spécificité est faible pour une maladie en particulier.¹⁵

Les protéines positives de la phase aiguë sont classées en fonction de la magnitude et de la rapidité de leur augmentation lors d'un état inflammatoire. Les protéines majeures ont de faibles concentrations sériques chez un animal en santé, mais lors d'une stimulation, leur concentration augmente de 100 à 1000 fois. Cette augmentation est rapide, atteignant un pic 24 à 48 heures après l'insulte et diminue rapidement durant la récupération. Les protéines modérées, quant à elles, sont présentes chez les animaux sains en faible concentration et augmentent de 5 à 10 fois après une stimulation pour atteindre un pic après 2 à 3 jours et ensuite diminuer plus lentement que les protéines majeures au cours des jours suivants. Les protéines mineures augmentent seulement de 50 à 100 % de la valeur initiale ce qui limite leur utilité.¹⁵

Les protéines les plus fréquemment évaluées chez le chien sont les protéines majeures telles que la protéine C-réactive (CRP) ainsi que l'amyloïde A sérique (SAA), car elles permettent de déterminer rapidement le statut inflammatoire et la magnitude de leur augmentation permet de suivre l'évolution de la condition en combinaison avec les protéines

modérées (céruloplasmine, haptoglobine, alpha-1-glycoprotéine acide). Les protéines négatives de l'inflammation telles que l'albumine et la transferrine peuvent également être évaluées, mais sont peu sensibles et peu utiles en raison de la faible magnitude de leur changements.^{15,16}

La production des protéines de la phase aiguë est contrôlée par des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).¹⁷ Deux catégories de réponse à l'inflammation sont observées chez l'humain et sont établies par le type de cytokines produites. Les protéines regroupées dans la réponse de type I sont la CRP, la SAA et le complément C3 et leur production est stimulée par les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α et TNF- β) tandis que la réponse de type II est stimulée par l'IL-6 et entraîne la production de l'hepcidine, l'haptoglobine et du fibrinogène. Ces deux réponses peuvent être observées simultanément.¹⁸

La synthèse de ces protéines est principalement hépatique, il est toutefois rapporté que les poumons, les adipocytes et les intestins expriment de l'ARN messager (ARNm) pour ces protéines lorsque stimulés.¹⁹ Les fonctions principales de ces protéines sont la défense de l'organisme contre les microorganismes et la restauration de l'homéostasie. Certaines ont également une activité antiprotéase afin d'inhiber les protéases relâchées par les cellules phagocytaires et ainsi minimiser les dommages aux tissus sains environnants. D'autres (SAA, CRP) ont plutôt une activité de nettoyeur et se lient aux métabolites provenant de la dégradation cellulaire empêchant leur utilisation par des pathogènes.¹⁵

b. Protéine C-réactive

La protéine C-réactive (CRP de son acronyme anglais) exerce son rôle de protecteur en se liant aux polysaccharides des bactéries positives à la coloration de Gram, aux lipides membranaires ainsi qu'à l'ADN.²⁰

Il est rapporté que plusieurs maladies stimulent la production de la CRP chez le chien, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin, les pancréatites aiguës, l'arthrite rhumatoïde ainsi que les lymphomes.^{16,21} Une étude récente a démontré qu'une

ovariohystérectomie par laparotomie entraînait une augmentation de la CRP sérique avec une concentration maximale 24 heures après la chirurgie. Comparée à une technique par laparoscopie, l'augmentation de la CRP était significativement plus élevée 12 heures après l'intervention.^{22,23}

Malgré le fait que la CRP soit partie intégrante de la réponse de type I et donc stimulée par la famille des IL-1,¹⁸ certains auteurs ont rapporté que les niveaux sériques de CRP sont fortement corrélés avec les concentrations d'IL-6 et pourraient donc servir de marqueur pour cette cytokine.²⁴

i. Technique de mesure de la CRP

La protéine C-réactive canine est formée de cinq sous-unités comme chez l'humain. Toutefois, deux de ces sous-unités sont glycosylées²⁵ ce qui complique l'utilisation d'anticorps humains pour la quantification de la CRP canine.²⁶ À ce jour, la CRP est principalement mesurée par des tests immunologiques utilisant des anticorps spécifiques canins. Des méthodes telles que l'ELISA ou l'immunoturbidimétrie sont disponibles commercialement. Il faut toutefois porter une attention particulière à l'hémolyse, la lipémie et l'hyperbilirubinémie, car ces substances peuvent interférer avec les résultats. L'hémolyse surestime les résultats lors de l'utilisation de l'ELISA et les sous-estime avec la méthode immunoturbidimétrique. La lipémie et l'hyperbilirubinémie surestiment et sous-estiment respectivement les résultats obtenus avec un ELISA. Ces paramètres n'ont pas été évalués pour la seconde méthode.²⁷

B. Les cytokines

a. Généralités

Les cytokines sont de petites protéines solubles (~5-20 kDa) produites par une variété de cellules et agissent sur un vaste éventail d'autres cellules. Les fonctions des cytokines sont diverses; elles peuvent agir comme facteurs de croissance et modulateurs de l'inflammation ou de la réponse immunitaire. Depuis maintenant plusieurs années, les cytokines sont étudiées et

utilisées afin de mieux comprendre la pathophysiologie des maladies, d'émettre un diagnostic, d'établir un pronostic ou comme agent thérapeutique en médecine humaine et vétérinaire.^{28,29}

b. L'interleukine-6

L'interleukine-6 est une cytokine inflammatoire principalement exprimée par les macrophages et les monocytes, ayant pour rôle de recruter les neutrophiles lors d'inflammation aiguë et de promouvoir la migration et la prolifération des lymphocytes T et B en phase chronique dans les tissus affectés.³⁰ L'IL-6 stimule la synthèse des protéines de la phase aiguë en activant le facteur de transcription STAT3 au niveau cellulaire. Considérant que des sites de liaisons du STAT3 n'ont pas été identifiés sur les gènes de la CRP et de la SAA, leur stimulation par le STAT3 serait indirecte.^{31,32}

En médecine humaine, la concentration d'IL-6 sérique est augmentée lors de différents types de cancers comme le myélome multiple, le lymphome, le carcinome rénal ou ovarien et une concentration élevée est associée avec un pronostic réservé.³³ On retrouve aussi des niveaux élevés d'IL-6 chez le chien lors de maladie inflammatoire de l'intestin,³⁴ de dermatite atopique,³⁵ lors de différents cancers, notamment le carcinome mammaire^{36,37} et chez les patients admis à l'urgence.³⁸

Chez des moutons recevant des lipopolysaccharides (LPS), l'expression de l'ARNm de l'hepcidine est augmentée et cette augmentation est attribuée à l'IL-6.³⁹ Également, une étude humaine sur les lymphomes non hodgkiniens, rapporte que les valeurs d'hepcidine corrélaient directement avec l'IL-6.⁴⁰ Ces résultats supportent donc l'existence d'un axe IL-6-hepcidine.

c. L'interleukine-1 et le TNF- α

L'IL-1 et le TNF- α sont principalement produits par les macrophages en présence de toxines, de bactéries ou d'autres cytokines. Leur action est à la fois locale au niveau de l'endothélium vasculaire, des leucocytes et des fibroblastes et systémique avec l'augmentation des protéines de la phase aiguë et le développement d'une fièvre.⁴¹ Les neutrophiles présents

au site d'inflammation relâchent également du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6. Cette relâche amplifie le processus inflammatoire localement.⁴²

La production hépatique de protéine de la phase aiguë est contrôlée par de nombreuses cytokines, notamment l'IL-1 et l'IL-6. Ces dernières sont des cytokines clés, car elles jouent un rôle à la fois inhibiteur et activateur et interagissent ensemble sur l'expression des protéines de la phase aiguë.³¹ L'hepcidine est une protéine positive de la phase aiguë, car lors de l'incubation d'hépatocytes murins avec l'IL-1 et l'IL-6, la transcription de l'hepcidine est augmentée, et cesse lors du retrait de ces cytokines.⁴³ De plus, l'expression de l'hepcidine hépatique est significativement plus élevée en présence d'IL-1 β et d'IL-6 qu'en présence d'une seule de ces cytokines, ce qui supporte leur rôle synergique.³¹ L'induction par l'IL-1 β est à la fois indirecte, via la synthèse d'IL-6¹⁸ et directe via l'activation de la voie de signalisation du NF-kB.⁴⁴

L'augmentation de nombreuses cytokines, notamment l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α lors de cancer contribuent à l'hypoferremie qui entraîne une diminution de l'érythropoïèse. L'IL-1 et l'IL-6 augmentent l'expression de la ferritine et le TNF- α inhibe l'efflux de fer par la ferroportine.⁴⁵ Il est aussi rapporté que le TNF- α inhibe directement la prolifération des cellules érythroïdes progénitrices contribuant à l'anémie lors de l'inflammation.⁴⁶ L'homéostasie du fer et l'hepcidine seront discutées plus en profondeur dans les sections 1.1.3 et 1.2 respectivement.

C. La cinétique des neutrophiles

a. Généralités

Les neutrophiles dans la moelle osseuse sont séparés en deux grands compartiments (**Figure 1**). Le premier compartiment est celui de prolifération et maturation et il comprend les myéloblastes (Blast), les promyélocytes (Pro) et les myélocytes (Myélo). Le second est le compartiment de maturation et de stockage qui comprend les neutrophiles non segmentés, c'est-à-dire les métamyélocytes (Méta) et les bands (Bands) et les neutrophiles segmentés

(Segmentés). La maturation du myéloblaste en neutrophile mature requiert en général de 6 à 9 jours.⁴⁷

Une fois la maturation des neutrophiles terminée, ils migrent à travers l'endothélium vasculaire de la moelle osseuse pour se retrouver en circulation. Au niveau des vaisseaux sanguins, les neutrophiles peuvent être dans le compartiment marginal (CNM), où ils sont accolés aux parois des vaisseaux ou dans le compartiment circulatoire (CNC) où ils sont emportés par le flot sanguin. Les neutrophiles sont présents dans le sang de façon transitoire pendant quelques heures avant de migrer dans les tissus où ils ne survivent que quelques jours.⁴⁸

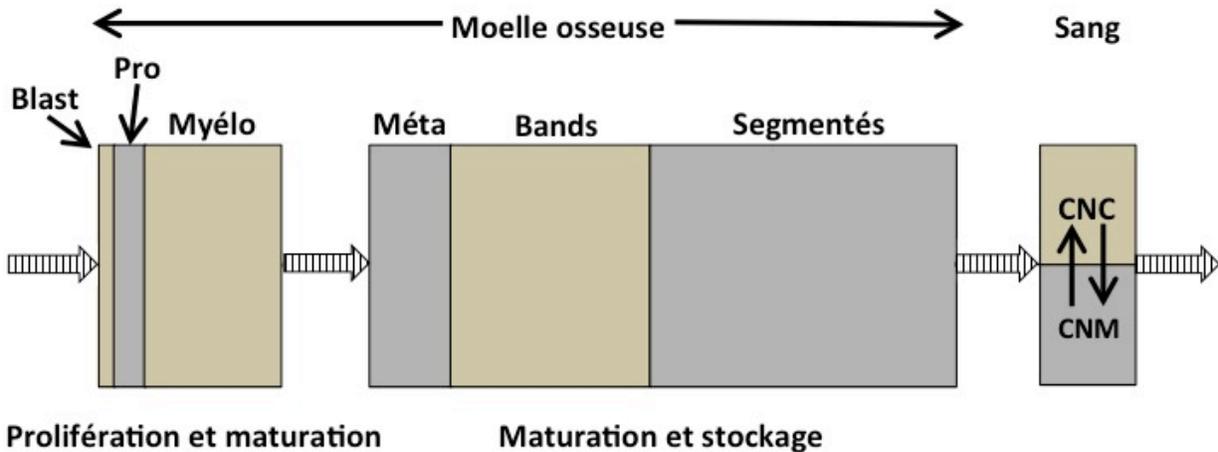


Figure 1. Maturation et cinétique des neutrophiles. Adapté de *Veterinary Hematology : A diagnostic Guide and Color Atlas* (p. 42) de John Wiliam Harvey, 2012, St-Louis : Elsevier. Copyright 2012 par Saunders. Blast : myéloblaste, Pro : promyélocytes, Myélo : myélocytes, Méta : métamyélocytes, Bands : neutrophiles bands, Segmentés : neutrophiles segmentés, CNC : compartiment circulatoire, CNM : compartiment marginal. Les flèches rayées représentent l'ordre de maturation et le flot des neutrophiles.

b. Stress

Les glucocorticoïdes, endogènes ou exogènes, affectent la cinétique des neutrophiles et entraînent une neutrophilie périphérique. Les neutrophiles du compartiment marginal se détachent suite à une diminution de l'expression des molécules d'adhésions et se retrouvent dans le compartiment circulatoire. Au niveau du compartiment de maturation et de stockage, les neutrophiles matures sont libérés et quelques bands peuvent être relâchés en circulation ce qui entraîne un léger virage à gauche.¹¹ Une lymphopénie accompagne habituellement cette neutrophilie.

Il ne faut pas confondre la neutrophilie associée aux glucocorticoïdes avec la neutrophilie causée par les catécholamines. La relâche de catécholamines est généralement associée à la peur, l'exercice ou l'excitation. Cette relâche entraîne également une démarginalisation des neutrophiles du compartiment marginal qui serait causée par une augmentation de la vitesse du flot sanguin dans les vaisseaux et une adhérence diminuée des neutrophiles aux cellules endothéliales.⁴⁹ Généralement, ce type de neutrophilie est accompagné d'une lymphocytose légère à modérée.

c. Inflammation

Les médiateurs relâchés en présence d'un foyer inflammatoire entraînent un changement dans la cinétique des neutrophiles. Quelques heures après la stimulation par ces médiateurs, les neutrophiles du compartiment de stockage sont relâchés. Une neutrophilie périphérique est observée si les neutrophiles relâchés excèdent la capacité de migration au niveau des tissus enflammés. Une fois ce compartiment épuisé, des neutrophiles immatures sont libérés entraînant un virage à gauche. Les neutrophiles en fin de maturation sont libérés en premier (bands), toutefois si la demande tissulaire est accrue et la libération des bands ne suffit plus, des métamyélocytes et myélocytes peuvent également être libérés.¹¹

Les cytokines inflammatoires (ex. IL-6) vont aussi contribuer à la neutrophilie en stimulant la production des neutrophiles soit au niveau des myélocytes qui démontrent

toujours une capacité de division, soit directement au niveau des cellules progénitrices.^{11,50} La présence de changements toxiques tels que les corps de Döhle, la basophilie du cytoplasme, la vacuolisation du cytoplasme et la granulation toxique, observée à l'examen microscopique des neutrophiles, indique des défauts de maturation (ex. rétention du réticulum endoplasmique rugueux et persistance des ribosomes) au niveau la moelle osseuse, secondaire à la neutropoïèse accélérée lors d'une inflammation.^{11,47}

Lorsque la lignée granulocytaire est stimulée de façon chronique, elle s'hyperplasia et peut produire plus rapidement et en plus grand nombre des neutrophiles matures. Il peut alors y avoir absence de virage à gauche et de changements toxiques.¹¹

D. Modèles inflammatoires

L'inflammation est un domaine de recherche en expansion et important autant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. De nombreux modèles d'inflammation sont utilisés en recherche avec leurs avantages et inconvénients. Par exemple, certains modèles d'inflammation sont induits à l'aide de l'administration d'adjuvant de Freund, de LPS, d'huile de térébenthine ou des bactéries à des animaux.^{9,39,51} Les avantages de ces techniques sont l'obtention d'un modèle inflammatoire uniforme dans un environnement contrôlé et facilement modifiable. Toutefois, ce type de modèle ne représente pas nécessairement la réalité clinique et certaines considérations éthiques peuvent être relevées.

D'autres groupes de recherche utilisent plutôt des modèles cliniques, avec des animaux présentés avec une condition inflammatoire localisée ou systémique.^{52,53} Toutefois, l'objectif de ces études est de déterminer la sensibilité et spécificité de certains marqueurs de l'inflammation, et n'utilisent pas les sujets comme des modèles inflammatoires. Par contre, certaines de ces études ont permis d'établir certaines maladies ou interventions notamment, le trauma chirurgical, comme modèle inflammatoire.^{22,23} Le modèle d'inflammation suite à un trauma chirurgical, plus précisément lors d'une chirurgie de stérilisation, a comme avantage d'être une technique relativement standardisée, facilement accessible dans un contexte hospitalier et ne nuisant pas à qualité de vie des sujets. Ce modèle d'inflammation n'est pas aussi standardisé que lors de l'injection de produits irritants, mais représente plus la réalité clinique.

1.1.3. L'homéostasie du fer

A. Généralités

Le fer est un élément essentiel d'une variété de processus homéostatiques, le principal étant le transport de l'oxygène. Il est typiquement sous forme de fer ferreux (Fe^{2+}) lors de son transport à travers les membranes pour ensuite être oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}) pour se lier aux protéines de transport.¹⁵ En situation physiologique, la seule source externe de fer pour l'organisme est la diète. L'absorption du fer a lieu dans la partie proximale du duodénum. La majorité du fer de la diète est sous forme ferrique, celui-ci doit donc être réduit par la ferriréductase (duodenal cytochrome b) en Fe^{2+} afin de permettre son transport à l'intérieur des entérocytes via le transporteur apical DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) (**Figure 2**). Le mouvement du fer de l'entérocyte vers le plasma se fait via la ferroportine, une protéine se situant au niveau de la membrane basolatérale de la cellule. Ensuite, le Fe^{2+} doit être oxydé en Fe^{3+} via la ferroxidase membranaire (hephaestine) afin de se lier à la transferrine, la protéine de transport du fer plasmatique.^{15,54} Les tissus et cellules nécessitant un apport en fer possèdent des récepteurs à la transferrine (TfR) sur leur membrane qui vont lier la transferrine et permettent l'entrée du fer dans ces cellules.^{15,55} Chez un animal en santé, une faible quantité de fer est perdue chaque jour via la desquamation cellulaire, le sang et la sueur. Toutefois, les femelles avec des cycles menstruels et les animaux pondreux peuvent perdre une quantité plus importante de fer suite au processus de reproduction (ex. la production d'œufs, le cycle menstruel).^{15,54,56} Les niveaux de fer de l'organisme sont contrôlés par l'absorption intestinale, mais les surplus ne peuvent être activement excrétés. Cette particularité est importante lorsque l'organisme est en surplus de fer.⁵⁷

La majorité du fer de l'organisme se retrouve dans les érythrocytes; 60-70 % du fer total est sous forme d'hémoglobine chez les animaux en santé. Le stockage du fer sous forme de ferritine représente 20-30 % du fer total et est présent principalement dans les macrophages et les hépatocytes. On retrouve également du fer au niveau de la moelle osseuse. En effet, les précurseurs érythroïdes sont les principaux utilisateurs du fer et sont les cellules ayant des besoins en fer le plus élevé de tout l'organisme.^{15,57} La rate contient également des réserves de ferritine, mais les concentrations sont moindres.^{15,58} Considérant que seulement une faible

quantité de fer est absorbée chaque jour, le fer obtenu du recyclage des globules rouges sénescents par les macrophages est responsable du maintien des niveaux adéquats de fer sérique.⁵⁷

Les niveaux de fer intracellulaire et extracellulaire influencent la synthèse de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du fer, dont l'hepcidine.^{54,59} Selon leurs interactions, la production de l'hepcidine peut être augmentée ou diminuée.^{54,60}

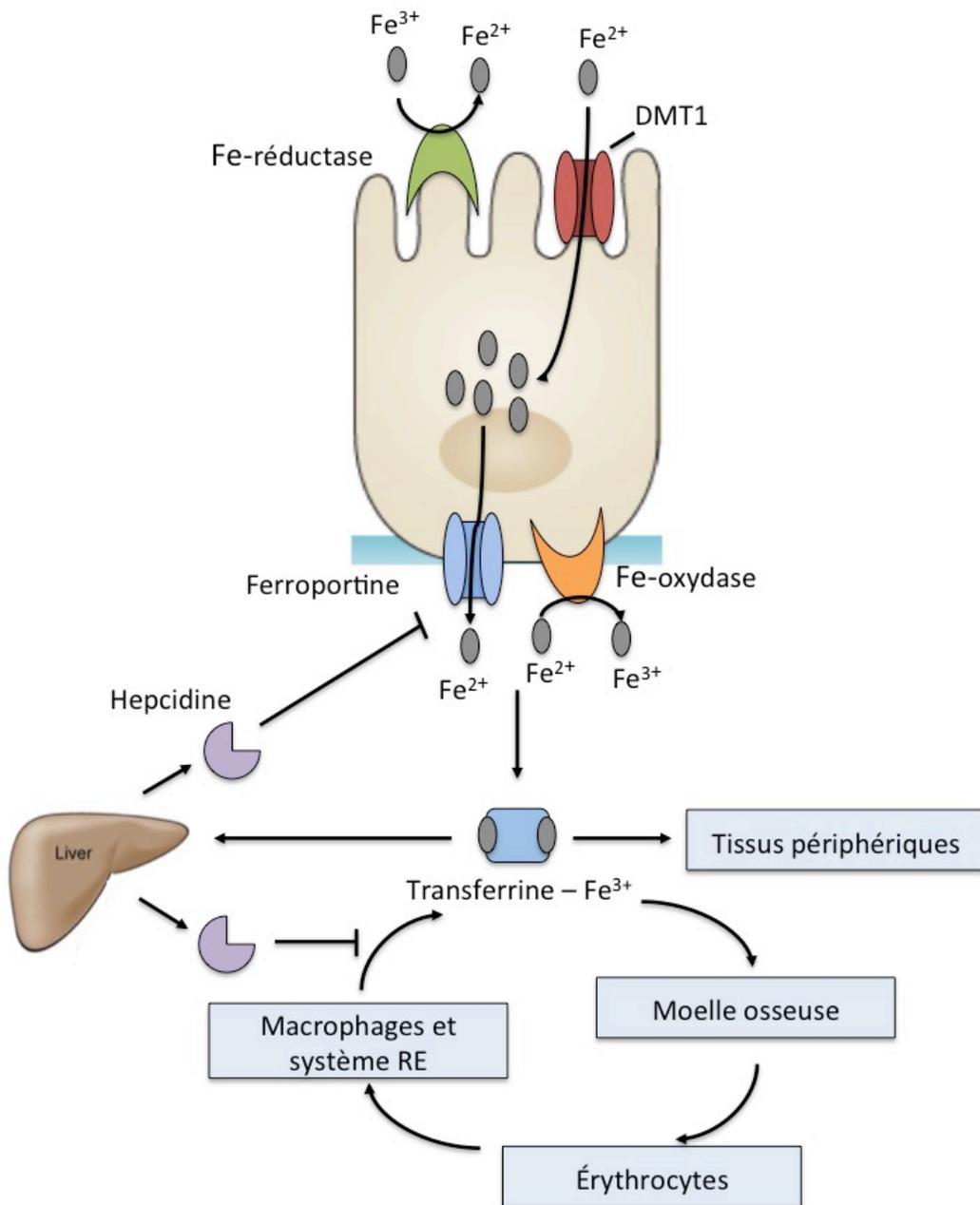


Figure 2. L'homéostasie du fer : une vue d'ensemble des interactions entre les différents systèmes et cellules. Adapté de « Forging a field: the golden age of iron biology », Andrew NC, 2008, Blood, 112(2), 219-30. Copyright 2008 par l'American society of hematology et de « Iron and cancer: more ore to be minded », Torti SV, Torti FM, 2013, Nat Rev Cancer, 13(3), 342-55. DMT1 : Divalent Metal Transporter 1, RE : réticuloendothéliale, Fe^{2+} : fer ferreux, Fe^{3+} : fer ferrique.

a. Technique de mesure du fer

Pour plusieurs espèces, incluant le chien, pour mesurer le fer sérique, il doit être libéré de la transferrine dans un environnement acide et par la suite réduit en Fe^{2+} . Le Fe^{2+} forme un complexe coloré avec le réactif et est détecté par photométrie.¹¹

B. La ferritine

La ferritine est une protéine formée de 24 sous-unités qui entourent, sous forme de micelle, 3000 à 4500 atomes de fer.⁶¹ Typiquement, la ferritine sérique contient moins de fer que celle intracellulaire et sa concentration est moindre, mais les deux sont bien corrélées ce qui permet d'évaluer les réserves tissulaires via la ferritine sérique.⁶² Les macrophages sont la principale source de ferritine, mais les cellules des tubules rénaux proximaux et les hépatocytes peuvent également en relâcher. La concentration en ferritine augmente lorsqu'il y a une augmentation du stockage du fer comme lors d'anémie hémolytique, de sarcome histiocytaire hémophagocytaire, de maladie inflammatoire ou lors de certains cas de lymphomes.^{63,64} La ferritine est aussi une protéine positive de la phase aiguë et donc une légère augmentation de sa concentration est attendue lors de conditions inflammatoires.⁴⁷

a. Technique de mesure de la ferritine

Considérant que la ferritine est spécifique d'espèce, un test conçu pour les humains ne peut être utilisé. Actuellement, ce test n'est pas disponible de routine dans les laboratoires vétérinaire, toutefois, le collège de médecine vétérinaire de l'Université du Kansas offre un ELISA validé pour plusieurs espèces, dont le chien.

C. La transferrine

La transferrine joue un rôle essentiel dans le métabolisme du fer, car elle transporte le fer dans le sang. Une molécule de transferrine peut lier deux molécules de Fe^{3+} . La liaison du fer avec la transferrine limite les dommages oxydatifs induits par le fer libre. Chez les

animaux sains, environ 30 à 40 % de la transferrine est saturée. Une augmentation de la saturation peut être observée lors de diverses conditions notamment lors de tumeur et suggérer un moins bon pronostic.^{65,66} Les cellules et tissus nécessitant un apport de fer lient la transferrine via le TfR, ce qui entraîne son internalisation et la libération du fer.⁶¹

Les concentrations de transferrine sont estimées via l'évaluation de la capacité totale de liaison du fer (TIBC), car le fer n'est que très peu lié à d'autres protéines au niveau sérique.⁴⁷ Le TIBC est typiquement élevé lors de déficience en fer chez la plupart des espèces, car il y a une augmentation de la production de transferrine pour transporter le plus de fer aux cellules, le chien est toutefois une exception. Une diminution du TIBC est généralement observée lors d'inflammation, car la transferrine est une protéine négative de la phase aiguë.¹¹

a. Technique de mesure de la transferrine

Il est possible de mesurer directement la transferrine, mais cela est rarement effectué en médecine vétérinaire. Tel que mentionné ci-haut, la méthode de choix pour évaluer la transferrine est indirecte en évaluant la capacité totale du plasma à transporter le fer (TIBC). Un excès de fer est ajouté à l'échantillon pour saturer tous les sites de liaisons sur la transferrine. Le fer non lié est par la suite éliminé et le fer lié à la transferrine réagit avec un colorant pour déterminer la concentration de fer lié à la transferrine ce qui représente le TIBC. Si l'on connaît la concentration du fer sérique, il est possible de calculer le UIBC en soustrayant cette valeur à celle du TIBC. Le UIBC représente le total des sites de liaisons non utilisés sur la transferrine. Également, il est possible de déterminer le pourcentage de saturation de la transferrine en divisant la concentration du fer sérique par le TIBC pour ensuite le multiplier par 100.¹¹

D. Formule sanguine

La formule sanguine est un test de laboratoire validé chez de nombreuses espèces et quotidiennement utilisé pour évaluer l'état général des patients. Certains paramètres de la formule sanguine de routine, notamment le VGM et le CGMH, permettent la caractérisation

indirecte du statut en fer. Les indices réticulocytaires (concentration en hémoglobine réticulocytaire (CHR), volume globulaire moyen réticulocytaire (VGMr), la concentration globulaire moyenne en hémoglobine réticulocytaire (CHCMr) sont toutefois de meilleurs indicateurs de la disponibilité du fer que le VGM et le CGMH,⁶⁷, mais leur accessibilité est plus limitée.

E. Évaluation de la moelle osseuse

L'évaluation de moelle osseuse peut fournir de l'information semi-quantitative sur les réserves de fer de l'organisme. Chez le chien, le fer est stocké sous forme d'hémosidérine et apparaît noir ou grisâtre à la cytologie (Wright-Giemsa) ou doré à l'histologie (Hématoxiline & Eosine (H&E)). On retrouve le fer dans les macrophages ou parfois libre. En utilisant une coloration mettant en évidence le fer (c.-à-d. bleu de Prusse), cela permet de mieux caractériser les réserves, car il apparaît bleu sur un fond rosé.⁴⁷ Malgré que l'évaluation de la moelle osseuse ne permette qu'une évaluation semi-quantitative de l'hémosidérine, une absence de celle-ci suggère une déficience en fer. Il est toutefois important de mentionner que cette évaluation ne peut être réalisée chez toutes les espèces, notamment le chat, car les réserves n'y sont pas apparentes.⁶⁸

F. Conclusion

Les paramètres hématologiques, la moelle osseuse et le fer sérique aident à évaluer le statut du fer, mais ne permettent pas de différencier adéquatement les différentes pathologies associées au fer.^{15,69,70} Par contre, lorsque combinés avec la ferritine, la transferrine et l'hepcidine, il est possible de différencier certaines pathologies comme l'anémie par déficience en fer, l'anémie d'inflammation et de diagnostiquer les différentes maladies de surcharge en fer (ex. hémochromatose).

1.2. L'hepcidine

1.2.1. Généralités

Au début des années 2000, quelques groupes de recherche indépendants ont découvert un nouveau peptide, premièrement appelé *liver-expressed antimicrobial peptide-1* (LEAP-1) et subséquemment renommé hepcidine.⁷¹⁻⁷³ Le rôle principal de l'hepcidine est de contrôler la quantité de fer plasmatique. Son expression est contrôlée par les réserves intra- et extracellulaires de fer, l'érythropoïèse et l'inflammation. L'hepcidine diminue la concentration du fer dans le plasma en diminuant l'absorption intestinale et la relâche des réserves provenant des macrophages et des hépatocytes. Pour ce faire, elle se lie avec la ferroportine, entraîne son internalisation et sa dégradation (**Figure 2**). Cette dégradation a pour conséquence de séquestrer le fer dans les cellules et donc, empêcher son transfert au niveau plasmatique ou son utilisation par les cellules. La ferroportine est présente sur la membrane des macrophages, des hépatocytes et à l'aspect basolatérale des entérocytes duodénaux.^{57,58,74,75}

L'hepcidine est principalement synthétisée au niveau hépatique, toutefois de l'ADN complémentaire est également observé en quantité modérée au niveau cardiaque et cérébral et en faible quantité dans d'autres tissus.⁷³ L'hepcidine est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur pour ensuite être clivée en sa forme active, l'hepcidine-25. Cette protéine a la forme d'une épingle à cheveux avec quatre ponts disulfides.⁷⁶ Cette structure est hautement conservée entre les différentes espèces.^{8,77} L'hepcidine se retrouve dans le sérum, mais également dans l'urine. En plus de son rôle dans le métabolisme du fer, elle démontre une activité antifongique *in vitro* contre *Candida albicans*, certains *Aspergillus* ainsi qu'une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *intermedius* et les *Streptococcus* du groupe B.⁷¹

A. Mécanisme de régulation

Le contrôle de l'absorption du fer est crucial afin d'éviter un surplus toxique. Un problème au niveau de ce mécanisme peut entraîner une surcharge en fer, de la cirrhose hépatique, de l'hémochromatose, des cardiomyopathies, etc.⁷⁸

L'expression de l'hepcidine au niveau hépatique est contrôlée par de nombreuses molécules régulatrices.⁷⁴ L'augmentation de la protéine morphogénique osseuse 6 (BMP6) et de l'hémojuvéline (HJV) entraîne l'expression de son ARNm tandis que la protéase sérine transmembranaire 6 (TMPRSS6) l'inhibe. Il est aussi rapporté que le facteur de transcription p53, considéré comme un « suppresseur de tumeur », augmenterait la transcription de l'hepcidine. Cet effet serait considéré comme un des mécanismes de défense contre le cancer via la privation du fer.⁷⁹ D'autres protéines, comme les récepteurs de transferrine (TfR1 et TfR2) et les « capteurs intracellulaires »,⁸⁰ ont un rôle plus accessoire et permettent de recruter les molécules nécessaires ou d'activer les cascades appropriées afin de corriger la présence d'anomalies. Lorsqu'une grande quantité de transferrine se lie à ces récepteurs, la cascade des BMP est activée et l'expression de l'hepcidine est augmentée.

Le récepteur du BMP et ces composantes de signalisation sont le centre des mécanismes de régulation de l'hepcidine; ils activent la voie de signalisation du SMAD (suppressor of mothers against decapentaplegic). Cette voie permet la transduction du signal des protéines membranaires jusqu'à l'ADN.⁸¹ Une fois la formation du complexe SMAD-ADN réalisée, la transcription du gène est activée. Sans cette liaison, il n'y a pas d'augmentation de la production de l'hepcidine. Lorsque les réserves hépatiques de fer sont élevées, la cascade du BMP est activée suivant l'augmentation du BMP6.⁸² La liaison du BMP6 avec son récepteur est facilitée en présence d'HJV.⁸³ En présence d'une concentration élevée de fer extracellulaire cette liaison est facilitée, car les récepteurs de transferrine interagissent directement avec l'HJV (TfR2)^{80,84} ou indirectement (TfR2) via le gène de l'hémochromatose (HFE)⁸⁵ et augmente la sensibilité du récepteur. À l'inverse, en présence d'une déficience en fer, le TMPRSS6 inactive l'HJV en la clivant.⁸⁶ Ceci a pour effet de diminuer la production ARNm d'hepcidine pour favoriser l'absorption du fer au niveau intestinale.^{87,88}

Il ne faut pas négliger le rôle de l'inflammation dans l'augmentation de l'expression de l'hepcidine. L'IL-6 forme un complexe avec la kinase Janus (Jak) qui active la cascade du STAT3 qui ensuite se lie avec l'ADN pour entraîner la transcription de l'ARNm de l'hepcidine (**Figure 3**).^{31,32}

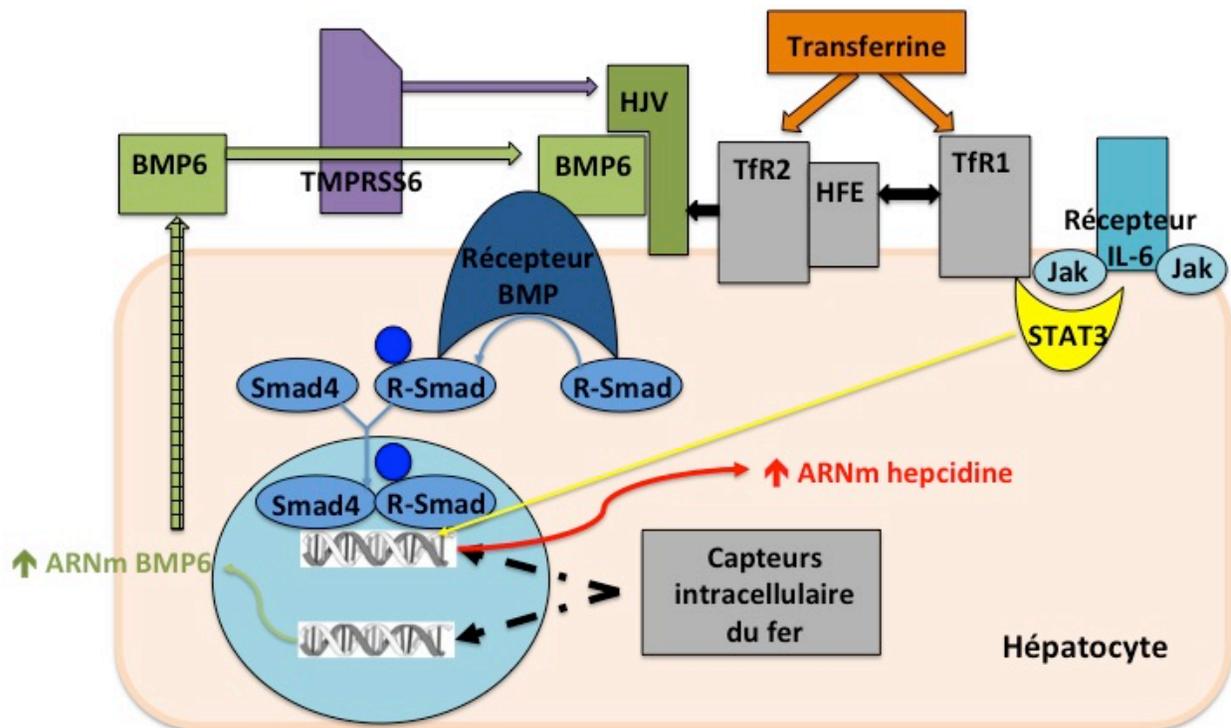


Figure 3. Les mécanismes de régulation de l’hepcidine. Adapté de « Heparidin and iron regulation, 10 years later », de Ganz T, 2011, *Blood*, 117(17), 4425-33. Copyright 2011 par l’American society of hematology. BMP6 : bone morphogenic protein 6, TMPRSS6: transmembrane protase serine 6, HJV : hemojuveline, Tfr2: récepteur de la transferrine 2, Tfr1: récepteur de la transferrine 1, HFE: gène de l’hémochromatose, Jak: Janus kinase, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, Smad: suppressor of mothers against decapentaplegic, ARNm: ARN messenger.

B. Fonctions

La ferroportine est une protéine exportatrice de fer, localisée à la surface des entérocytes, des macrophages, des hépatocytes et des cellules placentaires.⁸⁹ C’est grâce à cette protéine que le fer absorbé au niveau des entérocytes du duodénum est transféré au niveau de la circulation sanguine et que les réserves de fer logées dans les hépatocytes et les macrophages sont libérées pour être utilisées lors de diverses fonctions cellulaires, notamment l’érythropoïèse.^{57,58,74,75}

La liaison de l'hepcidine à un site spécifique (*hepcidin binding domain*) sur la ferroportine entraîne sa phosphorylation et son internalisation ainsi que l'activation du Jak2.⁹⁰ Une fois la protéine internalisée, elle est dégradée par les protéasomes suivant son ubiquitination.^{91,92} La dégradation de la ferroportine empêche le transfert du fer des entérocytes, des macrophages et des hépatocytes vers le plasma. Ceci entraîne donc une déficience fonctionnelle en fer.

L'hepcidine en circulation est liée soit à l'albumine ou à l'alpha-2-macroglobuline (α_2 -m). La liaison avec l'albumine est non spécifique et non saturable. Par contre, l'hepcidine démontre une plus grande affinité pour l' α_2 -m par rapport à l'albumine et ce complexe est plus efficace pour entraîner l'internalisation et la dégradation de la ferroportine que l'hepcidine seule.⁹³ L'hepcidine-25 est une petite molécule et elle est rapidement filtrée et excrétée par les reins ce qui est abrogé lorsqu'elle forme un complexe avec l' α_2 -m.⁹³ Ces informations suggèrent que l' α_2 -m joue un rôle indirect dans la régulation de l'hepcidine en empêchant son excrétion.

C. Structure et séquence de nucléotides

a. Structure

L'hepcidine est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur pour ensuite être clivée en sa forme active de 25 acides aminés. De ces 25 acides aminés, 8 sont des résidus de cystéine qui forment quatre ponts disulfides intramoléculaires. L'arrangement des paires de cystéines autour d'un segment cationique est semblable à la structure retrouvée chez les protégrines antimicrobiennes et ce sont ces ponts qui stabilisent la structure du double feuillet bêta.⁷¹ Ces quatre ponts sont hautement conservés entre les espèces et c'est ce qui donne la forme caractéristique en épingle à cheveux de l'hepcidine-25.^{8,77}

b. Maturation

Chez l'humain, la préproprotéine (préprohepcidine) comporte 84 acides aminés (**Figure 4**). Elle débute par une séquence N-terminal de 24 acides aminés typiques qui représentent la séquence de signal. Immédiatement avant le C-terminal de 25 acides aminés qui est la protéine active,^{71,72} on retrouve le site de clivage de la furine.

Le N-terminal de la préproprotéine de 9.4 kDa est rapidement clivé au niveau du foie pour obtenir la proprotéine (prohepcidine) de 6.9 kDa. Cette proprotéine est ensuite clivée par la furine en protéine mature et active de 2.9 kDa; l'hepcidine-25. La prohepcidine peut être clivée soit au niveau hépatique comme la préprohepcidine ou dans la circulation sanguine.⁹⁴

La furine est une convertase de proprotéine qui active l'hormone en clivant le précurseur inactif à un site précis : RX(K/R)R (**Figure 4**).⁹⁵ Ce site de clivage pour l'hepcidine est conservé à travers les mammifères et même les poissons.⁹⁶ Selon une étude réalisée au Royaume-Uni, le fer jouerait un rôle dans la maturation de la prohepcidine en hepcidine. Le fer se lierait aux résidus de cystéine, entraînerait un changement de conformation de la proprotéine afin d'exposer le site de clivage à la furine pour ainsi permettre la maturation de la prohepcidine en hepcidine-25.⁹⁷

Préprohepcidine: MALSSQTQAACLLLLLLASVASVSVLPHQTGQLTDLRAQDTAGAEAGLQPTLQL**RRLRR**DTHFPICIFCCGCKTPKCGLCCT

Figure 4. Séquence d'acides aminés de la préprohepcidine humaine. L'encadré rouge représente le site de clivage de la furine.

c. L'hepcidine mature

Après une série de clivages du précurseur de l'hepcidine, on obtient la forme mature et active, l'hepcidine-25. Des clivages additionnels du N-terminal entraînent la production de deux plus petites isoformes, l'hepcidine-20 et l'hepcidine-22.⁷¹ Le rôle exact de ces isoformes reste à clarifier, cependant l'hepcidine-20 semblerait avoir une meilleure activité antimicrobienne que l'hepcidine-25,⁷¹ mais n'aurait pas la capacité de se lier à la

ferroportine.⁹¹ Ces trois formes d'hepcidine mature se retrouvent dans l'urine et dans le sérum.^{98,99}

La proportion sérique des isoformes hepcidine-22 et hepcidine-20 varie lors de diverses conditions. Chez l'humain, lors de maladie rénale chronique, l'hepcidine-22 et l'hepcidine-20 sont détectées chez près de 80 % des patients. La proportion de ces isoformes est plus importante lorsque la concentration de l'hepcidine totale est faible et peut atteindre plus de 50 % de la concentration totale tandis que lorsque l'hepcidine totale est plus élevée, l'hepcidine-25 représente en moyenne 80 % de la concentration totale.⁹⁸ Chez les patients septiques et ceux ayant de l'anémie d'inflammation chronique, on note aussi la présence d'isoformes, mais leur concentration est plus faible que lors de maladie rénale chronique.⁹⁸ La présence de ces isoformes peut compliquer l'utilisation de l'ELISA, car il y a d'importantes réactions croisées avec l'hepcidine-25. Les résultats de l'ELISA peuvent donc surestimer la concentration de l'hepcidine-25, qui est la forme biologiquement active.

d. Homologie et phylogénie

Chez le chien, la séquence de nucléotides de l'ADN de la préprohepcidine a été déterminée suite au séquençage (technique de Sanger) du produit d'une amplification par PCR. Les amorces utilisées ont été développées à partir des séquences de l'hepcidine déjà publiées (directe : 5'- YDSSAASRGCNGNCRGAMRGMMMDG-3', inverse : 5'- GGGRMKGSRGBNGKGYDGRBANGN-3').⁸ La protéine complète comprend 85 acides aminés incluant les 8 résidus cystéine du segment C-terminal. Cette protéine démontre 74 % d'homologie avec la protéine humaine.⁸ (**Figure 5**) L'hepcidine humaine démontre 61 % d'homologie avec le rat et 59 % avec la souris. Comme la furine clive la prohepcidine humaine à un site précis, un site également retrouvé dans la séquence de la prohepcidine canine, il a été possible de déduire la séquence du segment de l'hepcidine mature. Cette dernière démontre 80 % d'homologie avec celle de l'humain. Ces informations suggèrent qu'un anticorps se liant à l'hepcidine humaine et murine pourrait également se lier à l'hepcidine canine. (**Figure 5**) De plus, l'analyse phylogénique entre l'humain, le chien, le rat,

la souris et le porc montre que le chien et le porc démontrent le plus haut taux d'homologie avec l'humain.⁸ (Figure 6)

Préprohepcidine MALSSQTQAACL~~LLLLL~~ASVASVSLPHQTGQLTDLRAQDTAGAEAGLQPTLQL~~RRLLRR~~DTHFPICIFCCGCKTPKCGLCCT

Hepcidine-25 canine: DTHFPICIFCCGCKTPKCGLCCT

Hepcidine-25 humaine: DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT

Figure 5. Séquence d'acides aminés de la préprohepcidine canine, l'hepcidine-25 canine et l'hepcidine-25 humaine. L'encadré rouge représente le site de clivage de la furine.

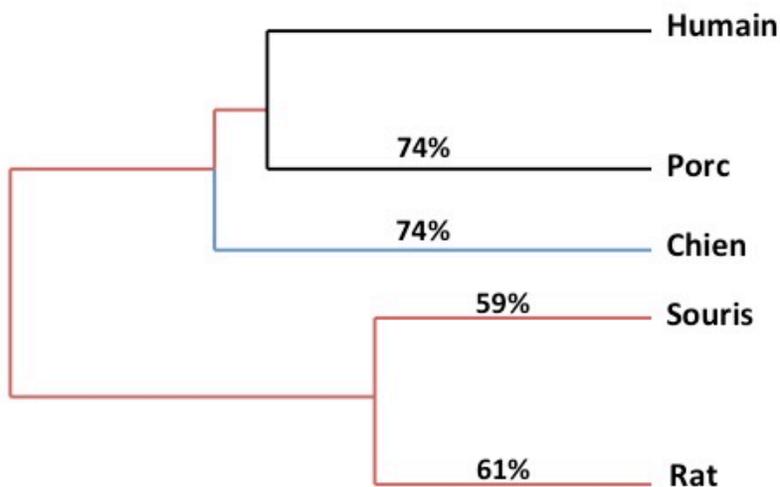


Figure 6. Arbre phylogénique de l'hepcidine basé sur l'homologie des séquences entre l'humain, le porc, le chien, la souris et le rat. Adapté de « Molecular cloning and expression of canine hepcidin », de Fry MM, Liggett JL, Baek SJ, 2004, *Veterinary clinical pathology*, 33(4), 223-7. Copyright 2004 par l'American society for veterinary clinical pathology.

D. Influence de l'expression de l'hepcidine

a. L'inflammation

L'interaction entre le fer, l'inflammation et l'hepcidine est importante dans la compréhension du développement de l'anémie d'inflammation. La présence d'une réponse inflammatoire affecte l'homéostasie du fer, entre autres en augmentant la synthèse d'hepcidine.

L'hepcidine est une protéine de la phase aiguë,¹⁸ mais autant l'inflammation aiguë que chronique entraîne son augmentation sérique.^{100,101} L'IL-1 et l'IL-6, les LPS et d'autres cytokines inflammatoires augmentent directement ou indirectement sa transcription.³⁹ Cette augmentation entraîne donc un état d'hypoferrémie et peut potentiellement entraîner une anémie secondaire à une érythropoïèse restreinte en fer.¹⁰²

L'IL-6 est nécessaire et suffisante à elle seule pour induire l'augmentation de l'expression de l'hepcidine dans les cultures cellulaires hépatiques murine et humaine. L'axe IL-6-hepcidine est responsable de l'hypoferrémie observée lors d'inflammation.¹⁰³ De plus, chez les patients cancéreux souffrant d'anémie d'inflammation, une corrélation positive est présente entre l'hepcidine sérique et la présence d'une inflammation, déterminée par l'augmentation de l'IL-6 et de la CRP.^{104,105} Les humains avec un lymphome hodgkinien présentent des concentrations d'hepcidine plus élevées que les sujets sains, indépendamment de la présence d'une anémie. Les concentrations d'hepcidine sont plus élevées avec une forme plus agressive de la maladie.¹⁰⁵

b. Signaux érythropoïétiques

Une érythropoïèse efficace dépend directement de la disponibilité du fer, car les précurseurs érythroïdes sont les cellules aux besoins en fer les plus élevés. Avec une augmentation de l'érythropoïèse, une diminution de la production d'hepcidine est observée.¹⁰⁶ Le mécanisme exact de cette diminution n'est pas complètement élucidé, mais semblerait être directement relié à l'érythropoïèse et non aux facteurs l'influençant.^{57,74} Il est suggéré que la diminution de la production d'hepcidine n'est pas directement reliée à la liaison de

l'érythropoïétine (EPO) avec les récepteurs hépatique, mais plutôt que l'EPO stimule la synthèse de l'érythroferrone au niveau des érythroblastes. L'érythroferrone étant un inhibiteur important de l'hepcidine, celle-ci est diminuée.^{107,108}

1.2.2. Le rôle de l'hepcidine lors de pathologie

A. Augmentation de l'hepcidine

a. Anémie d'inflammation

L'anémie d'inflammation est généralement faible à modérée, normocytaire, normochrome et non-régénératrice.^{15,42,109} Son origine multifactorielle est bien reconnue. Les principaux mécanismes sont la présence d'une hypoferrémie due à la séquestration du fer dans les macrophages, l'effet antiprolifératif des cytokines sur les précurseurs érythroïdes ainsi que la modification de la production et de la fonction de l'érythropoïétine.^{109,110} Tel que mentionné ci-haut, les cytokines inflammatoires entraînent une surexpression de l'hepcidine, ce qui augmente sa concentration plasmatique et cause une hypoferrémie secondaire.⁵⁷ De plus, ces mêmes cytokines entraînent une augmentation de l'expression de la ferritine entraînant une augmentation de la rétention intracellulaire du fer.¹¹¹ S'ajoutant à cela, la transferrine étant une protéine négative de la phase aiguë, elle diminue lors d'une inflammation.¹⁵ L'ensemble de ces effets entraîne une augmentation de la séquestration du fer et une diminution du fer sérique causant une déficience « fonctionnelle » en fer pour les précurseurs érythroïdes. Le temps requis afin d'observer cliniquement ce type d'anémie est variable malgré que les mécanismes physiologiques la causant sont mis en place en quelques heures, car cela dépend entre autres de la demi-vie érythrocytaire et l'intensité et la durée de l'inflammation.

b. Maladie rénale

Étant donnée la petite taille de l'hepcidine mature, celle-ci passe librement au niveau glomérulaire lorsque la fonction rénale est adéquate.⁵⁸ Chez l'humain, lorsque le taux de filtration glomérulaire est diminué, comme lors d'insuffisance rénale, la concentration

d'hepcidine sérique augmente.¹¹² Cette augmentation pourrait contribuer à l'anémie non-régénérative observée chez ces sujets. De plus, un processus inflammatoire sous-jacent entraînant une augmentation des cytokines en circulation pourrait également contribuer.⁵⁸ La maladie rénale chronique chez le chat est également considérée comme une maladie inflammatoire, et est aussi associée à une augmentation de l'hepcidine sérique. Il est toutefois important de mentionner que la technique de mesure de l'hepcidine chez le chat n'est pas complètement validée.¹⁰

B. Diminution de l'hepcidine

a. Déficience en fer

L'anémie par déficience en fer est une cause commune d'anémie chez l'humain,¹¹³ mais celle-ci est moins fréquente chez les animaux domestiques. La perte de sang chronique et la malnutrition peuvent entraîner une diminution de la disponibilité du fer, et ainsi inhiber la cascade du BMP, diminuant ainsi l'expression de l'hepcidine.⁷⁴

Étant donné les différentes causes et modalités de traitements, il est important de distinguer l'anémie d'inflammation de l'anémie par déficience en fer, car les deux démontrent une diminution du fer sérique. Pour ce faire, il faut évaluer adéquatement le statut en fer du patient à l'aide de la ferritine et de l'hepcidine. Lors d'anémie d'inflammation, la quantité totale de fer de l'organisme n'est pas diminuée, mais seulement non disponible pour l'érythropoïèse. Le fer est séquestré dans les macrophages sous forme de ferritine en réponse à l'augmentation de l'hepcidine. Par contre, lors d'anémie par déficience en fer, la déplétion du fer est réelle et entraîne une diminution des réserves, donc de la ferritine. La transcription de l'hepcidine étant diminuée lors de manque de fer, sa concentration sérique est basse.

b. Hémochromatose héréditaire

Lors d'hémochromatose héréditaire, il y a une augmentation de l'absorption intestinale du fer entraînant une accumulation de fer dans les tissus causant des dommages aux organes

(ex. foie). Une mutation dans le gène de l'hémojuveline (HJV) ou de l'hémochromatose (HFE) cause une incapacité des hépatocytes à produire suffisamment d'hepcidine. Les niveaux sériques sont donc bas, et les réserves de fer et le fer sérique sont élevés.⁵⁸

Cette condition est rarement rapportée en médecine vétérinaire à l'exception de quelques rapports de cas chez des bovins de race Salers ou Salers-croisé. Ces animaux présentaient une perte de poids ou un retard de croissance, de la diarrhée et un pelage terne. L'ensemble des bovins atteint présentait une augmentation de la saturation de la transferrine et une augmentation importante du contenu hépatique en fer. Considérant que la mutation causant cette pathologie n'a pas été déterminée chez cette espèce, il est assumé qu'il s'agit d'une condition héréditaire bien que cela ne soit pas prouvé.^{114,115}

c. Érythropoïèse inefficace

L'érythropoïétine stimule la prolifération des précurseurs érythroïdes ce qui est associée avec une diminution des niveaux d'hepcidine sérique indirectement via l'érythroferrone.^{106,108} Les humains présentant une anémie et une hyperplasie érythroïde secondaire à une dysérythropoïèse ou un β -thalassémie, ont une faible concentration sérique en hepcidine. Ceci entraîne une augmentation de l'absorption intestinale du fer et conséquemment une surcharge de fer au niveau tissulaire.^{58,77} Plusieurs conditions associées à une érythropoïèse inefficace (ex. dysérythropoïèse du Springer Anglais, déficience en folate et cobalamine ou en cuivre) sont rapportées chez les animaux.⁴⁷

d. Maladie hépatique chronique

Lors de maladie hépatique chronique chez l'humain (ex. hépatite C ou cirrhose), une réduction de la synthèse d'hepcidine par les hépatocytes est considérée la cause d'une augmentation du fer au niveau sérique et hépatique, aggravant l'état du foie via des dommages oxydatifs.^{116,117} Bien que cela n'ait pas été démontré, il est possible que des mécanismes similaires soient observés lors de maladie hépatique chronique, par exemple, lors de cirrhose causée par un traitement chronique au phénobarbital.

1.2.3. Variation biologique

Comme pour plusieurs hormones, la concentration de l'hepcidine est sujette à des variations journalières, en fonction de l'âge et du sexe. En 2011, une équipe de chercheurs des Pays-Bas a établi, pour la première fois, des valeurs de références pour l'hepcidine sérique sur une grande population d'humains.¹¹⁸ Cette étude a permis de démontrer qu'il y a une augmentation significative de l'hepcidine sérique chez les femmes de plus de 55 ans, ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'une ménopause chez ces sujets, bien que cela n'a pas été directement évalué. Les valeurs sont toutefois constantes tout au long de la vie chez l'homme malgré une tendance à augmenter avec l'âge sans toutefois que cela soit significatif. De plus, les valeurs d'hepcidine semblent augmenter au courant de la journée, ce qui appuie que l'hepcidine soit sujette à un rythme circadien.¹¹⁹⁻¹²¹ À ce jour, aucune valeur de référence n'a été publiée pour les animaux et l'impact du rythme circadien n'a pas été investigué.

1.2.4. L'hepcidine en médecine vétérinaire

Considérant que la découverte de l'hepcidine est relativement nouvelle et que la mesure de cette protéine chez les animaux demeure un défi, il n'est pas surprenant que peu d'articles en médecine vétérinaire soient disponibles. Le gène de l'hepcidine a été caractérisé chez de nombreuses espèces dont des primates non humains, le rat, la souris, le chien, le porc, les bovins, les moutons, les chevaux et certains poissons, reptiles et oiseaux. Des niveaux différents d'expression d'ARNm entre les espèces pour certains organes sont notés, mais le foie est le site où l'hepcidine est exprimée en plus grande concentration.^{8,122,123}

Les articles actuellement disponibles peuvent être classifiés en deux grandes catégories : ceux s'intéressant à l'hepcidine dans un contexte d'inflammation et ceux s'intéressant à l'hepcidine dans un contexte de déficience en fer. Chez le chien, après l'injection chronique de térébenthine, l'expression hépatique de l'hepcidine est augmentée en combinaison avec une augmentation de la ferritine sérique et du contenu hépatique en fer. Ces changements sont observés seulement en phase aiguë et s'atténuent avec le temps.⁹ L'augmentation du gène de l'hepcidine et de la ferroportine chez des souris infectées par

Chlamydia pneumoniae s'atténue également après quelques jours à l'exception du récepteur de la transferrine.⁵¹ Une augmentation de transcription de l'hepcidine hépatique et une hypoferrémie est aussi observée suite à l'administration de LPS à des moutons.³⁹ Des résultats similaires sont observés chez des veaux avec une septicémie néonatale.¹²⁴ La maladie rénale chronique chez le chat est non seulement associée à une diminution du taux de filtration glomérulaire, mais est également reconnue comme étant une condition inflammatoire. L'augmentation de l'hepcidine sérique lors de cette condition est attribuable à ces deux aspects. Cette augmentation est positivement associée à la concentration de la créatinine et associée à une diminution de l'hématocrite et du TIBC.¹⁰

L'anémie par déficience en fer est un problème fréquent chez les humains et chez les porcelets néonataux. Chez ces derniers, il a été démontré que l'hepcidine-25 urinaire est hautement corrélée avec l'expression de l'hepcidine au niveau hépatique et l'hepcidine-25 plasmatique chez les porcelets anémiques et supplémentés en fer. L'hepcidine-25 urinaire est également corrélée avec la concentration hépatique en fer.¹²⁵ L'induction expérimentale d'une déficience en fer nutritionnelle chez des chiens a démontré une diminution de l'expression de l'hepcidine au niveau hépatique et une augmentation de l'expression du récepteur à la transferrine.⁷

L'ensemble de ces résultats supporte que l'hepcidine chez les espèces vétérinaires joue un rôle similaire à celui chez l'humain.

1.2.5. Technique de mesure

A. Généralités

La production d'anticorps contre l'hepcidine est ardue étant donné le peu d'épitopes conférés par sa petite taille et sa structure en forme d'épingle à cheveux. Son excellente homologie entre les espèces contribue également à la difficulté d'initier une réponse antigénique appropriée chez l'animal hôte.^{126,127} La protéine d'hepcidine est également difficile à reproduire en laboratoire étant donnée sa forme caractéristique. De plus, l'hepcidine est présente en faible concentration dans le sang et est rapidement éliminée, il est donc

difficile de l'isoler en quantité suffisante.¹²⁶ Le développement de tests immunologiques est limité par l'ensemble de ces éléments.¹²⁸

Trois sources de variation majeures sont rapportées : la variabilité journalière, la variabilité entre les sujets, la variabilité préanalytique et analytique.¹²¹ L'hepcidine a tendance à former des agrégats et à se coller aux parois des tubes de plastique, indiquant qu'il faut manipuler les échantillons avec précaution et de façon standardisée.¹²⁸

Plusieurs techniques de mesure sont disponibles pour évaluer les protéines et les différentes méthodes utilisées pour mesurer l'hepcidine ne fournissent pas toutes les mêmes informations. Certaines déterminent la concentration totale de l'hepcidine mature, incluant les isoformes -22 et -20 tandis que d'autres quantifient la concentration exacte pour chacune des isoformes.¹²⁹ Chez l'humain, il est possible de mesurer l'hepcidine au niveau sérique et urinaire, par contre, les résultats sont généralement moins fiables dans l'urine.^{126,130}

B. Prohepcidine

La prohepcidine est le produit de clivage du précurseur de l'hepcidine, la préprohepcidine. On retrouve la prohepcidine au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes et dans le sérum.¹³¹ L'utilisation de la prohepcidine sérique comme mesure indirecte de l'hepcidine-25 a été investiguée par plusieurs chez l'humain, car d'autres promolécules comme le NTpro-BNP, sont rapportées être un indicateur adéquat de la molécule biologiquement active.¹³² Certains groupes de recherche ont utilisé des ELISA commercialement disponibles,^{133,134} mais d'autres ont développé leur propre ELISA.¹³⁵ Ces études n'ont toutefois pas permis de montrer une corrélation significative entre la prohepcidine et la ferritine, le fer sérique et l'hepcidine-25.^{131,133,135} Également, aucune corrélation entre les concentrations de prohepcidine sérique et celle urinaire n'est rapportée.¹³¹ De plus, une autre étude a révélé que la prohepcidine n'est pas associée à la ferritine ou à la réponse à l'EPO tandis que l'hepcidine-25 est corrélé avec ces dernières.¹³⁴

Ces informations suggèrent que la prohepcidine sérique n'a pas de rôle fonctionnel au niveau de l'homéostasie du fer et donc ne représente pas adéquatement l'hepcidine-25. La

prohepcidine n'est donc pas un biomarqueur utile pour évaluer le statut en fer d'un individu.^{133,135}

C. Hepcidine mature humaine

a. ELISA

Les immuno-essais utilisent des anticorps spécifiques pour un épitope de la molécule d'intérêt afin de quantifier celle-ci. Quelques ELISA compétitifs utilisant des anticorps polyclonaux de lapins ou monoclonaux de souris ont été décrits dans la littérature pour l'hepcidine humaine.^{118,119,136} Cette technique est rapide, peu coûteuse et facilement réalisable par du personnel formé. Elle est donc utilisée pour traiter un grand nombre d'échantillons et le diagnostic clinique. C'est d'ailleurs avec cette technique que les valeurs de références d'hepcidine sérique chez l'humain ont été déterminées.^{118,119} Toutefois, étant donné le manque de spécificité des anticorps pour l'hepcidine-25, des réactions croisées avec les autres isoformes sont observées et les résultats doivent être interprétés en conséquence.⁹⁸ L'ELISA ne permet pas de distinguer l'hepcidine-25 des autres isoformes de l'hepcidine mature.¹³⁷ Lors de certaines conditions, particulièrement lors de maladie rénale chronique, les isoformes hepcidine-20 et -22 sont significativement augmentées et donc, la concentration de l'hepcidine totale obtenue avec l'ELISA surestime la valeur de l'hepcidine biologiquement active.^{6,98}

b. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse où les composés sont d'abord ionisés, séparés et ensuite la masse de la molécule ou des fragments sont mesurés. « L'analyse de masse » est le procédé où les composés ionisés sont identifiés en fonction de leur ratio masse/charge. Le « spectre de masse » quant à lui, représente l'abondance relative de chacun des composés en fonction de leur ratio masse/charge.^{137,138}

Cette technique permet de différencier les différentes isoformes de l'hepcidine mature et donc d'obtenir la concentration de la forme biologiquement active, l'hepcidine-25.⁹⁸

Toutefois, la hauteur des pics obtenue sur le spectre de masse ne reflète pas toujours la concentration absolue exacte dans l'échantillon dû à la compétition lors de la liaison et l'efficacité variable de l'ionisation. Conséquemment, les données obtenues sont plutôt de type semi-quantitatives que quantitatives si un contrôle interne n'est pas utilisé.¹⁰⁰

L'utilisation de la spectrométrie de masse comme outil de diagnostic ou pour déterminer des valeurs de référence ne peut être véritablement considérée, car il s'agit d'une technique coûteuse, laborieuse et disponible seulement dans certains laboratoires spécialisés.

c. Mesure de l'expression génique par PCR quantitatif

L'ARNm de l'hepcidine est exprimé en quantité variable dans de nombreux tissus.⁷³ Récemment, les niveaux d'expression de l'hepcidine ont été mesurés dans différents tissus sains et néoplasiques chez l'humain.¹³⁹⁻¹⁴¹ Lors de cancers colorectaux,¹⁴¹ de carcinomes rénaux¹⁰⁴ et de cancers mammaires,¹⁴² l'expression de l'hepcidine au niveau des tissus néoplasiques est plus élevée que dans les tissus sains. Cette augmentation serait associée au potentiel métastatique^{104,139} de la tumeur et associée avec un pronostic plus réservé.^{139,142} Par contre, les niveaux d'ARNm tissulaire ne sont pas nécessairement corrélés avec l'hepcidine-25 sérique¹⁰⁴ et urinaire.^{139,141}

D. Hpcidine canine

a. PCR ARNm tissulaire

Étant donnée la disponibilité limitée de test immunologique pour les animaux et que la spectrométrie de masse est peu accessible, certains groupes de recherche ont investigué la quantification de l'ARNm de l'hepcidine au niveau hépatique chez plusieurs espèces notamment chez les porcs,¹⁴³ les souris,⁵¹ les chevaux,¹³⁰ les moutons,³⁹ et les chiens.^{7,9}

Lorsque des chiens étaient injectés avec de la térébenthine afin d'induire une anémie d'inflammation, l'expression de l'ARNm hepcidine hépatique était augmentée tout comme le contenu hépatique en fer et la ferritine sérique. L'ARNm d'hepcidine était 15 fois plus élevé

un jour après l'injection et 6 fois plus élevé 7 jours après injection par rapport aux valeurs basales.⁹ Chez des chiens souffrant de déficience en fer suite à un apport nutritionnel insuffisant, l'expression du gène de l'hepcidine hépatique était diminuée de 40 fois et celui du récepteur à la transferrine augmenté de 7 fois par rapport aux chiens contrôles.⁷

Les changements observés avec cette technique dans l'expression de l'hepcidine et la transferrine ainsi que les concentrations de ferritine et fer sérique sont en accord avec les connaissances actuelles sur le métabolisme du fer.⁷ Toutefois, il s'agit d'une technique invasive nécessitant un échantillon de foie, et ne peut donc pas être utilisé de routine.

b. ELISA

Un groupe de chercheurs américain tente actuellement d'intégrer le gène de l'hepcidine dans une lignée cellulaire de mammifère afin de produire une protéine d'hepcidine recombinante. Cette protéine pourrait éventuellement être utilisée comme standard afin de valider certains tests commercialement disponibles pour les humains. Aussi, cette protéine pourrait être utilisée afin de développer des anticorps spécifiques pour l'hepcidine-25 canine pour développer un ELISA.^{7,8}

Depuis peu, un ELISA^a spécifique pour l'hepcidine canine est disponible commercialement toutefois, les données de validation de cet ELISA sont manquantes et la source de leur anticorps est inconnue, ce qui rend son utilisation et l'interprétation des résultats contestables.

c. L'immunotransfert (Western blot)

L'immunotransfert (Western blot) est une technique de biologie moléculaire qui permet la détection et l'identification d'une protéine d'intérêt. Cette détection peut être effectuée à partir d'homogénat de tissus ou sur du sérum.¹³⁸ Il faut d'abord séparer les

^a <http://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Dog-HepcidinHAMP-ELISA-kit-82084.html>

protéines en fonction de leur poids moléculaire en les faisant migrer sur un gel. Une fois cette migration réalisée, les protéines doivent être transférées sur une membrane. Cette membrane sera par la suite incubée avec un anticorps primaire qui cible la protéine d'intérêt et ensuite avec un anticorps secondaire qui lui, est dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à un agent luminescent qui permet la détection de la protéine.¹³⁸ À l'aide d'un logiciel, il est possible d'effectuer une évaluation semi-quantitative des valeurs obtenues en évaluant l'intensité des bandes.

Un anticorps dirigé contre l'hepcidine-25 humaine reconnaissant également l'hepcidine-25 chez la souris et le rat est disponible commercialement. Étant donné l'homologie entre les rongeurs et l'humain et le chien et l'humain⁸ il est possible que cet anticorps puisse aussi reconnaître l'hepcidine-25 chez le chien, malgré qu'une validation en ce sens n'est pas été réalisée. Il serait donc possible d'identifier l'hepcidine-25 dans le sérum canin et d'effectuer une évaluation semi-quantitative en fonction de l'intensité et de la taille de la bande.

1.2.6. Importance clinique

Actuellement dans la littérature, très peu d'informations sur l'hepcidine canine sont disponibles. Bien que l'hepcidine chez les animaux semble agir de façon similaire à celle humaine,⁷ la caractérisation et la compréhension des différentes interactions entre les paramètres de l'inflammation, le fer et l'hepcidine chez le chien sont essentiels à maîtriser afin de bien comprendre l'anémie d'inflammation ainsi que d'autres maladies. Étant donnée la ressemblance entre l'hepcidine humaine et canine, ces informations permettront d'effectuer des parallèles entre les deux espèces, d'adapter le diagnostic et d'effectuer un traitement adapté chez les patients canins.

L'anémie est une complication fréquente chez les humains avec des cancers¹⁴⁴ et est associée avec une qualité de vie moindre, une diminution des temps de survies¹⁴⁵ et une augmentation de 65 % du risque de décès.¹⁴⁶ Il est rapporté que 35 à 45 % des patients cancéreux anémiques sous traitement chimiothérapeutique ne présentent pas d'augmentation de l'hémoglobine lors de l'administration d'érythropoïétine.¹⁴⁷ Il est suggéré que l'absence de

réponse à ce traitement est secondaire à la diminution de la disponibilité du fer dû à un état inflammatoire¹⁴⁸ et une surexpression de l'hepcidine.¹⁸ Lors de l'évaluation de la réponse des patients au traitement avec l'EPO, il a été démontré que le groupe ayant des valeurs basses d'hepcidine (<13 nmol/L) avait une meilleure réponse (donc augmentation d'hémoglobine) que le groupe ayant des valeurs élevées d'hepcidine (>13 nmol/L).¹⁴⁸ Une autre étude s'intéressant au taux de réponse à l'EPO avec une supplémentation en fer par rapport au niveau d'hepcidine supporte ces résultats.¹⁴⁹

Chez les chiens atteints de lymphome, ceux ayant un hémocrite inférieur à 35 % ont 2.37 fois plus de chance de mourir que les chiens ayant une anémie plus légère ou une absence d'anémie.⁴ De plus, leur temps de survie est aussi significativement réduit, avec 160 jours pour le groupe anémique comparé à 277 jours pour le groupe non anémique.⁴ Une autre étude sur 96 chiens atteints de lymphomes démontre que les patients non anémiques ont 4 fois plus de chance d'atteindre une réponse complète à la chimiothérapie que les patients anémiques.¹⁵⁰ Chaque augmentation de 1% de l'hémocrite est associée avec une augmentation de 7.6 % de chances d'atteindre cette rémission. La survie des sujets anémiques était également significativement réduite passant de 315 jours à 139 jours.¹⁵⁰

Chez les humains souffrant de maladie rénale chronique et présentant une anémie ayant une réponse limitée à l'administration d'EPO, un traitement avec la pentoxifylline entraîne l'augmentation des niveaux d'hémoglobine et réduit les concentrations circulantes d'IL-6.⁵ Chez ces mêmes patients, le traitement entraîne une diminution des niveaux d'hepcidine-25 d'une magnitude potentiellement assez importante pour avoir un effet biologique malgré qu'une différence statistiquement significative n'a pas été démontrée.⁶

Il est important de connaître les niveaux d'hepcidine sérique, car une augmentation de l'hepcidine réduit l'efficacité du fer administré par voie intraveineuse et de fortes doses doivent donc être utilisées afin de contrecarrer l'effet de l'hepcidine. Les effets secondaires néfastes de l'administration d'EPO sont bien connus autant chez l'humain qu'en médecine vétérinaire et incluent notamment des risques cardiovasculaires, principalement thrombotiques en médecine humaine, ainsi que la formation d'anticorps anti-EPO contre l'EPO endogène pouvant mener à une érythroblastopénie acquise.¹⁵¹⁻¹⁵³ L'utilisation d'antagoniste d'hepcidine en combinaison avec les traitements classiques pourrait rendre leur utilisation plus

sécuritaire.¹⁵⁴ Plusieurs approches thérapeutiques sont présentement en développement chez l'humain.^{6,155}

En résumé, l'hepcidine est une protéine d'une importance capitale dans la compréhension de l'hémostasie du fer. Sa découverte a permis de mieux comprendre les mécanismes de l'anémie de condition inflammation, une situation cliniquement fréquente et jusqu'à ce jour, mal comprise. Ces connaissances proviennent essentiellement de la littérature humaine, c'est pourquoi l'étude suivante vise, dans un premier temps, à évaluer l'utilisation d'ELISA canin et humain pour mesurer l'hepcidine sérique canine, pour ensuite évaluer et établir des liens entre l'inflammation et les paramètres du fer, incluant l'hepcidine chez cette même espèce.

Chapitre II : Méthodologie

2.1. Projet pilote

Le projet pilote est basé sur l'hypothèse que l'hepcidine sérique chez le chien joue le même rôle que l'hepcidine chez l'humain, et donc que la concentration de cette protéine augmente lors de l'inflammation. Le premier objectif du projet pilote est de détecter l'hepcidine sérique chez le chien par immunotransfert (Western blot) à l'aide d'un anticorps anti-hepcidine humain (Anti-Hepcidin-25 antibody (ab30760)) afin de vérifier si un anticorps humain pouvait détecter la protéine canine et ainsi démontrer la possibilité d'utiliser un ELISA humain (DRG Hepcidin 25 bioactive (EIA-5258)) pour la quantification de l'hepcidine sérique canine. Considérant qu'un ELISA canin (Cusabio Dog Hepcidin (HAMP) (CSB-EL010124DO) (anticorps inconnu), est aussi disponible, il est désirable d'évaluer également sa performance en parallèle avec l'ELISA humain (anticorps monoclonaux de souris), en utilisant à la fois des échantillons de chiens sains, de chiens présentant une condition inflammatoire et une protéine recombinante d'hepcidine canine (Hepcidin (dog), peptides international (PLP-3785-PI)).

2.1.1. Échantillons

A. Immunotransfert (Western Blot)

Afin de déterminer si l'anticorps humain anti-hepcidine (Anti-Hepcidin-25 antibody (ab30760)) détecte l'hepcidine canine, deux échantillons humains représentant des contrôles positifs et sept échantillons canins ont été utilisés. Trois de ces chiens étaient des chiens en santé, basé sur un examen physique et un bilan sanguin et appartenaient à des employés de la Faculté de médecine vétérinaire ayant volontairement participé au projet. Les quatre autres échantillons canins étaient des échantillons de sérum congelés à -20°C, préalablement soumis au Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire, sélectionnés sur la base de la

présence de changement toxique à l'hématologie. Considérant que la présence de changement toxique est associée à une granulopoïèse accélérée, ces derniers représentent des chiens ayant une condition inflammatoire.

B. ELISA

Afin de déterminer si l'ELISA humain détecte l'hepcidine canine et d'évaluer la performance de l'ELISA canin, 15 échantillons de sérums de chiens sains, préalablement utilisés pour déterminer des intervalles de références au laboratoire de pathologie clinique du Service de diagnostic, 17 échantillons de sérum canin congelés à -20°C, préalablement soumis au Service de diagnostic, sélectionnés sur la base de la présence de changement toxique à l'hématologie et diverses concentrations de la protéine canine recombinante (Hepcidin (dog), peptides international (PLP-3785-PI)) ont été utilisés.

2.1.2. Manipulations

A. Prélèvements sanguins

Pour les humains et les chiens sains utilisés pour la détection par immunotransfert, un volume de 3 mL de sang a été prélevé dans un tube sec au niveau de la veine médiane du bras (humains) ou de la veine jugulaire (chiens). Une fois le sang coagulé (minimum 30 minutes à température ambiante), les tubes ont été centrifugés et le sérum récolté, aliquoté et congelé à -80°C jusqu'aux manipulations.

La technique de prélèvement des échantillons de sérum préalablement soumis au Service de diagnostic et ceux utilisés pour déterminer des intervalles de références ne peut pas être évalués, car il s'agit d'échantillon provenant de sources différentes. Ces échantillons ont été conservés à -20°C et/ou -80°C jusqu'aux manipulations.

B. Immunotransfert (Western blot)

Une technique standard d'immunotransfert a été réalisée. Brièvement, les échantillons de sérum (2 µL) ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel de 14% d'acrylamide pour ensuite être transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (GE Amersham/VWR). L'immunodétection a été réalisée avec un anticorps anti-hepcidine humain (dilution 1 :100, Anti-Hepcidin-25 antibody (ab30760)) et un anticorps secondaire anti-lapin (dilution 1 :100 000) couplé avec la peroxydase de raifort puis révélé en utilisant le réactif de détection (ECL Detection reagents, GE Amersham/VWR). La fluorescence des bandes a été mesurée en utilisant un densitomètre (Kodak Image Station 440CF).

C. ELISA

Les deux ELISA humain (DRG Hepcidin 25 bioactive (EIA-5258)) et canin (Cusabio Dog Hepcidin (HAMP) (CSB-EL010124DO)) ont été utilisées selon les recommandations du fabricant (**Annexe 1 et 2**). L'ELISA humain utilise la technique par compétition. Avec cette technique, les puits sont recouverts d'anticorps dirigés contre l'hepcidine-25, l'hepcidine sérique rivalise avec l'hepcidine conjuguée pour la liaison avec ces anticorps. La couleur émise par l'hepcidine conjuguée est inversement proportionnelle à la concentration d'hepcidine sérique. L'ELISA canin utilise la technique sandwich, c'est-à-dire qu'il y a présence d'un anticorps de capture dans les puits qui lit l'hepcidine. L'hepcidine fixée dans les puits est par la suite liée par l'anticorps de détection qui produit une couleur proportionnelle à la concentration.

Pour les deux ELISA, l'ensemble des échantillons ont été mesurés en duplicata. En plus des 15 échantillons de sérum de chien sains et des 17 échantillons de chiens avec un processus inflammatoire, 8 concentrations différentes (2.0, 6.12, 12.5, 25, 50, 100, 150 et 200 ng/mL) de la protéine canine (Hepcidin (dog), peptides international (PLP-3785-PI)) ont été mesurées avec les deux techniques.

2.2. Projet principal

Le projet principal est toujours basé sur l'hypothèse de recherche que l'hepcidine sérique chez le chien joue le même rôle que l'hepcidine chez l'humain. Les manipulations effectuées sont réalisées dans le but de confirmer qu'une chirurgie de stérilisation (OVH) est un bon modèle d'inflammation, de démontrer que l'hepcidine est plus élevée en présence d'inflammation chez le chien et de démontrer que les niveaux d'hepcidine sont corrélés avec les divers paramètres inflammatoires, hématologiques et du fer. L'ensemble des procédures décrites a été au préalable approuvé par le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (16-Rech-1821).

2.2.1. Animaux à l'étude

A. Sélection des sujets

L'étude comporte une seule cohorte de vingt-neuf chiennes en santé sur la base d'un examen physique et d'un bilan sanguin (hématologie et biochimie). Ces chiennes ont été recrutées au sein des chiens présentés lors du stage préclinique (DMV 41351) de chirurgie (ovariohystérectomie). Ces chiens provenaient de refuges, de meutes de chiens de traîneau ou de la cohorte de chiens d'enseignement. Les chiens sélectionnés devaient avoir un poids minimal de 8 kg, ne devaient pas présenter de perte de sang évidente ni recevoir de la médication à l'exception de vaccins de routine et de traitements antiparasitaires. Un formulaire de consentement éclairé (**Annexe 3**) a été signé pour l'ensemble des chiens.

B. Récolte de données descriptives

Le dossier médical de chacun des patients a été évalué avant l'intervention chirurgicale afin de comptabiliser certaines données descriptives telles que le nom, l'âge (en année(s)), le sexe, la race, le poids, le numéro de dossier (omnilab), le microhématocrite, les protéines totales (réfractométrie), les résultats de la formule sanguine et de la biochimie. Des informations supplémentaires telles que la durée de la chirurgie (minutes), la quantité de fluide

(mL), l'administration d'anti-inflammatoire, de morphinique et d'antibiotique ont été comptabilisés suite à l'ovariohystérectomie.

2.2.2. Manipulations

A. Prélèvements

Les animaux participant au projet de recherche ont subi 2 prélèvements d'environ 8 mL de sang (2 tubes secs et 1 tube EDTA) sur une période d'environ 40 heures. Le premier prélèvement (T0), la veille de l'intervention chirurgicale, a permis d'évaluer l'état de santé général de l'animal à l'aide d'une formule sanguine et d'une biochimie complète. Le deuxième prélèvement (T2) a été réalisé le jour suivant la chirurgie (14 à 18 heures après le début de l'intervention), et seulement une formule sanguine a été réalisée. Le reste du sérum du prélèvement pré-chirurgie et la totalité du sérum post-chirurgie ont été séparés en aliquotes et conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Un minimum de 5 aliquotes était réalisé par échantillon. Deux aliquotes ayant un volume minimal de 75 µL, un de 150 µL, un de 200 µL et un de 500 µL étaient requis. Ces aliquotes étaient maximisées jusqu'à épuisement du sérum.

Les phlébotomies ont été réalisées de façon standard, au niveau des veines jugulaires lorsque possible ou au niveau des veines périphériques (céphalique, saphène) avec une aiguille de calibre 22 G et une seringue de 10 mL. Les prélèvements ont été réalisés soit par les étudiants du stage, une technicienne en santé animale ou un vétérinaire.

B. Formule sanguine et biochimie

Le sang dans le tube EDTA a été utilisé pour réaliser une formule sanguine complète, incluant les indices réticulocytaires, avant et après la chirurgie avec un Advia 120 (Siemens Healthcare, Tarrytown, New York, USA). Les tubes EDTA sont déposés sur un agitateur de tube afin de bien homogénéiser le sang avant qu'un volume de 175 µL de sang soit aspiré par l'Advia 120. Par la suite 2 capillaires sont remplis et centrifugés pour déterminer le microhématocrite et les protéines totales (réfractométrie). Un frottis sanguin est également

réalisé afin d'évaluer la morphologie des érythrocytes, des leucocytes et des plaquettes et effectuer un différentiel cellulaire sur 100 leucocytes au microscope au besoin. L'ensemble des paramètres est analysé pour confirmer l'état de santé des chiens à T0. Les paramètres comptabilisés pour les analyses statistiques sont l'hématocrite (L/L), l'hémoglobine (g/L), les érythrocytes ($\times 10^{12}/L$), le CHCM (g/L), le CHCMr (g/L), le CHr (g), les réticulocytes ($\times 10^6$), les leucocytes ($\times 10^9/L$) et les neutrophiles ($\times 10^9/L$).

Les tubes secs ont été laissés à température pièce pour environ 30 minutes pour qu'un caillot se forme avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 2095 g. Une biochimie complète est par la suite réalisée sur le sérum avec un Beckman Coulter (Fullerton, Californie, USA). L'ensemble des paramètres est analysé pour confirmer l'état de santé des chiens à T0 et seulement la créatinine ($\mu\text{mol}/L$) est comptabilisée pour les analyses statistiques. La créatinine est évaluée, car la fonction rénale peut affecter l'excrétion de l'hepcidine et les paramètres érythroïdes.

C. Marqueurs de l'inflammation

L'ensemble des marqueurs de l'inflammation a été évalué avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale pour les 29 sujets à l'étude.

a. Leucogramme

La numération des leucocytes avec l'Advia 120 (Siemens Healthcare, Tarrytown, New York, USA), s'effectue via deux méthodes ce qui permet d'obtenir un contrôle interne des résultats. La première technique est une réaction cytochimique avec le 4-chloro-1-naphthol, qui permet de déterminer l'activité peroxydasique des leucocytes. Les leucocytes sont comptés lorsqu'ils passent dans le faisceau lumineux. Lors de ce passage, les différents leucocytes sont classifiés en fonction de leur volume et de l'intensité de leur activité peroxydasique. La deuxième technique utilise l'acide phtalique pour lyser les membranes des leucocytes à l'exception des basophiles. Les cellules sont alors comptées lors de leur passage devant un faisceau laser et classifiées selon leur complexité nucléaire, déterminée par la diffraction de la lumière en trois catégories (mononucléaire, granulocytaire, basophile). Par convention, la

concentration leucocytaire déterminée par cette technique est celle rapportée. Il est toutefois important de mentionner que chez certaines espèces, les basophiles ne sont pas résistants à la lyse par l'acide phtalique, et que l'évaluation de cette population avec cette technique n'est pas optimale.

Les neutrophiles présentent une forte activité péroxydasique et sont des cellules à noyaux complexes. La technique cytochimique de numération détermine le pourcentage de neutrophiles et la valeur absolue est par la suite calculée avec la concentration leucocytaire totale. Il est également possible de déterminer le pourcentage de neutrophiles en évaluant un frottis sanguin, mais cette technique est moins précise, car seulement une centaine de cellules sont évaluées. L'évaluation du frottis permet par contre de déterminer la présence de neutrophiles immatures (bands, métamyélocytes, myélocytes) et de changements toxiques (corps de Döhle, basophilie cytoplasmique, vacuolisation, granulation toxique) ce qui n'est pas effectué par l'Advia 120.

b. Protéine C-Réactive

La protéine C-Réactive est mesurée par une technique d'immunoturbidimétrie (Canine CRP, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) sur un automate de biochimie (Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA). La plage analytique du test est de 0 à 200 mg/L et un volume de 8 µL (plus le volume mort) est requis pour cette analyse. La lipémie et l'hémolyse extrême peuvent interférer avec les résultats. Il s'agit d'une technique automatisée. En résumé, l'échantillon de sérum est incubé avec une solution tampon et l'anticorps anti-CRP canine, formant un précipiter qui est mesuré par turbidimétrie à une longueur d'onde de 340 nm.

c. Interleukine-6

L'interleukine-6 est quantifiée avec un ELISA sandwich en phase solide spécifique pour les patients canins (Quantikine, R&D systems, Minnesota, USA (CA6000)). Seize des chiens, donc 32 échantillons (T0 & T2) ont été évalués en triplicata et treize des chiens, donc 26 échantillons (T0 & T2) ont été évalués en duplicata afin de maximiser l'utilisation de deux

plaques de 96 puits. L'ELISA a été réalisée selon les recommandations du fabricant (**Annexe 4**). Brièvement, les puits sont recouverts d'un anticorps polyclonal liant l'IL-6 présent dans l'échantillon. Par la suite, un deuxième anticorps, dirigée également contre L'IL-6, mais cette fois conjuguée à un agent luminescent est ajouté. Après les lavages, l'incubation et les réactions, l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'IL-6 dans l'échantillon. La plage analytique du test est de 6.1 à 2000 $\mu\text{mol/L}$ et un volume de 100 μL de sérum est requis pour chacun des puits.

D. Paramètres du fer

Le fer sérique a été évalué avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale pour les 29 sujets à l'étude et la ferritine pour seulement 20 des sujets. Les sujets sélectionnés pour la mesure de la ferritine étaient les 13 sujets préalablement choisis pour la mesure de l'hépcidine, basé sur la magnitude de la diminution et de l'augmentation du fer et de la protéine C-réactive respectivement et 7 autres sujets basés sur les mêmes critères.

a. Fer sérique

Le fer sérique est mesuré par une technique en point final minuté (Iron, Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA) sur un automate de biochimie (Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA). La plage analytique du test est de 0.9 à 89.5 $\mu\text{mol/L}$ et un volume de 25 μL (plus le volume mort) est requis pour cette analyse. La lipémie peut interférer avec les résultats. En résumé, le fer est libéré de la transferrine grâce à l'acide acétique et est par la suite réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par l'hydroxylamine et le thyoglycolate. L'ion ferreux forme immédiatement un complexe avec la FerroZine ce qui entraîne un changement dans l'absorbance, directement proportionnel à la concentration de fer.

b. Ferritine

La mesure de la ferritine a été réalisée dans un laboratoire externe, au *Kansas State Veterinary Diagnostic Laboratory*, car leur test est complètement validé chez plusieurs espèces, notamment les chiens. La technique utilisée est un ELISA spécifique canin qui utilise la technique sandwich (similaire à l'ELISA pour l'IL-6).

E. Hepcidine sérique

La mesure de l'hepcidine sérique a été réalisée sur les 13 chiens ayant eu l'augmentation la plus marquée de la CRP et une diminution la plus importante du fer sérique après la chirurgie par rapport aux valeurs basales (T0).

L'hepcidine sérique a été quantifiée avec un ELISA humain compétitif similaire à celui utilisé lors du projet pilote. Considérant que certains problèmes de sensibilité avaient été observés avec cette technique, une nouvelle version plus sensible a été développée et c'est celle qui a été utilisée (DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)). Les treize chiens, donc 26 échantillons (T0 & T2) ont été évalués en triplicata. L'ELISA a été réalisé selon les recommandations du fabricant (**Annexe 5**). Brièvement, les puits sont recouverts d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'hepcidine-25 humaine. L'hepcidine présente dans l'échantillon compétitionne avec l'hepcidine-25 conjuguée pour la liaison avec l'anticorps présent dans les puits. Après l'incubation et les lavages, l'intensité de la couleur observée est inversement proportionnelle à la concentration d'hepcidine dans l'échantillon. Un volume de 20 µL d'échantillon est nécessaire par puits et la plage analytique est de 0.15 à 81 ng/mL.

F. Résumé des tests effectués par sujet

Tableau I. Résumé des tests effectués. T0 : pré-opératoire, T2 : post-opératoire, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.

Sujets	Formule sanguine	Biochimie	CRP	IL-6	Fer	Ferritine	Hepcidine
1791049	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1791052	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1791213	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1794222	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1794221	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1794184	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1794183	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1794181	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1796162	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1796165	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1802412	T0	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X
1802738	T0	X	X	X	X	X	X

	T2	X		X	X	X	X	X
1802737	T0	X	X	X	X	X	X	X
	T2	X		X	X	X	X	X
1791047	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1791048	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1791051	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1796159	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1802420	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1802421	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1802406	T0	X	X	X	X	X	X	
	T2	X		X	X	X	X	
1791050	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1791053	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1794223	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1794220	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1794180	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1796161	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		

1796163	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1802416	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
1802417	T0	X	X	X	X	X		
	T2	X		X	X	X		
Total	T0	29	29	29	29	29	20	13
	T2	29	0	29	29	29	20	13

2.2.3. Analyses statistiques

Pour l'ensemble des analyses statistiques utilisées pour interpréter les résultats, un seuil alpha de 5 % ($p < 0.05$) était considéré comme significatif. Pour les valeurs d'interleukine-6 sous le seuil de détection, une valeur de 6.1 pg/mL (limite de détection) a été utilisée pour les analyses statistiques. Lors des analyses statistiques, les valeurs de réticulocytes, d'IL-6 et de la CRP ont été transformées en log base 10 afin de normaliser les distributions. Pour la CRP, étant donné la présence de plusieurs valeurs égale à 0 mg/L, une unité (+1) a été ajoutée à chacune des valeurs.

Un modèle linéaire à mesures répétées avec le temps comme facteur intra-sujet (ANOVA), a permis d'évaluer la différence des moyennes des valeurs d'hématocrite, d'hémoglobine, d'érythrocytes, des réticulocytes, du CHCM, du CHCMr, du CHr, des leucocytes, des neutrophiles, de la CRP, de l'IL-6, du fer, de la ferritine et de l'hepcidine avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale.

Des statistiques descriptives (moyenne, médiane, déviation standard, minimum, maximum) ont été évaluées sur l'ensemble de ces paramètres à T0 et T2 en plus de la créatinine à T0.

Pour chaque temps, des corrélations de Pearson, combiné à la transformation z' de Fisher pour les variables ne suivant pas une distribution normale ont permis d'évaluer les associations entre les différents paramètres de l'inflammation (CRP, IL-6, leucocytes,

neutrophiles) et également avec la ferritine, l'IL-6, l'hématocrite, l'hémoglobine, les érythrocytes, les réticulocytes et le CHr (pour le CRP et l'IL-6 seulement). D'autres corrélations de Pearson, ont permis d'évaluer les associations entre le fer et l'ensemble des paramètres (hématocrite, hémoglobine, érythrocytes, réticulocytes, CHCM, CHCMr, CHR, leucocytes, neutrophiles, CRP, IL-6, ferritine, hepcidine). Cette évaluation a également été réalisée pour l'hepcidine.

Afin de déterminer si certains paramètres (fer, hepcidine, ferritine, IL-6, CRP, neutrophiles, leucocytes) influencent de façon proportionnelle un autre, le pourcentage de déviation pour chacune des variables entre le T0 et le T2 ($(\text{valeur T2} - \text{valeur T0}) * 100 / (\text{valeur T0})$) a été calculé. Des corrélations de Pearson entre ces déviations ont été réalisées.

Chapitre III : Résultats

3.1. Projet pilote

3.1.1. Immunotransfert (Western Blot)

Les deux humains contrôles sont deux femmes de 25 et 34 ans. Les trois chiens sains utilisés pour évaluer la capacité de l'anticorps anti-hepcidine humaine (Anti-Hepcidin-25 antibody (ab30760)) à reconnaître l'hepcidine canine sont un chien mâle croisé stérilisé de 3 ans, un chien mâle Berger Allemand stérilisé de 1.5 an et un chien mâle Corgi stérilisé de 1.5 an. Les quatre chiens inflammatoires utilisés étaient deux chiens croisés femelles stérilisés de 12 et 13 ans, une femelle intacte Berger Anglais de 8 ans et une femelle stérilisée Cocker Américain de 10 ans.

Pour les sujets humains, deux bandes de faible intensité sont détectées à environ 24 kDa et 32 kDa (flèches vertes), alors que l'hepcidine-25 devrait avoir un poids moléculaire d'environ 3 kDa, la prohepcidine, 6.9 kDa et la préprohepcidine, 9.4 kDa. L'ensemble des chiens, autant sains qu'inflammatoires, présente une bande d'intensité modérée à environ 15 kDa représentée (flèche noire). Pour deux des chiens inflammatoires, il est possible d'observer deux bandes d'intensité modérée à environ 24 kDa et 32 kDa similaires à celles observées chez les contrôles humains (flèches rouges). Il est toutefois impossible d'évaluer la présence de ces bandes chez deux des sujets inflammatoires, car il y a une zone blanche « ennuagée » (astérisque) (**Figure 7**).

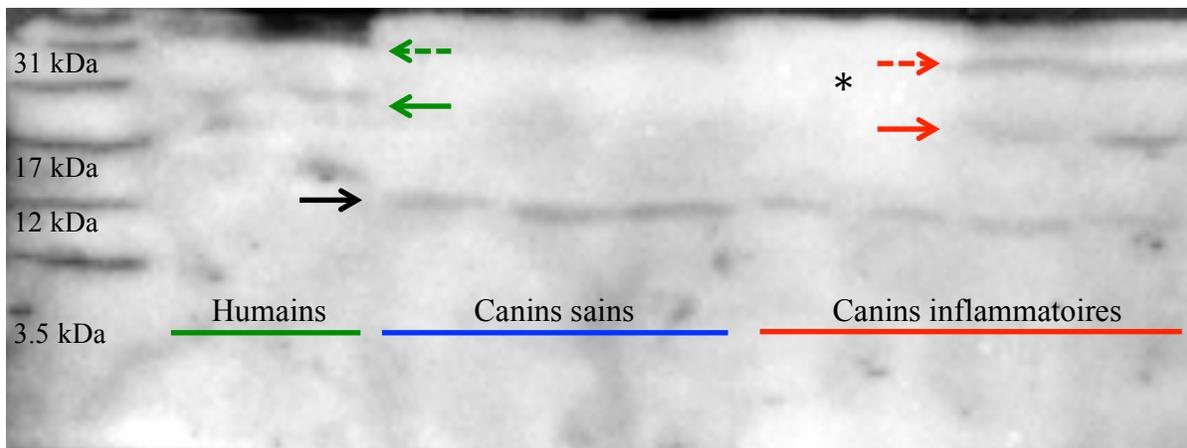


Figure 7. Résultats de l’immunotransfert. Deux bandes de faible intensité sont détectées à environ 24 kDa (flèche pleine) et 32 kDa (flèche pointillée) chez l’humain (vertes) et chez les chiens (rouges). La flèche noire indique les bandes à environ 15 kDa présentent chez l’ensemble des chiens.

3.1.2. ELISA

Les 32 chiens utilisés pour évaluer les deux ELISA représentent une variété de races et de statuts reproducteurs. Dans le groupe témoin, 9 sont des mâles (5 stérilisés) et 6 des femelles (6 stérilisées) comparativement à 6 mâles (4 stérilisés) et 12 femelles (8 stérilisées) pour le groupe inflammatoire. Les races représentées sont le Labrador/Labrador-retriever (5), le Golden-retriever (2), le Boxer (2), le Berger Allemand (2), le Shar-pei (2), le Bichon Maltais (2), le Berger Australien (1), le West-highland-white-terrier (1), l’Épagneul Breton (1), le Pitt-bull (1), le Caniche royal (1), le Beagle (1), le Bouvier Australien (1) et des chiens de races croisées (10).

Les chiens du groupe inflammatoire ont une concentration en neutrophiles significativement plus élevée ($p < 0.05$) que le groupe témoin. Ce résultat combiné à la présence de changements toxiques, et la présence d’un léger virage à gauche chez 8 des 17 sujets sont compatibles avec un processus inflammatoire.

Les résultats de l'ELISA canin (Cusabio Dog Hepsidin (HAMP) (CSB-EL010124DO) et humain (DRG Hepsidin 25 bioactive (EIA-5258)) ne sont pas significativement corrélée ($p = 0.19$, $r = -0.237$) (courbes standards : **Annexe 6 et 7**) De plus, il n'y a pas de différence significative entre l'hepcidine dans le groupe inflammatoire par rapport au groupe sain ($p > 0.05$) pour les deux ELISA. Aucun des chiens n'avait une valeur sous la limite de détection pour l'ELISA canin (0.78 ng/mL) et bien que cette limite ne soit pas disponible pour l'ELISA humain, aucune des valeurs n'était sous la plus faible concentration de la courbe standard (2 ng/mL). Les résultats obtenus pour les différentes concentrations d'hepcidine recombinante canine (Hepsidin (dog), peptides international (PLP-3785-PI)) ne correspondent pas aux concentrations attendues (**Tableau II**) pour les deux ELISA. Toutefois, une corrélation significative (Spearman) ($p < 0.01$, $r = 0.886$) est présente entre les concentrations attendues et les concentrations obtenues avec l'ELISA humain (**Figure 8**)

Tableau II. Concentrations obtenues avec l'ELISA canin (Cusabio Dog Hepsidin (HAMP) (CSB-EL010124DO)) et l'ELISA humain (DRG Hepsidin 25 bioactive (EIA-5258)) par rapport aux concentrations attendues avec la protéine d'hepcidine recombinante (Hepsidin (dog), peptides international (PLP-3785-PI)).

Attendues (ng/mL)	2	6.12	12.5	25	50	100	150	200
ELISA Canin (ng/mL)	5.70	4.78	4.76	5.51	6.39	5.30	5.22	5.68
ELISA Humain (ng/mL)	1.12	1.11	1.12	1.14	1.20	4.52	2.14	4.36

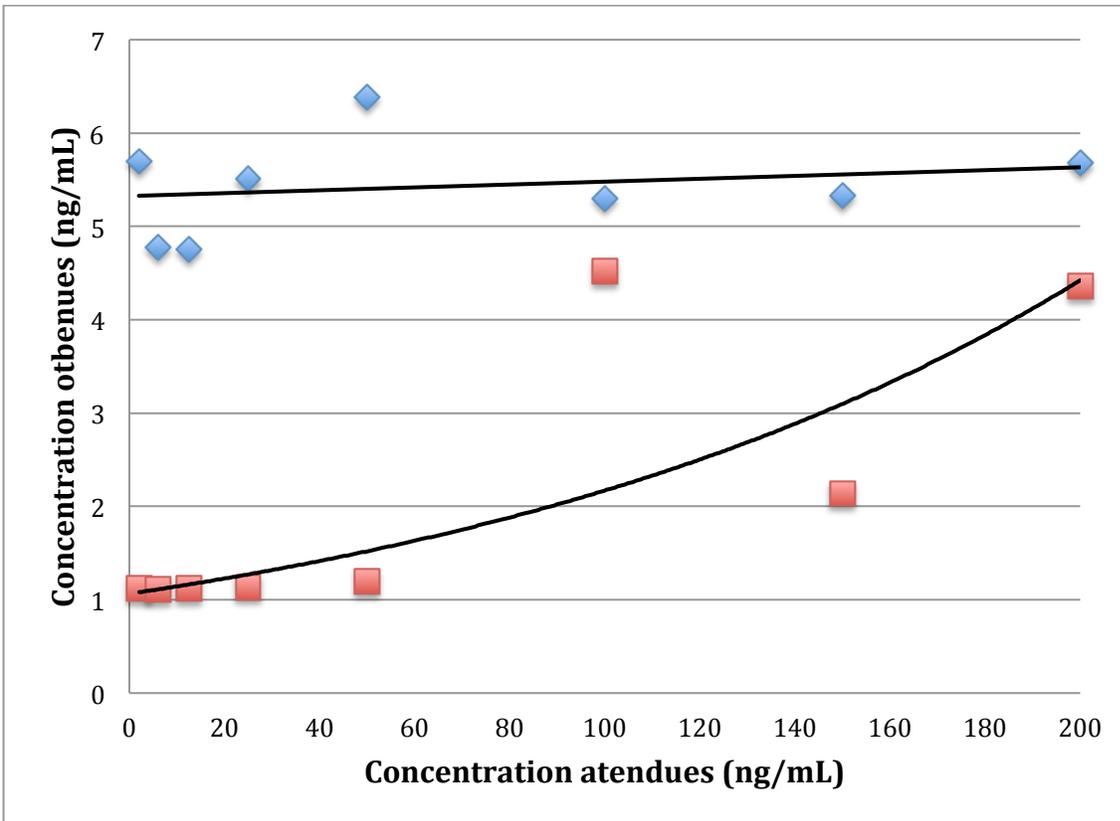


Figure 8. Comparaison des concentrations obtenues avec l’ELISA canin en bleu (Cusabio Dog Hecpidin (HAMP) (CSB-EL010124DO)) et l’ELISA humain en rouge (DRG Hecpidin 25 bioactive (EIA-5258)) par rapport aux concentrations attendues. Une corrélation (Spearman), $r = 0.886$, $p < 0.01$ est présente entre l’ELISA humain et les concentrations attendues.

Les résultats du projet pilote ne sont pas ceux attendus. Des bandes ont été observées lors de l’immunotransfert avec un anticorps humain. Toutefois, ces bandes ne correspondent pas au poids moléculaire attendu pour l’hepcidine-25, autant chez les humains que chez les chiens. L’ELISA canin et l’ELISA humain, n’ont pas permis de mettre en évidence une différence entre les groupes. Ces ELISA n’ont également pas permis de quantifier de façon adéquate les concentrations de la protéine recombinante canine, malgré que les valeurs obtenues avec l’ELISA humain démontrent une corrélation significative et forte avec les valeurs attendues. Suite à ces résultats, des discussions avec le fournisseur de l’ELISA humain

(DRG) ont permis d'apprendre la venue d'un ELISA avec une sensibilité accrue (DRG Hecpidin 25 (bioactive) HS (EIA-5782), donnant des résultats supérieurs à l'ELISA utilisé, dont la sensibilité avait été critiquée par des utilisateurs. Également, considérant des résultats encourageant chez les chats avec l'ELISA humain et que la protéine canine démontre une homologie équivalente à celle du chat avec la protéine humaine, la décision de poursuivre le projet avec cet ELISA a été prise.

3.2. Projet principal

3.2.1. Animaux

Les 29 chiens utilisés pour le projet principal sont tous des femelles ayant subi une ovariectomie dans le cadre des exercices chirurgicaux lors du stage préclinique (DMV 41251) à l'automne 2015. Cette population est représentée par des chiennes de plusieurs races (**Figure 9**) ayant une moyenne d'âge de 2.8 ans (min : 1 an, max : 6 ans) et un poids moyen de 20.9 Kg (min : 9.4 Kg, max : 34 Kg). La durée moyenne de l'intervention chirurgicale était de 200 minutes (min : 90 min, max : 265 min) et les sujets ont en moyenne reçu 582.2 mL (min : 4.1 mL/Kg, max : 48.2 mL/Kg) de fluide (solution de lactate de Ringer). L'ensemble des sujets dont le dossier a pu être évalué (26/29), a reçu de l'antibioprophylaxie lors de la chirurgie (Cefazolin), 88 % (23/26) des anti-inflammatoires post-opératoires (Meloxicam), avant le prélèvement T2, 46 % (12/26) de l'hydromorphone per-opératoire et un sujet en a également reçu après l'intervention.

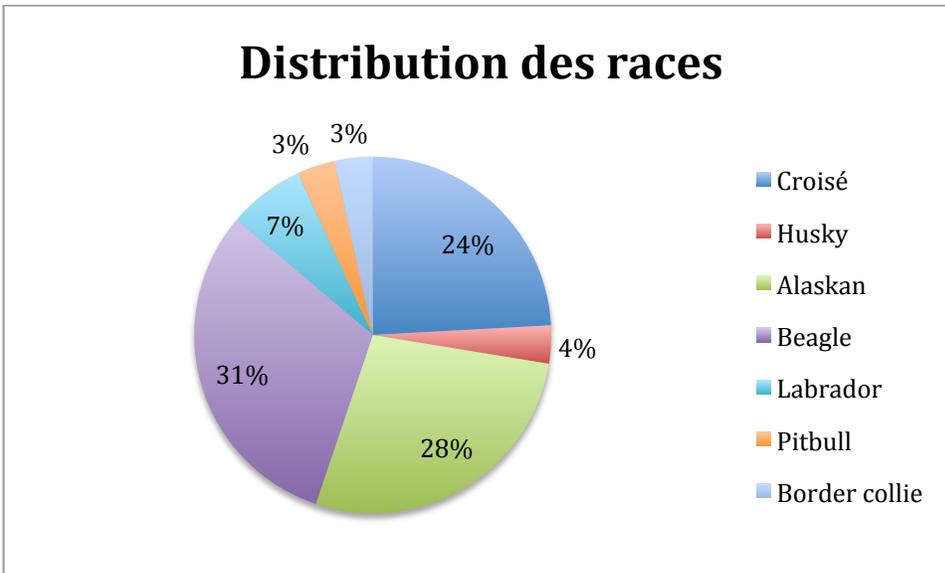


Figure 9. Distribution des races des 29 sujets à l'étude.

3.2.2. Paramètres hématobiochimiques sélectionnés

Une formule sanguine ainsi qu'une biochimie complète ont été réalisées, toutefois seulement les paramètres d'intérêts seront présentés. Les leucocytes et les neutrophiles seront présentés dans la section 3.2.3 avec les autres marqueurs de l'inflammation.

A. Paramètres érythroïdes

Suite à l'intervention chirurgicale, une diminution significative ($p < 0.0001$) de la moyenne de l'hématocrite (0.43 ± 4.88 L/L), de l'hémoglobine (148 ± 16 g/L) et des érythrocytes ($6.09 \pm 0.73 \times 10^{12}/L$) est observée au temps 2 (**Tableau III**). Une diminution proportionnelle moyenne d'environ 8% après la procédure est observée pour ces paramètres (**Tableau IV**).

Une diminution, plus modeste, mais hautement significative ($p < 0.0001$), (**Tableau III**) d'en moyenne 2.24 % (**Tableau IV**) est également observée pour les réticulocytes. La variation entre les mesures pour cette variable est toutefois très importante (écart-type).

Tableau III. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour l'hématocrite, l'hémoglobine, les érythrocytes et les réticulocytes. La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.

		Moyenne	Minimum	Maximum	Valeur de P
Hématocrite (L/L)	T0	0.46 (0.05)	0.37	0.59	< 0.0001
	T2	0.43 (0.05)	0.34	0.52	
Hémoglobine (g/L)	T0	162 (16)	132	199	< 0.0001
	T2	147 (16)	121	183	
Érythrocytes (x10 ¹² /L)	T0	6.65 (0.73)	5.20	8.25	< 0.0001
	T2	6.09 (0.73)	5.06	7.81	
Réticulocytes (x10 ⁶ /L)	T0	32817 (22270)	4180	86900	< 0.0001*
	T2	23551 (13576)	7800	63700	

* La valeur de p a été calculée suite à une transformation logarithmique (base 10).

Tableau IV. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0.

	n	Moyenne (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Hémoglobine	28	-8.18 (6.21)	-17.92	6.10
Hématocrite	29	-8.20 (7.65)	-20.00	8.51
Érythrocytes	29	-8.28 (6.51)	-19.05	6.93
Réticulocytes	28	-2.24 (5.82)	-11.69	14.18

B. Indices érythrocytaires et réticulocytaires

Les indices érythrocytaires et réticulocytaires tels que le CHCM, le CHCMr et le CHr ne sont pas statistiquement différents après la chirurgie par rapport aux valeurs basales (**Tableau V**). Le pourcentage de déviation moyen est de moins d'un pourcent pour l'ensemble de ces indices (**Tableau VI**).

Tableau V. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CHCM), la concentration globulaire moyenne en hémoglobine réticulocytaire (CHCMr) et la concentration en hémoglobine réticulocytaire (CHr). La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.

		Moyenne	Minimum	Maximum	Valeur de P
CHCM (g/L)	T0	330 (4.63)	320	342	0.37
	T2	331 (4.68)	324	342	
CHCMr (g/L)	T0	339 (5.28)	329	354	0.27
	T2	338 (4.54)	330	348	
CHr (g)	T0	25.4 (1.26)	20.5	27.4	0.42
	T2	25.2 (0.86)	23.6	27.1	

Tableau VI. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0 pour la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CHCM), la concentration globulaire moyenne en hémoglobine réticulocytaire (CHCMr) et la concentration en hémoglobine réticulocytaire (CHr).

	n	Moyenne (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
CHCM	29	0.20 (1.16)	-2.41	2.80
CHCMr	29	-0.20 (0.98)	-2.07	2.10
CHr	29	-0.51 (5.32)	-6.71	23.41

C. Créatinine

La créatinine a été évaluée uniquement avant la chirurgie et aucun des sujets ne présentait une azotémie (créatinine > 120 umol/L). La concentration moyenne est de 84 umol/L (+/- 16.5) avec une valeur minimale de 60 umol/L et une maximale de 115 umol/L.

3.2.3. Marqueurs de l'inflammation

Tous les marqueurs de l'inflammation démontrent une augmentation hautement significative ($p < 0.0001$) suite à l'intervention chirurgicale (T2) (**Tableau VII**). L'augmentation la plus marquée est notée pour les neutrophiles, avec une moyenne d'augmentation de plus de 80 % et un maximum atteignant plus de 300 % suivie par les leucocytes qui ont grimpé de plus de 55 % en moyenne (**Tableau VIII**).

L'augmentation de l'interleukine – 6 est plus marginale, avec en moyenne un peu plus de 5 % d'augmentation, mais pouvant atteindre plus de 36 %. Également la variation au sein de cette distribution de donnée est plutôt élevée (écart-type) (**Tableau VIII**) et 31 des 58 (T0 : 18/29, T2 : 13/29) des valeurs obtenues étaient sous la limite de détection (6.1 pg/mL). (Courbes standards : **Annexe 8**)

L'augmentation pour la CRP est plus difficilement évaluable considérant que la plupart des individus (24/29) avaient des concentrations indétectables de cette protéine avant la procédure. Toutefois, chez certains sujets ayant une concentration basale de 0 mg/L, des concentrations allant jusqu'à 108.4 mg/L sont mesurées suite à la chirurgie, ce qui suggère qu'une augmentation de plus de 100 fois peut être notée pour ce paramètre.

Tableau VII. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour les leucocytes, les neutrophiles, l'interleukine-6 (IL-6) et la protéine C-réactive (CRP). La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.

		Moyenne	Minimum	Maximum	Valeur de P
Leucocytes (x10⁹/L)	T0	11.72 (4.39)	4.78	22.40	< 0.0001
	T2	17.21 (4.20)	10.04	24.99	
Neutrophiles (x10⁹/L)	T0	8.30 (3.81)	3.20	19.04	< 0.0001
	T2	13.53 (3.48)	8.23	22.68	
IL-6 (pg/mL)	T0	12.94 (16.34)	6.1	86.8	< 0.0001*
	T2	14.53 (18.12)	6.1	99.2	
CRP (mg/L)	T0	4.3 (12.4)	0	58.2	< 0.0001*
	T2	61.1 (27.6)	23.8	116.6	

* La valeur de p a été calculée suite à une transformation logarithmique (base 10).

Tableau VIII. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0 pour les leucocytes, les neutrophiles et l'interleukine-6 (IL-6))

	n	Moyenne (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Leucocytes	29	56.07 (41.2)	-1.21	215.5
Neutrophiles	29	81.53 (61.8)	-12.82	303.6
IL-6	28	5.62 (11.46)	-13.90	36.1

3.2.4. Paramètres du fer

Une diminution significative ($p < 0.0001$) de la moyenne ($14.5 \pm 6.0 \mu\text{mol/L}$) du fer sérique est observée au temps 2 (**Tableau IX**). Cette diminution importante est en moyenne de 40 %, mais peut atteindre plus de 75 % (**Tableau X**). Contrairement au fer, il n'y a pas de différence significative ($p = 0.75$) pour la ferritine entre le temps 0 et le temps 2. (**Tableaux IX**) De plus, au temps 2, certains sujets présentent une diminution importante d'environ 35 % et d'autres une augmentation allant jusqu'à 45 % (**Tableau X**).

Tableau IX. Valeurs moyennes (écart type de la distribution), minimums, maximums au temps 0 (T0) et au temps 2 (T2) pour le fer et la ferritine. La valeur de p correspond à la comparaison des moyennes des deux temps.

		Moyenne	Minimum	Maximum	Valeur de P
Fer ($\mu\text{mol/L}$)	T0	26.4 (9.0)	13.6	54.2	< 0.0001
	T2	14.5 (6.0)	7.8	33.5	
Ferritine (ng/L)	T0	302 (98)	145	550	0.75
	T2	298 (99)	147	577	

Tableau X. Nombres de sujets (n), pourcentages de déviation moyens (écart type), minimums, maximums au temps 2 par rapport au temps 0 pour le fer et la ferritine.

	n	Moyenne (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Fer	29	-40.39 (26.22)	-78.27	8.14
Ferritine	20	0.43 (18.29)	-34.24	45.34

3.2.5. Hepcidine

La moyenne de l'hepcidine sérique est significativement ($p = 0.04$) plus élevée au temps 2 (5.50 +/- 2.20 ng/mL) par rapport au temps 0 (4.5 +/- 3.2 ng/mL) cette augmentation est observée chez 10 des 13 individus évalués. Bien que le seuil de signification soit atteint, les concentrations sont relativement faibles, et il est possible d'observer un chevauchement important entre les valeurs en évaluant l'écart-type qui est de 2.2 et 3.2 au temps 0 et 2 respectivement. Aucune des valeurs obtenues était sous la limite de la plage analytique [0.15-81 ng/mL). La déviation moyenne pour ce paramètre est une augmentation de près de 22 % atteignant un maximum de 74 %. Toutefois, une diminution allant jusqu'à 26.7 % est également observée. (Courbe standard : **Annexe 9**)

Les 13 individus évalués pour l'hepcidine ont également été évalués pour l'ensemble des autres paramètres. Des représentations graphiques détaillées des résultats pour chacun de ces chiens, pour l'hepcidine (**Figure 10A**), le fer sérique (**Figure 10B**), la CRP (**Figure 11A**), l'IL-6 (**Figure 11B**), la ferritine (**Figure 12A**) et les neutrophiles (**Figure 12B**) permettent d'observer les tendances décrites plus haut.

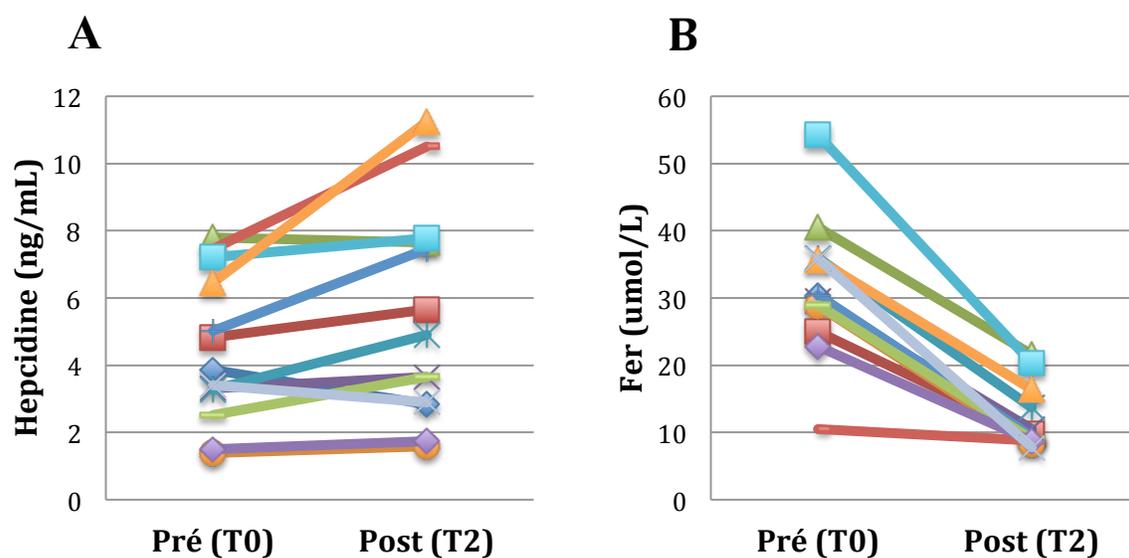


Figure 10. Graphiques détaillés de la concentration d’hepcidine sérique (A) et du fer sérique (B) des 13 sujets avant (pré T0) et après (post T2) l’intervention chirurgicale. $p = 0.04$ et $p < 0.0001$ respectivement.

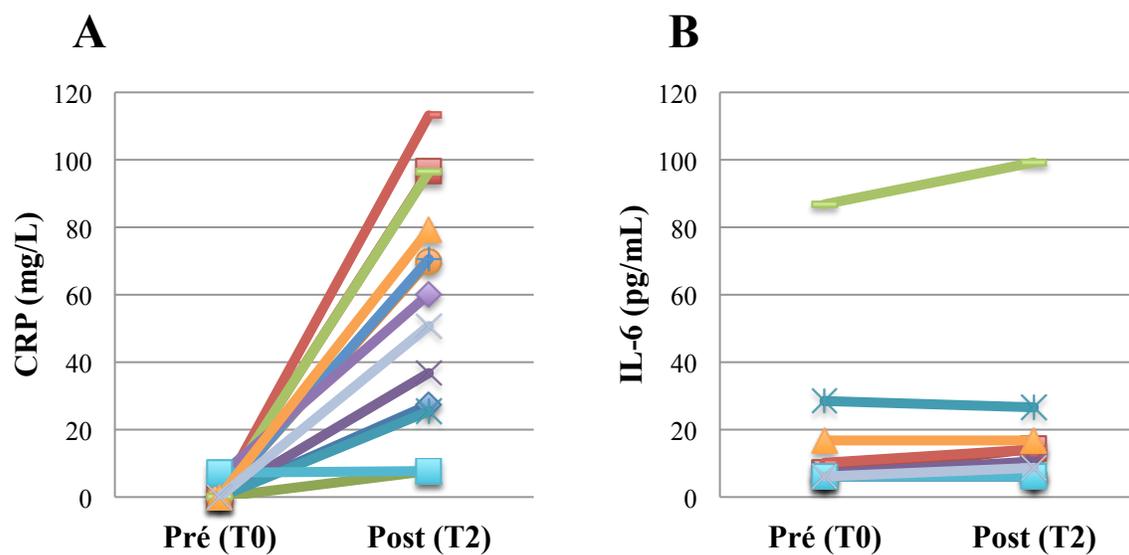


Figure 11. Graphiques détaillés de la concentration de la CRP (A) et de l’IL-6 (B) des 13 sujets avant (pré T0) et après (post T2) l’intervention chirurgicale. $p < 0.0001$ et $p = 0.04$ respectivement.

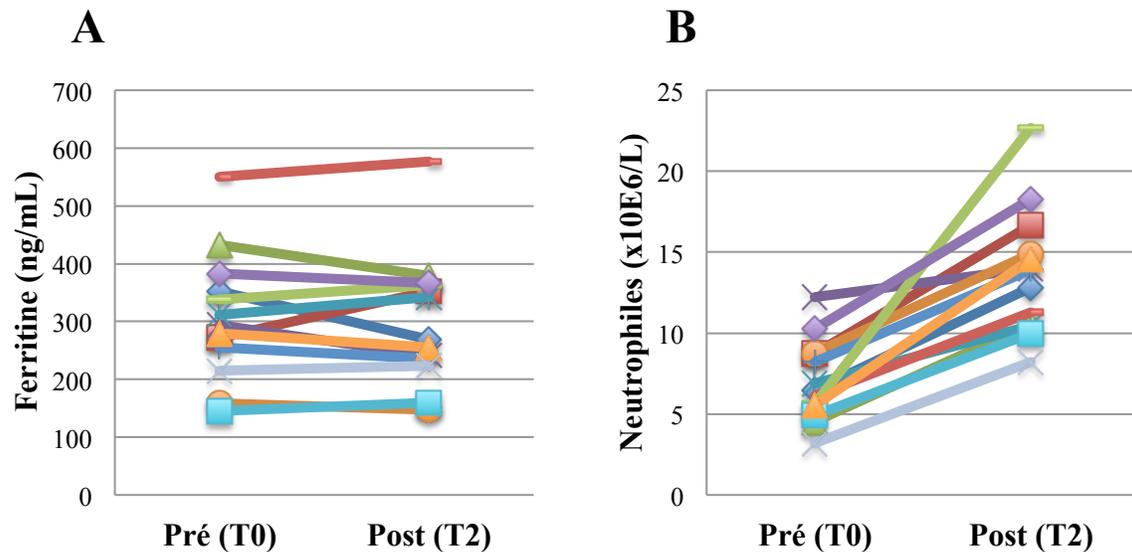


Figure 12. Graphiques détaillés de la concentration de la ferritine (A) et des neutrophiles (B) des 13 sujets avant (pré T0) et après (post T2) l'intervention chirurgicale. $p = 0.96$ et $p < 0.0001$ respectivement.

3.2.6. Corrélations

Considérant que l'étude évalue de nombreuses variables, et que des liens devraient exister entre certaines d'entre elles, il est pertinent de tenter d'évaluer les corrélations.

A. Paramètres érythroïdes

Bien que des corrélations entre certains paramètres tels que l'hématocrite, l'hémoglobine et les érythrocytes soient fortes ($r > 0.91$), significatives ($p < 0.0001$) et attendues, d'autres sont moins intuitives. Une corrélation positive, faible à modérée ($r = 0.391$) et significative ($p = 0.04$) est observée entre l'hématocrite et les réticulocytes au temps 0. Cette corrélation suggère que plus l'hématocrite est bas, plus les réticulocytes sont bas ou vice-versa. Au temps 2, les résultats sont similaires ($r = 0.351$) sans toutefois atteindre le seuil de signification ($p = 0.06$). Une corrélation faible à modérée, cette fois inverse ($r = -0.379$) est

observée entre l'hématocrite et la CRP indiquant qu'un hématocrite bas est associé à une valeur de la CRP élevée. Cette corrélation significative ($p = 0.04$) est présente uniquement au temps 0. Les paramètres érythroïdes ne sont, par contre, pas statistiquement corrélés avec les leucocytes et les neutrophiles pour les deux temps. Également, aucune corrélation significative entre l'hématocrite et les autres paramètres tels que l'IL-6, le fer et l'hepcidine n'a été observée (**Tableau XI**).

Tableau XI. Corrélations entre l'hématocrite et les autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.

		Temps	Corrélation	IC 95 %	Valeur de P
Hématocrite	Réticulocytes	T0	0.391	0.021 - 0.667	0.04
		T2	0.351	-0.018 - 0.635	0.06
	Hémoglobine	T0	0.984	0.966 - 0.993	< 0.0001
		T2	0.966	0.928 - 0.984	< 0.0001
	Érythrocytes	T0	0.943	0.882 - 0.973	< 0.0001
		T2	0.940	0.876 - 0.972	< 0.0001
	CRP	T0	-0.379	-0.654 - -0.015	0.04
		T2	0.118	-0.269 - 0.469	0.54
	IL-6	T0	0.153	-0.227 - 0.466	0.42
		T2	0.231	-0.155 - 0.556	0.23
	Fer	T0	-0.060	-0.418 - 0.312	0.75
		T2	0.053	-0.320 - 0.411	0.78
	Hepcidine	T0	0.118	-0.463 - 0.627	0.70
		T2	0.153	-0.434 - 0.649	0.61
	Leucocytes	T0	-0.097	-0.448 - 0.279	0.61
		T2	0.149	-0.230 - 0.489	0.44
	Neutrophiles	T0	-0.143	-0.448 - 0.279	0.45
		T2	0.144	-0.235 - 0.485	0.45
Érythrocytes	Hémoglobine	T0	0.917	0.828 - 0.960	< 0.0001
		T2	0.931	0.856 - 0.968	< 0.0001

B. Marqueurs de l'inflammation

Des corrélations très fortes et significatives ($p < 0.0001$) entre les leucocytes et les neutrophiles sont présentes au temps 0 ($r = 0.969$) et au temps 2 ($r = 0.883$). Cette corrélation est très forte, mais est attendue, considérant que les neutrophiles représentent en général la majorité des leucocytes. Les leucocytes présentent également une corrélation modérée ($r = 0.405$) avec la CRP au temps 0 sans toutefois que ce soit répétable au temps 2. Des résultats similaires sont notés avec les neutrophiles et la CRP, sans que toutefois le seuil de signification soit atteint ($p = 0.05$) au temps 0 (**Tableau XII**).

L'interleukine-6 ne semble pas présenter de corrélation significative avec les leucocytes et la CRP pour les deux temps. Par contre, une corrélation positive modérée ($r = 0.466$) est observée au temps 2 avec les neutrophiles, mais n'est pas présente au temps 0 (**Tableau XII**).

Tableau XII. Corrélations entre les paramètres de l'inflammation et autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.

		Temps	Corrélation	IC 95 %	Valeur de <i>P</i>
Leucocytes	Neutrophiles	T0	0.969	0.935 - 0.986	< 0.0001
		T2	0.883	0.765 - 0.944	< 0.0001
IL-6	Leucocytes	T0	-0.055	-0.413 - 0.318	0.78
		T2	0.293	-0.090 - 0.600	0.13
	Neutrophiles	T0	-0.053	-0.411 - 0.320	0.78
		T2	0.466	0.133 - 0.715	0.01
	CRP	T0	0.034	-0.336 - 0.396	0.86
		T2	0.113	-0.272 - 0.466	0.56
CRP	Leucocytes	T0	0.405	0.045 - 0.268	0.026
		T2	-0.158	-0.496 - 0.220	0.41
	Neutrophiles	T0	0.361	-0.007 - 0.642	0.05
		T2	0.068	-0.306 - 0.424	0.72

C. Paramètres du fer

Contrairement à ce qui est attendu, aucune corrélation n'est observée entre le fer et la ferritine, et ce peu importe le temps. Toutefois, des corrélations inverses, modérées et significatives ($p < 0.01$) sont observées au temps 0 entre le fer et les leucocytes ($r = -0.474$) et le fer et les neutrophiles ($r = -0.468$). Cette corrélation est perdue au temps 2 pour les leucocytes, mais persiste pour les neutrophiles sans toutefois atteindre un niveau de signification suffisant ($p = 0.08$). Ces résultats indiquent qu'une valeur élevée de leucocytes et neutrophiles est associée à une valeur plus faible de fer sérique. Une tendance semblable est présente entre le fer et le CRP, sans que toutefois les résultats soient statistiquement significatifs (**Tableaux XIII**). Le fer n'est également pas corrélé avec les paramètres

érythroïdes (Htc, Hgb, Érythrocytes) et les indices érythrocytaires (CHCM) et réticulocytaires (CHCMr, CHr) (données non affichées).

La ferritine, pour sa part, n'est pas corrélée avec aucun des paramètres de l'inflammation évalués (leucocytes, neutrophiles; données non affichées, CRP) pour les deux temps à l'exception de l'IL-6 au temps 2 avec une corrélation directe, modérée ($r = 0.495$) et significative ($p = 0.03$). Cette tendance n'est pas présente au temps 0 (**Tableau XIII**).

Tableau XIII. Corrélations entre les paramètres du fer et autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6..

		Temps	Corrélation	IC 95 %	Valeur de <i>P</i>	
Fer	Ferritine	T0	-0.179	-0.576 - 0.286	0.44	
		T2	-0.11	-0.576 - 0.156	0.64	
	Leucocytes	T0	-0.474	-0.716 - -0.130	0.008	
		T2	-0.078	-0.433 - 0.296	0.68	
	Neutrophiles	T0	-0.468	-0.712 - -0.122	0.009	
		T2	-0.324	-0.618 - 0.048	0.08	
	IL-6	T0	-0.107	-0.455 - 0.271	0.58	
		T2	-0.230	-0.556 - 0.156	0.23	
	CRP	T0	-0.339	-0.627 - 0.032	0.07	
		T2	-0.268	-0.578 - 0.109	0.15	
	Ferritine	IL-6	T0	0.192	-0.274 - 0.584	0.41
			T2	0.495	0.053 - 0.775	0.03
CRP		T0	0.167	-0.298 - 0.567	0.48	
		T2	0.318	-0.145 - 0.667	0.16	

D. L'hepcidine

L'hepcidine est positivement et significativement ($p = 0.02$) corrélée (0.608) avec le fer au temps 0. Cette corrélation n'est cependant plus significative au temps 2 ($r = 0.515, p = 0.06$). Aucune corrélation significative n'est observée entre l'hepcidine et la ferritine et les paramètres de l'inflammation (**Tableau XIV**). Aucune corrélation significative n'est observée pour l'ensemble des autres paramètres évalués (Hct, Hgb, Érythrocytes, CHCM, CHCMr, CHr) (données non affichées).

Tableau XIV. Corrélations entre l'hepcidine et les autres paramètres sélectionnés avant (T0) et après (T2) l'intervention chirurgicale. IC : Intervalle de confiance, CRP : protéine C-réactive, IL-6 : interleukine-6.

		Temps	Corrélation	IC 95 %	Valeur de <i>P</i>
Hepcidine	Fer	T0	0.608	0.085 - 0.707	0.02
		T2	0.515	-0.05 - 0.831	0.06
	Ferritine	T0	0.282	-0.318 - 0.721	0.34
		T2	0.323	-0.278 - 0.742	0.27
	CRP	T0	-0.390	-0.774 - 0.205	0.18
		T2	0.405	-0.187 - 0.782	0.16
	IL-6	T0	-0.160	-0.653 - 0.429	0.60
		T2	0.114	-0.492 - 0.646	0.72
	Leucocytes	T0	-0.459	-0.806 - 0.123	0.10
		T2	-0.327	-0.744 - 0.273	0.26
	Neutrophiles	T0	-0.469	-0.810 - 0.110	0.09
		T2	-0.224	-0.689 - 0.373	0.45

E. Pourcentages de déviations

Il n'a pas été possible de démontrer que des corrélations entre les pourcentages de déviations avant (T0) et après la chirurgie (T2) étaient présentes entre certains paramètres sélectionnés (**Tableau XV**). Cette analyse a été réalisée afin d'évaluer si certains paramètres influencent de façon proportionnelle un autre.

Tableau XV. Corrélations entre les pourcentages de déviations au temps 2 (T2) par rapport au temps 0 (T0) pour des paramètres sélectionnés. IL-6 : Interleukine-6

		n	Corrélation	Valeur de P
Fer	Hepcidine	13	0.192	0.52
	IL-6	28	-0.115	0.56
	Ferritine	20	0.21	0.37
Ferritine	Leucocytes	20	0.160	0.50
	Neutrophiles	20	0.247	0.29
IL-6	Leucocytes	28	-0.126	0.52
	Neutrophiles	28	-0.129	0.52
	Hepcidine	12	-0.258	0.42
	Ferritine	19	-0.224	0.35

Chapitre IV: Discussion

4.1. Projet pilote

4.1.1. Immunotransfert (Western blot)

Des bandes à environ 24 kDa et 32 kDa ont été observés à la fois chez les humains contrôles et chez les deux chiens inflammatoires où la zone était lisible. Ces bandes pourraient représenter différentes formes d'hepcidine sérique comme la préprohepcidine ou la prohepcidine qui ont un poids moléculaire plus élevé que l'hepcidine mature.⁹⁴ Toutefois, la préprohepcidine et la prohepcidine devraient avoir un poids moléculaire de 9.4 kDa et 6.9 kDa respectivement, ce qui ne correspond pas aux poids obtenus selon l'échelle de poids moléculaire utilisée. Cette différence de poids pourrait être attribuable à des changements post-translationnels tels que la glycosylation, la phosphorylation, la méthylation, etc. De plus, la dimérisation des protéines peut également affecter la migration des protéines sur le gel. Bien que le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le B-mercaptoethanol soient utilisés lors de la préparation des échantillons et du gel afin de briser les ponts disulfides et dénaturer la structure secondaire, tertiaire, et quaternaire des protéines pour les rendre linéaires et faciliter leur migration, il est possible que cette étape n'ait pas fonctionné à son plein potentiel.

Une bande à 15 kDa est observée chez l'ensemble des chiens, mais pas chez les contrôles humains. L'absence de ces bandes chez les humains suggère une liaison non spécifique de l'anticorps à une autre protéine. Il est par contre possible qu'il s'agisse d'une forme l'hepcidine canine avec une conformation et/ou des changements post-translationnels différents de l'humain et donc un poids moléculaire différent. Il est également important de noter que bien que le nom commercial de l'anticorps (Anti-Hepcidin-25 antibody (ab30760)) utilisé suggère qu'il est spécifique pour l'hepcidine mature, lorsque la compagnie a été contactée suite aux manipulations, il a été révélé que l'anticorps reconnaît toutes les formes d'hepcidine. Cette information supporte l'hypothèse que les bandes observées soient des isoformes ou des formes immatures de la protéine.

L'ensemble des résultats, en assumant que l'anticorps utilisé est spécifique pour l'hepcidine, indique que cet anticorps humain peut lier l'hepcidine canine et pourrait être utilisé dans un immuno-essai (ELISA). Il aurait été intéressant de confirmer que les bandes obtenues sont bel et bien des protéines d'hepcidine liées par l'anticorps. Pour ce faire, suite à l'électrophorèse, des sections du gel comprenant les bandes de poids moléculaire 15, 24 et 32 kDa auraient pu être séquencés.

4.1.2. ELISA

L'absence de corrélation entre les résultats des deux ELISA pourrait suggérer qu'un des deux ELISA ou les deux ne sont pas adéquats pour déterminer les concentrations d'hepcidine sérique chez le chien. De plus, le fait que les résultats obtenus pour les différentes concentrations de protéine canine recombinante ne correspondent pas aux valeurs attendues pour les deux ELISA est également en faveur que ces deux ELISA ne peuvent être utilisées chez le chien. Toutefois, une corrélation significative a été observée entre les valeurs attendues et celles obtenues avec l'ELISA humain. Également, il est possible que le problème se situe au niveau la protéine recombinante et que celle-ci ne soit pas de l'hepcidine canine ou que les anticorps utilisés dans les ELISA ne détectent pas cette protéine recombinante, car elle ne possède pas la même conformation que la protéine native et que les épitopes ciblés sont inaccessibles ou que la séquence immunologique utilisée par l'anticorps n'est pas présente sur la protéine. Malheureusement, il n'est pas possible d'obtenir des informations concernant les sites de liaisons des anticorps ou d'en obtenir des échantillons pour vérifier la liaison avec la protéine recombinante par immunotransfert. Une erreur lors de la dilution de la protéine lyophilisée est également à considérer, mais semble peu probable.

Malgré que les chiens dans le groupe inflammatoire présentent des changements hématologiques indiquant un processus inflammatoire, il n'a pas été possible de démontrer une différence significative entre l'hepcidine sérique chez ces chiens et les chiens du groupe sains, et ce, autant pour l'ELISA humain que canin. Il est possible que les sujets sélectionnés dans le groupe inflammatoire ne présentent pas une inflammation suffisante pour qu'une différence entre les deux groupes soit notée ou que les niveaux d'hepcidine soient retournés à

des valeurs basales avant que les changements hématologiques se normalisent.¹⁵⁶ Bien que ce soit moins probable, il est possible que certains chiens du groupe sains présentent un processus inflammatoire stimulant la production d'hepcidine sans toutefois entraîner une neutrophilie et des changements toxiques, brouillant ainsi les résultats. Une évaluation de la CRP et de l'IL-6 aurait permis de mieux sélectionner les sujets. Aussi, la dilution des échantillons peut entraîner une augmentation de la variabilité et ainsi réduire la sensibilité du test et limiter la capacité de voir une différence entre les groupes. Considérant que les échantillons ont été dilués (1 : 2) et que les concentrations obtenues sont très faibles, cette hypothèse doit être également considérée.

Malgré que les bandes obtenues lors de l'immunotransfert ne correspondent pas aux poids moléculaires attendus pour les différentes formes d'hepcidine, une liaison a été observée autant chez l'humain que chez le chien, suggérant qu'un anticorps humain peut lier la protéine canine. Comme mentionné ci-haut, le poids moléculaire a pu être affecté par des changements post-translationnels ce qui pourrait expliquer les différences entre les deux espèces. Toutefois, l'anticorps utilisé lors de l'immunotransfert n'est pas le même que celui utilisé dans les deux ELISA et leur sensibilité et sites de liaisons peuvent grandement varier.

Bien que les résultats des ELISA ne soient pas ceux attendus, les résultats prometteurs obtenus avec l'ELISA humain chez les chats, la présence d'une corrélation entre les valeurs attendues et obtenues et considérant la présence d'une homologie importante entre la protéine canine et humaine, comme celle du chat, combiné à la disponibilité d'une nouvelle version hautement sensible, la décision de poursuivre l'investigation de l'hepcidine sérique avec l'ELISA humain (DRG Heparin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)) a été prise. Cette décision a été faite en gardant en tête que les résultats obtenus devront être interprétés prudemment, étant donné qu'une validation n'a pas été réalisée, car trop onéreuse.

4.2. Projet principal

4.2.1. Paramètres hématobiochimiques sélectionnés

A. Paramètres érythroïdes

Une diminution proportionnelle et significative de l'hématocrite, l'hémoglobine et des érythrocytes ont été observés suite à l'intervention chirurgicale. Le fait que ces trois paramètres diminuent de façon proportionnelle est attendu considérant, entre autres, que l'hématocrite est calculé à partir des érythrocytes et du VGM. Cette diminution, bien que légère, est significative et peut être attribuable à une combinaison de plusieurs éléments. Lors de la chirurgie, les sujets ont perdu une quantité faible à modérée de sang ce qui peut entraîner une diminution des paramètres érythroïdes. Également, lors de cette intervention, les chiennes ont reçu une quantité relativement importante de fluide de remplacement intraveineux pouvant entraîner une hémodilution. Toutefois, une redistribution des fluides au niveau des tissus extravasculaires est généralement rapide et en présence d'une fonction rénale adéquate, les surplus sont rapidement excrétés dans l'urine. Également, aucune corrélation entre le pourcentage de diminution et la quantité de fluide reçu (mL/Kg). Également, du sang a été prélevé chez ces patients pour les analyses de laboratoire dans le cadre du projet. La contribution de chacun de ces facteurs ne peut malheureusement pas être objectivement évaluée.

Il ne faut pas non plus négliger l'impact d'un processus inflammatoire, dans le cas présent, une intervention chirurgicale, sur l'érythropoïèse. L'anémie d'inflammation est multifactorielle et inclut notamment une diminution de la survie des érythrocytes combinée à une diminution de leur production suite à la stimulation par des cytokines et la diminution de la disponibilité du fer.³ Chez des souris utilisées comme modèle d'anémie d'inflammation, l'hémoglobine a atteint un nadir après 14 jours, mais une diminution de l'érythropoïèse et une accélération de la destruction des érythrocytes étaient évidentes entre le jour 1 et 7.^{157,158} Avec ces informations, il semble que les changements observés 14-18 heures après la chirurgie soient trop rapides pour être attribuable à ce mécanisme. Toutefois, chez des patients humains aux soins intensifs ne présentant pas de saignement récent ou actif, une diminution de 4.4 +/-

7.0 g/L d'hémoglobine est observée chaque jour au cours des trois premiers jours d'hospitalisation. Après 3 jours, la concentration d'hémoglobine demeure relativement stable.¹⁵⁹ Dans le cas présent la diminution de l'hémoglobine post-chirurgie est plus marquée. Il semble donc peu probable que la diminution des paramètres érythroïdes soit déjà et uniquement attribuable à une anémie d'inflammation, une combinaison des facteurs mentionnés semble plus vraisemblable.

Une diminution post-chirurgie pour les réticulocytes est également observée. Cette diminution pourrait, comme pour les paramètres érythroïdes, être attribuable à une perte de sang ou une hémodilution bien qu'une corrélation entre le pourcentage de diminution et la quantité de fluide reçu n'a pas été démontrée. Une diminution de l'érythropoïèse pourrait également entraîner une diminution de la production de réticulocytes, bien qu'encore une fois, le délai de 14-18 heures semble un peu trop court pour que de tels changements soient observés. Normalement, lors de perte de sang, une augmentation du comptage réticulocytaire est observée, toutefois, cela nécessite quelques jours avant que la moelle osseuse réponde de façon adéquate et ne peut donc pas être adéquatement évalué dans le cas présent.

B. Indices érythrocytaires et réticulocytaires

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le CHCM, le CHCMr et le CHr avant et après la procédure. Pourtant, lors d'anémie de condition inflammatoire, il est rapporté que les chiens ayant une concentration de CRP de plus de 12 mg/L avaient un CHr médian plus bas que les chiens sans inflammation avec une autre condition et les chiens sains.¹⁶⁰ Le CHr est également le plus utilisé chez l'humain pour identifier une érythropoïèse limitée par le fer.¹⁶¹ Ces résultats ne sont donc pas en faveur d'une anémie restrictive en fer comme cause d'anémie chez nos sujets. Il est toutefois possible que le stimulus inflammatoire soit trop aigu pour entraîner des changements au niveau de ces indices. En effet, chez des chiens traités chroniquement avec de la térébenthine, une diminution du CHCM était observée seulement après 42 jours.⁹

C. Créatinine

Aucun des sujets ne présentait une azotémie avant la chirurgie. Ce paramètre a été évalué, car une diminution du taux de filtration glomérulaire peut entraîner une diminution de l'excrétion d'hepcidine et contribuer à une anémie.¹⁶² Toutefois, la densité urinaire n'a pas été évaluée et il est possible que certains chiens souffrants de maladie rénale chronique stade 1 aient été inclus par inadvertance.

4.2.2. Statut inflammatoire

Le fait qu'une augmentation significative de l'ensemble des paramètres inflammatoires a été observée permet de confirmer que la chirurgie d'ovariohystérectomie était un modèle adéquat pour induire une inflammation. Le trauma chirurgical a été démontré comme modèle inflammatoire par plusieurs autant en médecine vétérinaire²³ qu'humaine.^{163,164}

L'augmentation des leucocytes et des neutrophiles observée est secondaire à une demande tissulaire (trauma chirurgical) accrue. Bien que le délai de 14-18 heures n'est pas suffisant pour que la leucocytose soit secondaire à une hyperplasie granulocytaire au niveau de la moelle osseuse, les médiateurs inflammatoires entraînent la relâche des neutrophiles du compartiment de stockage causant cette neutrophilie périphérique.

La plupart des sujets à l'étude ne présentaient pas d'évidence d'inflammation avant la chirurgie; 83 % des chiens avaient un niveau indétectable de la CRP (0 mg/L) et 62 % avaient une concentration sous la limite de détection pour l'IL-6 (< 6.1 pg/mL). La CRP est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation et la magnitude de son augmentation suite à un trauma chirurgical varie grandement entre les études allant de 14 à 95 fois les valeurs basales.^{16,165} Pour les chiens à l'étude, une augmentation variant de 23 à plus de 100 fois a été observée pour les sujets qui présentaient des niveaux indétectables de CRP avant la procédure. Cette variation entre les sujets pourrait être expliquée par le niveau hétérogène d'expérience des étudiants chirurgiens causant un trauma tissulaire variable et une susceptibilité individuelle différente. Il est intéressant d'observer que pour les sujets présentant déjà une augmentation de la CRP en phase préopératoire, une augmentation maximale de 6 fois a été

observée en phase postopératoire. Les valeurs maximales observées pour ces sujets sont toutefois similaires à celles notées pour les autres malgré une plus faible magnitude d'augmentation.

Malgré une différence significative, les changements aux temps 2 pour l'IL-6 sont plus légers que ce qui était attendu. En effet, une faible augmentation de 5.6 % en moyenne est observée. Quelques sujets (4/29) présentent même une diminution allant jusqu'à 13.9 % après la chirurgie. Lors de cholécystectomie réalisée par laparotomie chez l'homme, l'IL-6 est rapporté augmenter par rapport aux valeurs basales (< 2 pg/mL) atteignant une concentration de près de 40 pg/mL en 12 heures et près de 50 pg/mL en 24 heures.¹⁶⁴ Considérant que les échantillons au temps 2 ont été récoltés 14 à 18 heures suite à la chirurgie, il est possible que la concentration obtenue ne représente pas les concentrations maximales chez nos sujets. Toutefois, il est également rapporté que lors de chirurgies électorives chez l'humain, l'IL-6 sérique augmente 2 à 4 heures après l'incision atteignant une concentration maximale après 6 à 12 heures.¹⁶³ Ces informations conflictuelles suggèrent que d'autres facteurs doivent être considérés pour expliquer les résultats obtenus. L'ensemble des sujets était sous anesthésie générale et ont reçu du meloxicam intra et postopératoire. Il a été démontré que le meloxicam limite les changements au niveau de l'IL-6 dans certaines situations,¹⁶⁶ il est donc possible que le celui-ci ait limité l'augmentation postopératoire de l'IL-6 chez nos patients.

Malgré l'utilisation d'un ELISA conçu spécifiquement pour quantifier l'IL-6 canine, une validation complète n'a pas été réalisée à notre laboratoire et il est possible que les concentrations obtenues ne représentent pas exactement les concentrations *in vivo*, ce qui pourrait être dû à un problème de liaison de l'anticorps avec les épitopes, affectant la sensibilité analytique. Il est difficile de déterminer les concentrations obtenues par les autres groupes de recherches avec cet ELISA en évaluant leurs publications, car les données rapportées sont parfois incomplètes,¹⁶⁷ toutes sous le seuil de détection¹⁶⁸ ou évaluées sur du liquide céphalorachidien¹⁶⁹ ou sur des cultures cellulaires.¹⁷⁰ Deux publications font toutefois exceptions, on peut y relever des concentrations de > 200 pg/mL chez des sujets sains et de > 300 pg/mL suite à l'administration d'eau de mer intratrachéale¹⁷¹ et des concentrations variant de 45 à 4656 pg/mL chez des chiens aux soins intensifs.³⁸ Les résultats de certaines de ces études sont comparables aux nôtres et suggèrent que les valeurs obtenues sont réelles.

Il est aussi important de mentionner que l'analyse des échantillons pour l'IL-6 n'a pas été réalisée au même moment que celle de la CRP. Les échantillons ont été congelés pour une durée de plus de 12 mois à -80°C , ce qui pourrait avoir eu un impact sur la validité des résultats, considérant qu'une évaluation de la stabilité de ce paramètre n'a pas été réalisée pour le sérum canin. Toutefois, chez l'humain, il n'y a pas de différence significative entre les échantillons laissés seulement 30 minutes versus 4 jours à température pièce ni suite à 4 cycles de congélation-décongélation. Ces résultats indiquent que l'IL-6 est très stable, et peut être congelé pour longtemps avant que cela ait un impact sur le pourcentage de récupération.¹⁷²

4.2.3. Statut en fer et hepcidine

Conformément à ce qui est rapporté dans la littérature,¹⁷³ une diminution du fer sérique est observée suite à un stimulus inflammatoire et cette diminution est accompagnée d'une augmentation faible, mais significative de l'hepcidine sérique chez nos patients. Cette hypoferrémie serait causée par une utilisation du fer pour la formation des nouveaux érythrocytes combinée à une diminution de l'absorption du fer et de la relâche des réserves entraînée par l'internalisation de la ferroportine suite à l'augmentation de l'hepcidine⁷⁵ combinée à une diminution de la transferrine (protéine négative de la phase aiguë). Bien que la tendance de ces résultats soit en accord avec les hypothèses de recherche, une évaluation attentive de la concentration d'hepcidine obtenue chez nos sujets révèle que ces niveaux moyens (5.5 ± 2.2 ng/mL) sont bien en deçà des valeurs rapportées dans la littérature et correspondent aux valeurs rapportées chez des humains contrôles.¹⁷⁴ *In vitro*, 300 ng/mL d'hepcidine est requis pour entraîner l'internalisation de la ferroportine après une heure d'incubation avec les cellules murines.⁷⁵ Il est estimé que l'hepcidine entraîne une hypoferrémie à une concentration sérique entre 0.1 à 1 μM ce qui correspond à 279.5 ng/mL à 2795 ng/mL.¹⁵⁶ Ces concentrations ont été obtenues suite à l'injection intrapéritonéale de 50 μg d'hepcidine-25 chez des souris. Une heure seulement suite à cette injection, ce qui correspondait à la concentration sérique maximale d'hepcidine, une diminution de 80 % de la concentration du fer sérique initiale était présente. L'hepcidine sérique était par la suite, rapidement éliminée pour atteindre une concentration sérique près de zéro après seulement 24

heures.¹⁵⁶ De plus, chez des humains recevant de l'IL-6, une augmentation rapide de l'excrétion urinaire d'hepcidine était présente dans les deux heures suivant l'injection retournant à des valeurs basales autour de 24 heures.¹⁷³ Cette élimination rapide de l'hepcidine pourrait, entre autres, expliquer les valeurs basses obtenues au temps 2, car le prélèvement a été effectué 14 - 18 heures après l'induction du stimulus inflammatoire. Il est possible que les concentrations au cours des premières heures suite à l'intervention chirurgicale fussent nettement plus élevées. Par contre, l'expression d'ARNm hépatique d'hepcidine était observée 6 heures suite à une injection de térébenthine chez des souris. Chez ces mêmes souris, l'expression hépatique d'hepcidine était 6 fois plus élevée, 16 heures suite au stimulus.¹⁷⁵ Il demeure possible que la diminution d'environ 40 % du fer sérique observée chez nos sujets soit secondaire à l'augmentation de l'hepcidine, même si les concentrations mesurées sont faibles, car chez l'humain suite à l'injection d'IL-6, une diminution de 34 % du fer était observée après 2 heures, ce qui correspondait au pic d'excrétion d'hepcidine.¹⁷³ De plus, il est rapporté que la diminution du fer sérique persiste 48 heures suite à l'injection d'hepcidine et retourne à des valeurs basales seulement après 96 heures.¹⁵⁶ Il aurait été nécessaire de faire des prélèvements intraopératoires pour confirmer ces hypothèses, ce qui n'était malheureusement pas possible, car une dilution par la fluidothérapie aurait potentiellement modifié les résultats.

Bien qu'on ne peut pas exclure que les changements hormonaux suite à la chirurgie influencent la concentration sérique d'hepcidine, comme cela est suspecté chez les femmes ménopausées,¹¹⁸ cela semble peu probable considérant que les prélèvements post-opératoires ont été réalisés seulement quelques heures après l'intervention chirurgicale.

Un autre point important à considérer est l'utilisation d'un ELISA humain qui n'a pas été validé pour l'utilisation chez l'espèce canine. Bien que les résultats obtenus lors du projet pilote avec l'ELISA (DRG Hcpidin 25 bioactive (EIA-5258)), n'étaient pas très satisfaisants, des résultats obtenus avec ce même ELISA chez des chats souffrant de maladie rénale chronique étaient en accord avec le comportement biologique connue de l'hepcidine.¹⁰ Ces résultats chez les chats combinés à ceux obtenus lors de l'immunotransfert suggèrent que cet ELISA utilisant un anticorps humain peut être utilisé chez le chien avec précautions. De plus, malgré qu'une évaluation complète n'ait pas été réalisée, une réaction croisée a été observée pour le chien, la souris, le rat et le porc par les développeurs de cet ELISA (communication

personnelle). Au moment d'évaluer les concentrations d'hepcidine pour le projet principal, une nouvelle version avec une sensibilité accrue était disponible (DRG Heparin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)), et c'est cet ELISA qui a été utilisé. Malgré une bonne homologie entre l'hepcidine humaine et canine, il est possible que l'anticorps utilisé par cet ELISA ne se lie que partiellement à la protéine canine, et que les concentrations obtenues ne représentent qu'une fraction de la concentration réelle, ce qui pourrait expliquer les faibles concentrations observées. Cette hypothèse est également supportée par les résultats du projet pilote, où les concentrations d'hepcidine recombinante obtenues avec l'ELISA humain étaient plus faibles, mais significativement corrélées.

Suite au stimulus chirurgical inflammatoire et considérant la présence d'une augmentation de l'hepcidine et d'une diminution du fer sérique, une augmentation de la ferritine était attendue. La ferritine est généralement utilisée pour évaluer les réserves corporelles en fer.⁶² Lors de déficience fonctionnelle en fer, une augmentation de la ferritine est fréquemment observée, accompagnée d'une diminution du fer sérique et du TIBC. Également, la ferritine est considérée comme une protéine positive de la phase aiguë, et une augmentation lors de l'inflammation est parfois notée. Toutefois, des résultats similaires à ceux obtenus ont été observés chez des chats avec une maladie rénale chronique.¹⁰ Également, deux jours suite à l'injection de térébenthine chez des chiens, une diminution significative de la ferritine sérique a été observée suivie d'une augmentation marquée au jour 7, suite à une 2^e dose de térébenthine.⁹ Il est donc possible que l'absence de différence entre le temps 0 et le temps 2 pour nos sujets soit secondaire à un stimulus inflammatoire trop faible.

Tout comme l'IL-6, l'analyse des échantillons pour la ferritine n'a pas été réalisée au même moment que le fer et l'hepcidine. Les échantillons ont été congelés pour une durée de plus de 12 mois à -80°C ce qui pourrait avoir eu un impact sur la validité des résultats, étant donné qu'une évaluation de la stabilité de ce paramètre n'a pas été réalisée pour le sérum canin. Toutefois, chez l'humain, il n'y a pas de différence significative entre les échantillons frais et congelés à -25 °C pour 2 ans.¹⁷⁶

4.2.4. Corrélations entre les paramètres

A. Paramètres érythroïdes

Les fortes corrélations entre l'hématocrite, l'hémoglobine et le comptage érythrocytaire observées avant et après la chirurgie sont attendues, car chacun de ces paramètres évalue un ou plusieurs aspects relatifs aux érythrocytes.

En situation physiologique, la concentration de réticulocytes se situe généralement sous la barre des $75 \times 10^9/L$ chez le chien.⁴² Cette concentration varie légèrement selon les laboratoires, allant jusqu'à $90 \times 10^9/L$ au Service de diagnostic de la faculté de médecine vétérinaire. Typiquement, une augmentation du comptage réticulocytaire est observée lors d'anémie ou d'hypoxie. Récemment l'utilisation de nutraceutiques et d'anti-inflammatoires pour le traitement de l'ostéoarthrose a été suggérée comme cause de réticulocytose en absence d'anémie.¹⁷⁷ Pour les chiens à l'étude, une corrélation positive entre l'hématocrite et les réticulocytes est observée avant la chirurgie. Ces résultats indiquent que les réticulocytes augmentent avec l'augmentation de l'hématocrite. Bien qu'une relation inverse est attendue lors d'anémie régénérative, en absence d'anémie comme au temps 0, une telle relation n'est pas nécessairement attendue. Comme le comptage réticulocytaire absolue dérive d'un pourcentage ($<1.5\%$ en situation physiologique), lorsque le comptage érythrocytaire est plus élevé, cela entraîne une augmentation de la valeur réticulocytaire absolue et donc une corrélation positive. Le comptage réticulocytaire n'excédait pas la limite de $90 \times 10^9/L$ pour aucun des sujets. Une corrélation similaire sans être significative ($p = 0.06$) est également notée au temps 2. La situation est légèrement différente à ce moment, car certains sujets présentent une anémie ($Htc < 40\%$). L'absence d'une corrélation négative n'est pas en faveur d'une anémie régénérative causée par une perte de sang, mais plus en faveur d'une diminution de l'érythropoïèse secondaire à l'inflammation. Il faut par contre demeurer prudent avec cette interprétation, car un certain temps est requis pour que la moelle osseuse réponde adéquatement à une perte de sang aiguë. De plus, il est possible que cette diminution soit secondaire à une dilution par la fluidothérapie. Toutefois, aucune corrélation entre le pourcentage de diminution et la quantité de fluide reçu (mL/Kg) n'est notée.

Aucune corrélation n'est présente entre les paramètres érythroïdes et les marqueurs de l'inflammation mis à part une corrélation négative avec le CRP au temps 0. L'importance de cette corrélation est limitée par le fait qu'au temps 0, la forte majorité des sujets ont une concentration de CRP non mesurable. Elle suggère toutefois que les sujets ayant une CRP détectable ont un hémocrite plus bas ce qui pourrait suggérer que cette diminution est secondaire à un processus inflammatoire. Malheureusement, cette relation est perdue au temps 2. L'absence de corrélation entre ces paramètres n'est pas en faveur que la diminution significative des paramètres érythroïdes suite à la chirurgie est directement secondaire à l'inflammation. Également l'absence de corrélation entre l'hémocrite et le fer et l'hepcidine n'est pas en faveur d'une anémie secondaire à une restriction en fer. Ces résultats ne sont pas inattendus, car le développement d'une telle anémie requiert plus que seulement quelques heures.

B. Marqueurs de l'inflammation

Une corrélation marquée entre les leucocytes et les neutrophiles est présente aux deux temps, ce qui est attendu considérant que chez le chien, les neutrophiles représentent la majorité des leucocytes.

Une corrélation positive entre les neutrophiles et par le fait même, les leucocytes et l'IL-6 étaient attendus, particulièrement au temps 2. En effet, l'IL-6 stimule les unités formant des colonies de granulocytes (CFU-G) et stimule la relâche de neutrophiles du compartiment de maturation vers les sinus de moelle osseuse.¹¹ Cette association est présente pour les neutrophiles au temps 2, mais pas pour les leucocytes. Comme l'IL-6 n'est pas la seule intervenante dans la cinétique des neutrophiles et des leucocytes, il est possible que l'absence de corrélation avec les leucocytes soit secondaire à l'effet d'autres cytokines, facteurs de croissance et/ou chémokines.

Une relation similaire à l'IL-6 était attendue entre les neutrophiles et leucocytes et la CRP. L'absence de corrélation entre ces paramètres suite à la chirurgie pourrait s'expliquer par une cinétique différente, c'est-à-dire que le pic maximal et la rapidité de production de chacun ne sont pas identiques et linéaires ou que plus d'un facteur affecte leur production ce

qui masque leur relation. Comme pour les paramètres érythroïdes, l'importance de la présence d'une corrélation avec les leucocytes au temps 0 est limitée par le fait que la forte majorité des sujets ont une concentration de CRP non mesurable avant la chirurgie.

Certains auteurs ont rapporté que l'IL-6 et la CRP sont fortement corrélés,²⁴ et ce notamment chez des humains suite à une chirurgie électorive.¹⁶³ La raison pour laquelle cette relation n'a pas été démontrée chez nos sujets pourrait s'expliquer par le fait que la synthèse maximale de la CRP au niveau hépatique est induite par une combinaison de cytokines, particulièrement l'IL-1 et l'IL-6 et que les concentrations maximales de ces paramètres ne sont pas atteintes en même temps.^{16,163}

C. Paramètres du fer et l'hepcidine

Lors d'anémie d'inflammation, une diminution du fer sérique est observée malgré des réserves adéquates en fer.³ Une corrélation négative entre le fer et la ferritine était attendue au temps 2, car la ferritine représente les réserves corporelles de fer.¹⁷⁸ La ferritine est élevée lors d'anémie d'inflammation, car sa synthèse et sécrétion est augmentée au niveau des macrophages lors de la séquestration du fer.¹⁷⁹ Toutefois, certains auteurs soutiennent que pour diagnostiquer une anémie de condition inflammatoire, une hypoferrémie combinée à l'absence de diminution de la ferritine sont requises. Ceci pourrait expliquer l'absence de corrélation entre ces deux paramètres chez nos sujets.³ De plus, lors d'anémie d'inflammation, il est possible qu'une déficience en fer concomitante soit observée, entraînant une augmentation insuffisante de la ferritine. Toutefois, au temps 0, en absence d'inflammation, une corrélation positive entre le fer et la ferritine était attendue. Par contre, chez l'humain, il est rapporté qu'une telle corrélation n'est présente que lorsque le TIBC est normal, ce qui n'a pas été évalué chez nos sujets.¹⁸⁰

La concentration sérique en fer est parfois utilisée comme marqueur de l'inflammation.⁵³ Chez les équins, une faible concentration sérique de fer reflèterait mieux l'inflammation aiguë que le fibrinogène.¹⁸¹ La concentration du fer ne semble toutefois pas corréler significativement avec les paramètres de l'inflammation chez nos sujets suite à l'intervention chirurgicale malgré la présence d'une tendance négative. La raison de la

présence d'une corrélation significative entre le fer et les leucocytes et les neutrophiles avant la chirurgie n'est pas évidente. Il est possible que certains de nos sujets présentaient déjà un processus inflammatoire avant la chirurgie, expliquant une concentration plus faible de fer sérique associé à une concentration plus élevée de leucocytes et neutrophiles.

Comme mentionner ci-haut, la ferritine est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, une corrélation positive avec les paramètres inflammatoires est donc attendue, comme c'est le cas avec l'IL-6 chez nos sujets.

Une corrélation positive et significative est présente au temps 0 entre le fer et l'hepcidine. Cette association peut s'expliquer par le fait qu'une augmentation des réserves de fer entraîne une augmentation de l'expression génique de l'hepcidine. Toutefois, le fer sérique n'est pas considéré comme le meilleur indicateur des réserves corporelles, il s'agit plutôt de la ferritine.¹⁷⁸ Chez des humains sains,¹¹⁸ avec une maladie rénale chronique¹¹² ou souffrant de myélome multiple,¹⁷⁴ l'hepcidine était positivement et significativement corrélée avec la ferritine. Cette association n'est pas observée chez nos sujets autant avant qu'après la chirurgie. En considérant le comportement biologique connu de l'hepcidine, une corrélation négative avec le fer était attendue en phase postopératoire.¹⁸²

Étant donné que l'hepcidine est rapidement éliminée^{156,173} et que la diminution du fer suite à son augmentation est rapide et persiste dans le temps,¹⁵⁶ l'absence de corrélation pourrait simplement refléter un manque de synchronisation lors des prélèvements. Il est possible qu'une corrélation aurait été observée entre ces paramètres si les échantillons avaient été récoltés plus tôt, lors du pic de concentration d'hepcidine sérique. Toutefois, chez des humains souffrant de myélome multiple, aucune corrélation entre le fer et l'hepcidine n'avait été observée.¹⁷⁴

La synthèse d'hepcidine est médiée, entre autres par l'inflammation, et plus spécifiquement par une augmentation de l'IL-6.¹⁸ Malgré cette relation, aucune corrélation n'a été observée entre l'hepcidine et l'ensemble des marqueurs de l'inflammation évalués. Ces résultats sont en désaccord avec ce qui est rapporté chez des humains avec une maladie rénale chronique, où l'hepcidine était positivement corrélée avec la CRP.¹¹² Toutefois, chez des patients souffrant de myélome multiple, l'hepcidine n'était pas corrélée avec l'IL-6¹⁷⁴ et les

auteurs suggèrent que plus d'une cytokine contribue à l'anémie d'inflammation et que le BMP-2 joue un rôle significatif chez ces patients.¹⁸³ L'IL-6 chez nos patients pourrait donc être donc jouer un rôle conjoint avec d'autres cytokines non évaluées pour la synthèse de l'hepcidine et expliquer l'absence de corrélation directe.

Chez nos sujets, l'hepcidine n'était également pas corrélée avec les paramètres érythroïdes, en particulier l'hématocrite. Lors d'anémie d'inflammation ou de condition chronique, l'hepcidine corrèle négativement avec l'hémoglobine et l'hématocrite.¹⁷⁴ Ces résultats ne supportent donc pas que l'augmentation de l'hepcidine soit la cause de la diminution de l'hématocrite chez nos sujets. Ceci n'est pas inattendu, considérant le peu de temps écoulé entre le temps 0 et le temps 2.

D. Pourcentages de déviations

Contrairement à ce qui était attendu, aucun paramètre ne semble influencer proportionnellement un autre paramètre. Lors d'administration intrapéritonéale d'hepcidine, une diminution dose dépendante du fer est observée chez des souris,¹⁵⁶ une telle diminution proportionnelle n'a pas été observée chez nos sujets. Il est toutefois possible qu'à partir d'une certaine concentration seuil d'hepcidine, la diminution du fer atteigne un plateau, masquant ainsi leur association. Pour l'ensemble des paramètres, il est probable que plusieurs éléments (ex. cytokines) contribuent à l'intensité et la durée de leur changement, expliquant l'absence de changement directement proportionnelle, malgré ce que la théorie suggère.

4.2.5. Limites de l'étude

Malheureusement, cette étude comporte plusieurs limites qui ont pu grandement influencer les résultats et limiter notre capacité à démontrer l'ensemble de nos hypothèses.

Tout d'abord, le choix du modèle inflammatoire s'était arrêté sur la chirurgie de stérilisation, car il s'agit d'un modèle relativement accessible, assez bien documenté dans la littérature et le plus près de la réalité quotidienne. Ce modèle est toutefois beaucoup moins

standardisé que, par exemple, l'injection de LPS à des chiens provenant d'une colonie. L'hétérogénéité des sujets au niveau des races, de l'âge et de la condition physique ainsi que l'expérience variable des étudiants chirurgiens introduisent des variables non quantifiables qui peuvent grandement affecter les résultats. Par contre, cette population est plus représentative de la population retrouvée en clinique vétérinaire. De plus, le temps des prélèvements n'était probablement pas optimal. Considérant que l'hepcidine est rapidement excrétée et retourne à des valeurs basales en moins de 24 heures,¹⁵⁶ des prélèvements séquentiels plus rapprochés du stimulus inflammatoire auraient été souhaitables. Cependant, cette limite est inhérente au modèle inflammatoire choisi; des prélèvements intraopératoires auraient probablement été faussés par la fluidothérapie.

Tel que mentionné ci-haut (sections 4.2.2 et 4.2.3), les ELISA utilisés pour cette étude n'étaient pas validés chez l'espèce utilisée. Bien que l'ELISA pour l'IL-6 (Quantikine, R&D systems, Minnesota, USA (CA6000)) soit un ELISA canin, une validation complète n'a pas été réalisée à notre laboratoire. L'ELISA utilisé pour la quantification de l'hepcidine (DRG Hecpidin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)) est un ELISA humain et sa validation n'a pas été effectuée chez des chiens.

Le faible nombre de sujets à l'étude est également à considérer, une cohorte plus grande aurait possiblement permis d'atteindre le seuil de signification pour certaines variables. Également, certains paramètres du fer tels que le pourcentage de saturation de la transferrine et le TIBC n'ont pas été évalués. Ces paramètres auraient permis une évaluation plus globale du statut en fer chez nos patients.

Afin de corriger ces points lors d'un projet futur, une cohorte de chienne ne présentant aucune inflammation, basée sur des marqueurs comme l'IL-6 et le CRP avant la chirurgie devraient être utilisés. Les chirurgies devraient être réalisées par un seul chirurgien afin d'homogénéiser le stimulus inflammatoire et la quantité de fluide devrait être limitée au minimum afin de permettre l'obtention d'échantillons sanguins intraopératoires et une mesure de la créatinine devrait être réalisée à tous les temps pour corriger les valeurs et limiter l'effet de dilution. Idéalement, des échantillons devraient être prélevés avant la chirurgie, 30 minutes après le début de la chirurgie, chaque heure pour les 6 heures suivantes et par la suite à 12 heures, 24 heures et 48 heures.

Conclusion

Bien que l'hypothèse de recherche n'ait pu être complètement démontrée, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence certains concepts et de démontrer une partie de nos objectifs initiaux.

Tout d'abord, le projet pilote a permis de démontrer qu'un anticorps anti-hepcidine peut probablement détecter l'hepcidine canine, malgré que les résultats ne soient pas confirmés. Ces informations supportaient donc l'utilisation d'un ELISA humain pour quantifier l'hepcidine chez nos sujets. Une limite importante par rapport à ce point, est l'absence d'une validation complète, et malgré l'obtention de résultats plausibles, ce point devrait faire l'objet d'un projet à part entière.

Notre projet a également permis de confirmer qu'un trauma chirurgical était un bon moyen d'induire un stimulus inflammatoire. L'évaluation de la CRP en combinaison avec l'IL-6 et les neutrophiles a également confirmé que l'utilisation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation était rapide, simple et efficace. Ces protéines sont d'ailleurs utilisées dans un nombre grandissant d'institutions et de publications en médecine vétérinaire afin d'évaluer leurs potentiels d'indicateurs d'inflammation, mais également comme outil pronostic.^{38,184,185}

Les résultats indiquent également que suite à une chirurgie de stérilisation, les chiennes en santé présentent une hypoferrémie marquée avec une augmentation significative de l'hepcidine. Malgré l'absence de corrélation négative entre ces paramètres, l'hypoferrémie observée est probablement causée, du moins en partie, par la diminution de son absorption et sa séquestration entraînée par une augmentation de l'hepcidine.

L'absence des corrélations anticipées n'indique pas nécessairement qu'il n'y pas de liens entre ces paramètres, mais que considérant le faible nombre de prélèvements, les concentrations maximales ont possiblement été manquées. Également, il est probable que plus d'un élément influence simultanément chacun des paramètres, limitant ainsi l'observation de corrélations directes.

L'ensemble des résultats ne permet pas de confirmer que l'anémie observée chez nos sujets est une anémie de conditions inflammatoire, toutefois, les résultats indiquent qu'un processus inflammatoire, lorsque soutenu, a le potentiel d'entraîner une déficience fonctionnelle en fer et donc une diminution de l'érythropoïèse. Les tendances des résultats suggèrent également que l'hepcidine joue le même rôle biologique que chez l'humain.

Les résultats de ce projet contribuent à forger les bases des connaissances au sujet de l'hepcidine en médecine vétérinaire. La compréhension complète de l'homéostasie du fer est encore à peaufiner, mais les données actuelles permettent déjà d'entrevoir un futur où l'hepcidine permettra d'améliorer les modalités de traitement et la qualité de vies des patients vétérinaires. En effet, en médecine humaine, l'hepcidine est reconnue comme étant la pierre angulaire du développement de l'anémie chez des patients souffrant de la maladie de Kawasaki^{186,187}, une condition s'apparentant à la polyarthrite juvénile du chien.¹⁸⁸ Les patients cancéreux humains¹⁴⁴ tout comme les patients vétérinaires⁴ souffrent fréquemment d'anémie soit secondaire directement à la tumeur, l'inflammation entourant la tumeur ou au traitement chimiothérapeutique. L'anémie chez ces patients a un impact important non seulement sur leur qualité de vie, mais également sur la réponse aux divers traitements.¹⁴⁸ De plus, pour certains types de tumeurs, l'hepcidine permet de déterminer la malignité de la lésion¹⁸⁹ et la probabilité de développer une anémie au cours de la maladie.¹⁹⁰ Considérant que de plus en plus d'animaux de compagnie sont considérés comme obèse,¹⁹¹ il est intéressant de mentionner que l'anémie et l'hypoferrémie observée chez des humains souffrant d'obésité sont en partie secondaires à l'augmentation de la sécrétion d'hepcidine.¹⁹² Ces conditions sont quelques-uns des nombreux exemples où la compréhension du métabolisme du fer et l'investigation de l'hepcidine sont utiles en médecine humaine et pourraient se transposer en médecine vétérinaire.

Bibliographie

1. Weiss, G. (2002). Iron and immunity: a double-edged sword. *European Journal of Clinical Investigation*, 32 (Suppl 1), 70–78.
2. Preedy, V. R. (2012). *Handbook of Disease Burdens and Quality of Life Measures*. New York, États-Unis : Springer
3. Nemeth, E. et Ganz, T. (2014). Anemia of inflammation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 28 (4), 671–81.
4. Miller, A. G., Morley, P.S., Rao, S., Avery, A.C., Lana, S.E., et Olver, S.C. (2009). Anemia Is Associated with Decreased Survival Time in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 116–122.
5. Ferrari, P., Mallon, D., Trinder, D. et Olynyk, J. K. (2010). Pentoxifylline improves haemoglobin and interleukin-6 levels in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 15 (3), 344–349.
6. Gummer, J., Trengove, R., Pascoe E.M., Badve S.V., Cass, A., Clark, P., ... Ferrari, P. (2017). Association between serum hepcidin-25 and primary resistance to erythropoiesis-stimulating agents in chronic kidney disease: a secondary analysis of the HERO trial. *Nephrology (Carlton)*, 22 (7), 548–554.
7. Fry, M. M., Kirk, C.A., Liggett, J.L., Daniel, G.B., Baek, S.J., Gouffon, J.S., ... Rekapalli, R. (2009). Changes in hepatic gene expression in dogs with experimentally induced nutritional iron deficiency. *Veterinary Clinical Pathology*, 38 (1), 13–19.
8. Fry, M. M., Liggett, J. L. et Baek, S. J. (2004). Molecular cloning and expression of canine hepcidin. *Veterinary Clinical Pathology*, 33 (4), 223–227.
9. Chikazawa, S., Nakazawa, T., Hori, Y., Hoshi, F., Kanai, K., Ito, N., ... Higuchi, S., (2013). Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 75 (11), 1419–1426.
10. Javard, R., Grimes, C. Bau-Gaudreault, L., et Dunn, M. (2017). Acute-Phase Proteins and Iron Status in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of veterinary Internal medicine*, 31(2), 457-464.

11. Stockham, S. L. et Scott, M. A. (2008) *Fundamentals of veterinary clinical pathology* (2^e éd.). Ames, États-Unis: Wiley- Blackwell
12. Barger, A. M. (2003). The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 33 (6), 1207–1222.
13. Furman, E., Leidinger, E., Hooijberg, E.H., Bauer, N., Beddies, G. et Moritz, A. (2014) A retrospective study of 1,098 blood samples with anemia from adult cats: frequency, classification, and association with serum creatinine concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28 (5), 1391–1397.
14. Novinger, M. S., Sullivan, P. S. et McDonald, T. P. (1996). Determination of the lifespan of erythrocytes from greyhounds, using an in vitro biotinylation technique. *American Journal of Veterinary Research*, 57 (5), 739–742.
15. Kaneko, J.J., Harvey, J.W., et Bruss, M.L. (2008) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, (6^e éd.). Burlington, État-Unis : Elsevier
16. Ceron, J. J., Eckersall, P. D. et Martýnez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34 (2), 85–99.
17. Moshage, H. (1997). Cytokines and the hepatic acute phase response. *The Journal of pathology*, 181 (3), 257-66.
18. Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichstenstein, A., et Ganz, T. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101 (7), 2461-63.
19. Vreugdenhil, A. C. E., Dentener, M. A., Snoek, A. M. P., Greve, J.-W. M. et Buurman, W. A. (1999). Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *Journal of immunology*, 163 (5), 2792-98.
20. Marnell, L., Mold, C. et Clos, Du, T. W. (2005). C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology*, 117 (2), 104–111.
21. Mischke, R., Waterston, M. et Eckersall, P. D. (2007). Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *The Veterinary Journal*, 174 (1), 188–192.

22. Kjelgaard-Hansen, M., Strom, H., Mikkelsen, LF., Eriksen, T., Jensen, A.L., et Luntang-Jensen, M. (2013). Canine serum C-reactive protein as a quantitative marker of the inflammatory stimulus of aseptic elective soft tissue surgery. *Veterinary Clinical Pathology*, 42 (3), 342–345.
23. Christensen, M. B., Eriksen, T. et Kjelgaard-Hansen, M. (2015). C-reactive protein: quantitative marker of surgical trauma and post-surgical complications in dogs: a systematic review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57, 71.
24. Il'yasova, D., Ivanova, A., Morrow, J. D., Cesari, M. et Pahor, M. (2008). Correlation between two markers of inflammation, serum C-reactive protein and interleukin 6, and indices of oxidative stress in patients with high risk of cardiovascular disease. *Biomarkers*, 13 (1), 41–51.
25. Capsi, D., Baltz, M.L., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R.M.,... Pepys, M.B. (1984). Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*, 53 (2), 307-13.
26. Parra, M. D., Martinez-Subiela, S., Tuomola, M. et Ceron, J. J. (2002). Evaluation of different monoclonal antibodies against human CRP in TR-FIA for determination of canine CRP. *Proceedings of the Third meeting of acute phase proteins*, Doorn, Pays-Bas, 70.
27. Martínez-Subiela, S. et Cerón, J. J. (2005). Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Canadian Veterinary Journal*, 46 (7), 625–629.
28. Scheerlinck, J.-P. Y. et Yen, H.-H. (2005). Veterinary applications of cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108 (1-2), 17–22.
29. Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology*, 37(suppl.1), S34-35.
30. Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 8 (suppl.2), S3.
31. Bode, J. G., Albrecht, U., Häussinger, D. et Heinrich, P. C. (2012). Hepatic acute phase proteins–regulation by IL-6-and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *European journal of cell biology*, 91(6-7), 496-505.

32. Viatte, L. et Vaulont, S. (2009). Heparin, the iron watcher. *Biochimie*, 91 (10), 1223–1228.
33. Lippitz, B. E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncology*, 14 (6), e218–28.
34. Kołodziejska-Sawerska, A., Rychlik, A., Depta, A., Wdowiak, M., Nowicki, M. et Kander, M. (2013). Cytokines in canine inflammatory bowel disease. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16 (1), 165–171.
35. Jassies-van der Lee, A., Rutten, V., Spiering, R., Van Kooten, P., Willemse, T. et Broere, F. (2013). The immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides on peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Journal*, 200 (1), 103-108.
36. Estrela-Lima, A., Araújo, M.S., Soares, R.P., Ribeiro, L.G., Damasceno, K.A., Costa, A.T.,...Cassali, G.D. (2013). Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. *Veterinary Comparative Oncology*, 14 (1), 88-100.
37. Childress, M. O. (2012). Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(1), 123–155.
38. Schüttler, J. et Neumann, S. Interleukin-6 as a prognostic marker in dogs in an intensive care unit. (2015), *Veterinary Clinical Pathology*, 44 (2), 223–228.
39. Badial, P. R., Oliveira-Filho, J.P., Cunha, P.H., Araújo, J.P.Jr., Peiro, J.R., Drivers, T.J., ... Borges, A.S. (2011). Influence of experimental inflammatory response on hepatic hepcidin gene expression and plasma iron concentration in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141(1-2), 157–61.
40. Tisi, M. C., Bozzoli, V., Giachelia, M., Massini, G., Ricerca, B.M., Maiolo, E.,...Hohaus, S. (2013). Anemia in diffuse large B cell non-Hodgkin Lymphoma: The role of IL-6, hepcidin and erythropoietin. *Leukemia and lymphoma*, 55(2), 270-75.
41. Day, M.J., et Schultz, R.D., (2014), *Veterinary immunology: Principles and Practice* (2^e éd.). Boca Raton, État-Unis: CRC Press.
42. Weiss, D., Wardrop, K.J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology* (5^e éd.). Ames, États-Unis: Wiley-Blackwell

43. Lee, P., Peng, H., Gelbart, T. et Wang, L. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. (2005). *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 102 (6), 1906-10.
44. Kanamori, Y., Murakami, M., Sugiyama, M., Hashimoto, O., Matsui, T., et Funaba, M. (2017). Interleukin-1 β (IL-1 β) transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein δ (C/EBP δ) expression in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (24), 10275–10287.
45. Grotto, H. Z. (2008). Anaemia of cancer: an overview of mechanisms involved in its pathogenesis. *Medical Oncology*. 25 (1), 12–21.
46. Macdougall, I. C. et Cooper, A. C. (2005) Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. *European Journal of Clinical Investigation*, 35(Suppl 3), 32–35.
47. Harvey, J.W. (2012). *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas* (2^e éd). Burlington, États-Unis: Elsevier
48. Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J.T., Levi, M.M., Press, O.W., Burns, L.J. et Caligiuri, M. (2016) *Williams hematology* (9^e éd.). États-Unis: McGraw-Hill education.
49. Foster, N. K., Martyn, J. B., Rangno, R. E., Hogg, J.C., et Pardy, R.L. (1996). Leukocytosis of exercise: role of cardiac output and catecholamines. *Journal of applied physiology*, 61(6), 2218-23.
50. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. et Campbell, T. W. (2012) *Veterinary hematology and clinical chemistry*, (2^e éd.). Ames, États-Unis: Wiley-Blackwell.
51. Edvinsson, M., Tallkvist, J., Nyström-Rosander, C. et Ilbäck, N.-G. (2017) Iron Homeostasis in Tissues Is Affected during Persistent *Chlamydia pneumoniae* Infection in Mice. *Biomedical Research International*, 2017, 3642301.
52. Jitpean, S., Holst, B.S., Höglund, O.V., Pettersson, A., Oisson, U., Strage, E., ... Hagman, R. (2014). Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology*, 82(1), 43–48.
53. Corradini, I., Armengou, L., Viu, J., Rodriguez-Pozo, M.L., Cesarini, C. et Jose-Cunilleras, E. (2014). Parallel testing of plasma iron and fibrinogen

- concentrations to detect systemic inflammation in hospitalized horses. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(4), 414–420.
54. Andrews, N. C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), 219–230.
 55. Mackenzie, B. et Garrick, M. D. (2005). Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver physiology*, 289 (6), G981-86.
 56. Finch, C. A., Ragan, H. A., Dyer, I. A. et Cook, J. D. (1978) Body iron loss in animals. *Proceedings of the Society for Experimental biology and Medicine*, 159 (3), 335–338.
 57. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. et Camaschella, C. (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142 (1), 24–38.
 58. Ganz, T. et Nemeth, E. (2011). Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annual review of medicine*, 62, 347-60.
 59. Piccinelli, P. et Samuelsson, T. (2007). Evolution of the iron-responsive element. *RNA*, 13(7), 952-66.
 60. Rouault, T. A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature chemical biology*, 2(8), 406-14.
 61. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. et Rodwell, V.W. (2000). *Harper's Biochemistry* (25^e éd.). Appleton & Lange.
 62. Orino, K. et Watanabe, K. (2008) Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *Veterinary Journal*, 178(2), 191–201.
 63. Friedrichs, K. R., Thomas, C., Plier, M., Andrews, G.A., Chavey, P.S. et Young, K.M. (2010) Evaluation of serum ferritin as a tumor marker for canine histiocytic sarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 904–911.
 64. Kazmierski, K. J., Ogilvie, G.K., Fettman, M.J., Walton, J.A., Hansen, R.A., Richardson, K.L.,... Chavey, S. (2001). Serum zinc, chromium, and iron concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), 585–588.
 65. Szöke, D. et Panteghini, M. (2012). Diagnostic value of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 413(15-16), 1184-89.

66. Mainous, A. G., Gill, J. M. et Everett, C. J. (2005). Transferrin saturation, dietary iron intake, and risk of cancer. *Annals of Family Medicine*, 3(2), 131–137.
67. Fry, M. M. et Kirk, C. A. (2006) Reticulocyte indices in a canine model of nutritional iron deficiency. *Veterinary Clinical Pathology*, 35 (2), 172–181.
68. Raskin, R. E. et Messick, J. B. (2012). Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 42(1), 23–42.
69. Thomas, C., Kirschbaum, A., Boehm, D. et Thomas, L. (2006). The diagnostic plot. *Medical Oncology*, 23(1), 23-36.
70. Koulaouzidis, A., Said, E. et Cottier, R. (2009). Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*, 18(3), 345-52.
71. Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. et Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7806-10.
72. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. et Loréal, O. (2001) A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7811–19.
73. Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P. et Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480(2-3), 147–50.
74. Ganz, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. (2011), *Blood*, 117(17), 4425-33.
75. Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D.M.,...Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704), 2090-93.
76. Jordan, J. B., Poppe, L., Haniu, M., Arvedson, T., Syed, R., Li, V.,... Sasu, B.J. (2009). Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36) 24155–67.

77. Verga Falzacappa, M. V. et Muckenthaler, M. U. (2005). Heparin: iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene*, 364, 37–44.
78. Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J.,... Camaschella, C. (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nature Genetics*, 33(1), 21–22.
79. Weizer-Stern, O., Adamsky, K., Margalit, O., Ashur-Fabian, O., Givol, O., ... Rechavi, G. (2007). Heparin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53. *British Journal of Haematology*, 138(2) 253–62.
80. Kawabata, H., Fleming, R.E., Gui, D., Moon, S.Y., Saitoh, T., O'Kelly, J.,...Koeffler, H.P. (2005). Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood*, 105 (1) 376–81.
81. Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P.,... Deng, C.X. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, 2(6), 399–409.
82. Kautz, L., Meynard, D., Monnier, A., Darnaud, V., Bouvet, R., Wang, R.H.,...Roth, M.P. (2008). Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 112(4), 1503-09.
83. Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., ...Lin, H.Y. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression, *Nature Genetics*, 38(5), 531-39.
84. Ponka, P. (2005). Iron is still hot: hepcidin keeps it ablaze. *Blood*, 105, 1376–77.
85. Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A. S. et Enns, C.A. (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metabolism*, 9(3), 217-27.
86. Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenica, I, Kaplan, J., Camaschella, C. (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism*, 8(6), 502–11.

87. Du, X, She, E., Gelbart, T., Truksa, J., Lee, P., Xia, P., ... Beutler, B. (2008). The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*, 320(5879), 1088–92.
88. Finberg, K. E., Whittlesey, R. L., Fleming, M. D. et Andrews, N.C. (2010). Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood*, 115(18), 3817-26.
89. Abboud, S. et Haile, D. J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19906–12.
90. De Domenico, I., Lo, E., Ward, D. M. et Kaplan, J. (2009). Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3800–05.
91. De Domenico, I., Nemeth, E., Nelson, J.M., Philips, J.D., Ajoka, R.S., Kay, M.S.,... Kaplan, J. (2008). The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metabolism*, 8(2), 146–56.
92. De Domenico, I., Ward, D.M., Langelier, C., Vaughn, M.B., Nemeth, E., Sundquist, W.I., ... Kaplan, J. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2569–78.
93. Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., Hrady, I., Halada, P., Kuchel, P.W., ... Vyoral, D. (2009). Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*, 113(24), 6225–36.
94. Valore, E. V. et Ganz, T. (2008). Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells*, 40(1), 132-38.
95. Steiner, D. F. (1998). The proprotein convertases. *Current opinion in chemical biology*, 2(1), 31-39.
96. Shike, H., Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Val Olst, J.C., ... Burns, J.C. (2002). Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *European journal of biochemistry*, 269(8), 2232-37.

97. Farnaud, S., Rapisarda, C., Bui, T., Drake, A., Cammack, R. et Evans, R.W. (2008). Identification of an iron-hepcidin complex. *Biochemical Journal*, 413(3), 553–557.
98. Kroot, J. J., Laarakkers, C.M., Guerts-Moespot, A.J., Grebenchtchikov, N., Pickkers, P., van Ede, A.E., ...Swinkels, D.W. (2010). Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clinical Chemistry*, 56(10),1570–79.
99. Campostrini, N., Traglia, M., Martinelli, N., Corbella, M., Cocca, M., Manna, D.,... Girelli, D. (2012). Serum levels of the hepcidin-20 isoform in a large general population: The Val Borbera study. *Journal of Proteomics*, 76, 28–35.
100. Kemna, E., Tjalsma, H., Laarakkers, C., Nemeth, E., Willems, H., et Swinkels, D. (2005). Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood*, 106(9), 3268–70.
101. Theurl, I., Aigner, E., Theurl, M., Nairz, M., Schroll, A., Sonnwebed, T., ... Weiss, G. (2009). Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*, 113(21), 5277-86.
102. Ganz, T. et Nemeth, E. (2009) Iron sequestration and anemia of inflammation. *Seminars in hematology*, 46(4), 387-93.
103. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T. (2004). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal of Clinical Investigation*, 113(9), 1271–76.
104. Nicolae, C. D., Coman, O. A., Ene, C., Nicolae, I. et Fulga, I. (2013) Heparin in neoplastic disease. *Journal of Medicine Life*, 6(3), 355–60.
105. Hohaus, S., Massini, G., Giachelia, M., Vannata, B., Bozzoli, V., Cuccaro, A., ... Leone, G. (2010) Anemia in Hodgkin's lymphoma: the role of interleukin-6 and hepcidin. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), 2538-43.
106. Pak, M., Lopez, M. A., Gabayan, V., Ganz, T. et Rivera, S. (2006) Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*, 108(12), 3730-35.
107. Gammella, E., Diaz, V., Recalcati, S., Burrati, P., Samaja, M., Dey, S., ... Cairo, G. (2015) . Erythropoietin's inhibiting impact on hepcidin expression occurs

- indirectly. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(4), R330–35.
108. Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V, Rivella, S., Nemeth, E., et Ganz, T. (2014). Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics*, 46(7), 678–84.
109. Weiss, G. et Goodnough, L. T. (2005) Anemia of Chronic Disease. *New England Journal of Med*, 352(10), 1011–23.
110. Theurl, I., Mattle, V., Seifert, M., Mariani, M., Marth, C., et Weiss, G. (2006) Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood*, 107(10) **107**, 4142-48.
111. McCown, J. L. et Specht, A. J. (2011) Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. *Journal of American Animal Hospital Association*, 47(3), 151–60.
112. Zaritsky, J., Young, B., Wang, H.J., Westerman, M., Olbina, G., Nemeth, E., ... Salusky, I.B. (2009). Hepcidin--a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(6), 1051–56.
113. Pasricha, S. R., Drakesmith, H., Black, J., Hipgrave, D. et Biggs, B.A. (2013). Control of iron deficiency anemia in low-and middle-income countries. *Blood*, 121(14), 2607-17.
114. House, J. K., Smith, B.P., Mass, J., Lane, V.M., Anderson, B.C., Graham, T.W. et Pino, M.V. (1994). Hemochromatosis in Salers cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(2), 105–11.
115. O'Toole, D., Kelly, E.J., McAllister, M.M., Layton, A.W., Norrdin, R.W., Russell, W.C., ... Walker, A.P. (2001). Hepatic failure and hemochromatosis of Salers and Salers-cross cattle. *Veterinary Pathology*, 38(4), 372–89.
116. Girelli, D., Pasino, M., Goodnough, J.B., Nemeth, E., Guido, M., Castagna, A., ... Fattovich, G. (2009). Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 51(5), 845–52.
117. Fujita, N., Sugimoto, R., Takeo, M., Urawa, N., Mifuji, R., Tanaka, H.,... Kaito, M. (2007). Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Molecular Medicine*, 13 (1-2), 97–104.

118. Galesloot, T. E., Vermeulen, S.H., Gurts-Moespot, A.J., Klaver, S.M., Kroot, J.J., van Tienoven, D., ...Swinkels, D.W. (2011). Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*, *117*(25), e218–25.
119. Ganz, T., Olbina, G., Girelli, D., Nemeth, E. et Westerman, M. (2008) Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*, *112*(10), 4292-97.
120. Grebenchtchikov, N., Guerts-Moespot, A.J., Kroot, J.J., den Heijer, M., Tjalsma, H., Swinkels, D.W., Sweep, F.G. (2009). High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *British Journal of Haematology*, *146*(3), 317–25.
121. Kroot, J. J., Hendriks, J.C., Laarakers, C.M., Klaver, S.M., Kemna, E.H., Tjalsma, H. et Swinkels, D.W. (2009). (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: implications for clinical studies. *Analytical Biochemistry*, *389*(2), 124–29.
122. Oliveira Filho, J. P., Badial, P.R., Cunha, P.H., Cruz, T.F., Araújo, J.P.Jr, Drivers, T.J., ... Borges, A.S. (2010). Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *135*(1-2), 34–42.
123. Badial, P. R., Oliveira Filho, J.P., Cunha, P.H., Cagnini, D.Q., Araújo, J.P.Jr., Winand, N.J., Borges, A.S. (2011). Identification, characterization and expression analysis of hepcidin gene in sheep. *Research Veterinary Sciences*, *90* (3), 443–450.
124. Erkilic, E. E., Erdogan, H.M., Ogun, M., Kirmizigui, A.H, Gokce, E., Kuru, M., Kukurt, A. (2016). Relationship between hepcidin and oxidant/antioxidant status in calves with suspected neonatal septicemia. *Veterinary World*, *9*(11), 1238–41.
125. Staroń, R., Van Swelm, R.R., Lipinski, P., Gajowiak, A., Lenartowicz, M., Bernarz, A.,... Starzynski, P.R. (2015). Urinary Hepcidin Levels in Iron-Deficient and Iron-Supplemented Piglets Correlate with Hepcidin Hepatic mRNA and Serum Levels and with Body Iron Status. *PLoS ONE*, *10*(8), e0136695.
126. Malyszko, J. (2009) Hepcidin assays: ironing out some details. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *4*(6), 1015–16.
127. Ganz, T. et Nemeth, E. (2006). Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *290*(2), G199–203.

128. Hunter, H. N., Fulton, D. B., Ganz, T. et Vogel, H. J. (2002). The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37597–603.
129. Castagna, A., Campostrini, N., Zaninotto, F. et Girelli, D. (2010) Hepcidin assay in serum by SELDI-TOF-MS and other approaches. *Journal of Proteomics*, 73(3), 527–36.
130. Oliveira-Filho, J. P., Badial, P.R., Cunha, P.H., Peiro, J.R., Araújo, J.P.Jr., Drivers, T.J.,... Borges, A.S. (2012) Lipopolysaccharide infusion up-regulates hepcidin mRNA expression in equine liver. *Innate Immunity*, 18(3), 438–46.
131. Kulaksiz, H., Gehrke, S.G., Janetzko, A., Rost, D., Bruckner, T., Kallinowski, B. et Stremmel, W. (2004) Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*, 53(3), 735–43.
132. Sjöstrand, K., Wess, G., Ljungvall, I., Häggström, J., Merveille, A.C., Wiberg, M.,... Höglund, K. (2014). Breed differences in natriuretic peptides in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 451–57.
133. Roe, M. A., Spinks, C., Heath, A.L., Harvey, L.J., Foxall, R., Wimperis, J., ... Fairweather-Tait, S.J. (2007). Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy, treatment, or pregnant women. *British Journal of Nutrition*, 97(2), 544-49.
134. Kato, A., Tsuji, T., Luo, J., Sakao, Y., Yasuda, H. et Hishida, A. (2008) Association of prohepcidin and hepcidin-25 with erythropoietin response and ferritin in hemodialysis patients. *American Journal of Nephrology*, 28(1), 115–21.
135. Sasu, B. J., Li, H., Rose, M. J., Arvedson, T. L., Doellgast, G. et Molineux, G. (2010). Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells, Molecules and Disease*, 45(3), 238-45.
136. Koliaraki, V., Marinou, M., Vassilakopoulos, T.P., Vavourakis, E., Tsochatzis, E., Pangalis, G.A., ... Mamalaki, A. (2009). A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS ONE*, 4(2), e4581.

137. Goyal, J., McCleskey, B. et Adamski, J. (2013). Peering into the future: Hepcidin testing. *American journal of hematology*, 88(11), 976-978.
138. Rifai, N. (2017) *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, (6^e éd.), Burlington, États-Unis: Elsevier
139. Kamai, T., Tomosugi, N., Abe, H., Arai, K. et Yoshida, K.-I. (2009). Increased serum hepcidin-25 level and increased tumor expression of hepcidin mRNA are associated with metastasis of renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 9, 270.
140. Kijima, H., Sawada, T., Tomosugi, N. et Kubota, K. (2008) Expression of hepcidin mRNA is uniformly suppressed in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 8, 167.
141. Ward, D. G., Roberts, K., Brookes, M. J., Joy, H., Martin, A., Ismail, T.,... Tselepis, C. (2008) Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis. *World journal of Gastroenterology*, 14(9), 1339-45.
142. Pinnix, Z. K., Miller, L.D., Wang, W., D'Agostino, R. Jr, Kute, T., Willingham, M.C.,... Torti, F.M. (2010). Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Science Translational Medicine*, 2(43), 43ra56.
143. Ma, W., Lu, J., Jiang, S., Cai, D., Pan, S., Jia, Y. et Zhao R. (2017) Maternal protein restriction depresses the duodenal expression of iron transporters and serum iron level in male weaning piglets. *British Journal Nutrition*, 117(7), 923–29.
144. Ludwig, H., Van Belle, S., Barrett-Lee, P., Birgegård, G., Bokemeyer, C., Gascon, P., ... Schrijvers, D. (2004). The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *European Journal of Cancer*, 40(15), 2293–306.
145. Caro, J. J., Salas, M., Ward, A. et Goss, G. (2001). Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer*, 91(12), 2114-21.
146. Clarke, H. et Pallister, C. J. (2005). The impact of anaemia on outcome in cancer. *Clinical & Laboratory Haematology*, 27(1), 1-13.

147. Mano, M., Butzberger, P., Reid, A. et Rodger, A. (2005) Current role of erythropoietin in the management of patients with haematological and solid malignancies. *Cancer Therapy*, 3, 41-56.
148. Ukarma, L., Johannes, H., Beyer, U., Zaug, M., Osterwalder, B. et Scherhag, A. (2009). Heparin as a Predictor of Response to Epoetin Therapy in Anemic Cancer Patients. *Clinical Chemistry*, 55(7), 1354–1360.
149. Adamson, J. W. (2013). Iron, erythropoietic stimulating agents, and anemia in cancer. *Critical Review in Oncogenesis*, 18(5), 471-83.
150. Abbo, A. H. et Lucroy, M. D. (2007) Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(12), 1836–42.
151. Cullis, J. (2013). Anaemia of chronic disease. *Clinical Medicine*, 13(2), 193–96.
152. Bennett, C.L., Spiegel, D.M., Macdougall, I.C., Norris, L., Qureshi, Z.P., Sartor, O., ... Goldsmith, D. (2012). A Review of Safety, Efficacy, and Utilization of Erythropoietin, Darbepoetin, and Peginesatide for Patients with Cancer or Chronic Kidney Disease: A Report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 38(8), 783–796.
153. Cowgill, L. D., James, K.M., Levy, J.K., Browne, J.K., Miller, A., Lobingier, R.T. et Egrie, J.C. (1998). Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(4), 521–528.
154. Nemeth, E. (2013). Anti-hepcidin therapy for iron-restricted anemias. *Blood*, 122(17), 2929–31.
155. Ganz, T. et Nemeth, E. (2011) The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology American Society Hematology Education Program*, 2011, 538–42.
156. Rivera, S., Nemeth, E., Gabayan, V., Lopez, M.A., Farshidi, D. et Ganz, T. (2005). Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*, 106(6), 2196–99.

157. Kim, A., Fung, E., Parikh, S.G., Valore, E.V., Gabayan, V., Nemeth, E. et Ganz, T. (2014) A mouse model of anemia of inflammation: complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin. *Blood*, *123*(8), 1129–36.
158. Gardenghi, S., Renaud, T.M., Meloni, A., Casu, C., Crielard, B.J., Bystrom, L.M., ... Rivella, S. (2014). Distinct roles for hepcidin and interleukin-6 in the recovery from anemia in mice injected with heat-killed *Brucella abortus*. *Blood*, *123*(8), 1137–45.
159. Nguyen, B. V., Bota, D. P., Mélot, C. et Vincent, J.-L. (2003). Time course of hemoglobin concentrations in nonbleeding intensive care unit patients. *Critical Care Medicine*, *31*(2), 406–10.
160. Meléndez-Lazo, A., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J. J., Planellas, M. et Pastor, J. (2015). Evaluation of the Relationship between Selected Reticulocyte Parameters and Inflammation determined by Plasma C-reactive Protein in Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, *152*(4), 304–12.
161. Wish, J. B. (2006). Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *1*(suppl. 1), S4–8.
162. Troutt, J. S., Butterfield, A. M. et Konrad, R. J. (2013). Hepcidin-25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *27*(6), 504–10.
163. Cruickshank, A. M., Fraser, W. D. et Burns, H. (1990) Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clinical Science*, *79*(2), 161-65.
164. Maruszynski, M. et Pojda, Z. (1995) Interleukin 6 (IL-6) levels in the monitoring of surgical trauma. A comparison of serum IL-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Surgical Endoscopy*, *9*(8), 882–85.
165. Serin, G. et Ulutas, P. A. (2010). Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrous bitches after ovariohysterectomy. *Veterinary Record*, *166*(1), 20–22.

166. Hassan, M. H., Ghobara, M. et Abd-Allah, G. M. (2014). Modulator effects of meloxicam against doxorubicin-induced nephrotoxicity in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(8), 337–46.
167. Cardozo, L. B., Cotes, L.C., Kahvegian, M.A., Rizzo, M.F., Otsuki, D.A., Ferrigno, C.R. et Fantoni, D.T. (2014). Evaluation of the effects of methadone and tramadol on postoperative analgesia and serum interleukin-6 in dogs undergoing orthopaedic surgery. *BMC Veterinary Research*, 10, 194.
168. Leclerc, L, Thorin, C., Flanagan, J., Biourge, V., Serisier, S., et Nguyen, P. (2017). Higher neonatal growth rate and body condition score at 7 months are predictive factors of obesity in adult female Beagle dogs. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 104.
169. Jeon, J.-H., Jung, H.W., Jang, H.M., Moon, J.H., Park, K.T., Lee, H.C.,... Jung, D.I. (2015). Canine model of ischemic stroke with permanent middle cerebral artery occlusion: clinical features, magnetic resonance imaging, histopathology, and immunohistochemistry. *Journal of Veterinary Sciences*, 16(1), 75–85.
170. Xiong, W., Candolfi, M., Liu, C., Mugammad, A.K., Yagiz, K., Puntel, M., ... Castro, M.G. (2010). Human Flt3L generates dendritic cells from canine peripheral blood precursors: implications for a dog glioma clinical trial. *PLoS ONE*, 5(6), e11074.
171. Chen, J., Chen, G., Xiao, D., Peng, W., Yu, G. Lin, Y. et Zheng, F. (2016). Continuous venovenous hemofiltration decreases mortality and ameliorates acute lung injury in canine model of severe salt water drowning. *Scandinave Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 24, 40.
172. Kenis, G., Teunissen, C., De Jongh R., Bosmans, E., Steinbusch, H. et Maes, M. (2002) Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum. *Cytokine*, 19(5), 228–35.
173. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K. et Ganz, T. (2004). IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal of Clinical Investigation*, 113(9), 1271-76.

174. Ibricevic-Balic, L., Icindic-Nakas, E., Hasic, S., Kiseljakovic, E., Sofic-Hafizovic, A. et Balic, S. (2016). Dilemma: Correlation Between Serum Level of Heparin and IL-6 in Anemic Myeloma Patients. *Medical Archive*, 70(6), 429–32.
175. Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, C., Devaux, I.,... Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 1037–44.
176. Gislefoss, R. E., Grimsrud, T. K. et Mørkrid, L. (2009) Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(5), 596–603.
177. Pattullo, K. M., Kidney, B. A., Taylor, S. M. et Jackson, M. L. (2015) Reticulocytosis in nonanemic dogs: increasing prevalence and potential etiologies. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), 26–36.
178. Beutler, E., Felitti, V., Ho, N. J. et Gelbart, T. (2002). Relationship of body iron stores to levels of serum ferritin, serum iron, unsaturated iron binding capacity and transferrin saturation in patients with iron storage disease. *Acta Haematologica*, 107(3), 145–49.
179. Cohen, L.A., Gutierrez, L., Weiss, A., Leichtmann-Bardoogo, Y., Zhang, D.L., Crooks, D.R.,... Meyron-Holtz, E.G. (2010). Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*, 116(9), 1574–84.
180. Peter, F. et Wang, S. (1981) Serum iron and total iron-binding capacity compared with serum ferritin in assessment of iron deficiency. *Clinical Chemistry*, 27(2), 276–79.
181. Borges, A. S., Divers, T. J., Stokol, T. et Mohammed, O. H. (2007) Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), 489–94.
182. Xiong, X.-Y., Chen, J., Zhu, W.Y., Zhao, T., Zhong, Q., Zhou, K., ... Yang, Q.W. (2015). Serum hepcidin concentrations correlate with serum iron level and outcome in patients with intracerebral hemorrhage. *Neurological Sciences*, 36(10), 1843–49.

183. Maes, K., Nemeth, E., Roodman, G.D., Huston, A., Esteve, F., Freytes, C., ... Ganz, T. (2010). In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood*, *116*(18), 3635–44.
184. Schrödl, W., Büchler, R., Wendler, S., Reinhold, P., Muckova, P., Reindl, J. et Rhode, H. (2016). Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clinical Applications*, *10*(11), 1077–92.
185. Dondi, F., Lukacs, R.M., Gentilini, F., Rinnovati, R., Spadari, A. et Romagnoli, N. (2015). Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Veterinary Journal*, *205*(1), 50–55.
186. Huang, Y.-H., Kuo, H.C., Huang, F.C., Yu, H.R., Hsieh, K.S., Yang, Y.L., ... Kuo, H.C. (2016). Hepcidin-Induced Iron Deficiency Is Related to Transient Anemia and Hypoferremia in Kawasaki Disease Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(4), E715.
187. Kuo, H.-C., Yang, Y.L., Chuang, J.H., Tiao, M.M., Yu, H.R., Huang, L.T., ... Huang, Y.H. (2012). Inflammation-induced hepcidin is associated with the development of anemia and coronary artery lesions in Kawasaki disease. *Journal of Clinical Immunology*, *32*(4), 746–52.
188. Felsburg, P. J., HogenEsch, H., Somberg, R. L., Snyder, P. W. et Glickman, L. T. (1992) Immunologic abnormalities in canine juvenile polyarteritis syndrome: a naturally occurring animal model of Kawasaki disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *65*(2), 110–18.
189. Orlandi, R., De Bortoli, M., Ciniselli, C.M., Vaghi, E., Caccia, D., Garrisi, V., ... Bongarzone, I. (2014). Hepcidin and ferritin blood level as noninvasive tools for predicting breast cancer. *Annals of Oncology*, *25*(2), 352–57.
190. Durigova, A., Lamy, P.J., Thezenas, S., Pouderoux, S., Montels, F., Romieu, G., ... Jacot, W. (2013). Anemia and iron biomarkers in patients with early breast cancer. Diagnostic value of hepcidin and soluble transferrin receptor quantification. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *51*(9), 1833-41.

191. German, A. J. (2006) The growing problem of obesity in dogs and cats. *Journal of Nutrition*, 136 (7 suppl), 1940S–1946S.
192. Yanoff, L. B., Menzie, C.M., Denkinger, B., Sebring, N.G., McHugh, T., Remaley, A.T. et Yanovski, J.A. (2007). Inflammation and iron deficiency in the hypoferremia of obesity. *International Journal of Obesity*, 31(9), 1412–19.

Annexe 1 : DRG Hepcidin 25 Bioactive (EIA-5258)

DRG

DRG[®] Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)



Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA: 

This kit is intended for Research Use Only.

Not intended for diagnostic purposes.

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG Hepcidin-25 (bioactive) ELISA** is an enzyme immunoassay for measurement of Hepcidin-25 in serum and plasma.

1.2 Summary and Explanation

Hepcidin is an iron homeostasis regulator peptide. The bioactive peptide Hepcidin-25 is generated predominantly in the liver by proteolytic cleavage of the C-terminal 25 amino acids of prohepcidin (1). Subsequent N-terminal processing of Hepcidin-25 results in smaller peptides of 20-24 amino acids that show greatly reduced activity and accumulate in the urine (2).

Although originally identified as antimicrobial peptide (3), Hepcidin-25 is now established as a major regulator of dietary iron absorption and cellular iron release (4). Hepcidin exerts its regulatory function by counteracting the function of ferroportin, the major cellular iron exporter in the membrane of macrophages, hepatocytes, and the basolateral site of enterocytes. Hepcidin-25 induces the internalization and degradation of ferroportin, resulting in increased intracellular iron stores, decreased dietary iron absorption, and decreased circulating iron concentrations (5).

Hepatocellular hepcidin synthesis decreases under conditions of increased demand for circulating iron like iron deficiency, hypoxia, anemia, and erythropoiesis. In contrast, hepcidin synthesis is induced by inflammation and infection (6).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Hepcidin-25 ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards an antigenic site of the Hepcidin-25 molecule. Endogenous Hepcidin-25 of a sample competes with a Hepcidin-25-biotin conjugate for binding to the coated antibody. After incubation, the unbound conjugate is washed off and a streptavidin-peroxidase enzyme complex is added to each well. After incubation, unbound enzyme complex is washed off and substrate solution is added. The blue colour development is stopped after a short incubation time, turning the colour from blue to yellow.

The intensity of colour developed is reverse proportional to the concentration of Hepcidin in the sample.

DRG**DRG[®] Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)****Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)****USA: ****3 WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com**2**



DRG[®] Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)



Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA: 

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-Hepcidin-25 antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized), 0.2 mL;
Concentrations: 0 – 2 – 6.5 – 25 – 45 – 80 ng/mL
Conversion: 1 ng/mL = 0.358 nmol/L
Contains non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, (lyophilized), 0.2 mL,
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contains non-mercury preservative.
4. **Assay Buffer**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Contains non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 7 mL, ready to use,
Hepcidin-25 conjugated to biotin;
Contains non-mercury preservative.
6. **Enzyme Complex**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Streptavidin conjugated to HRP
Contains non-mercury preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional *Assay Buffer* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Plate shaker
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi-logarithmic graph paper or software for data reduction

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com

3

DRG**DRG[®] Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)**

Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA:

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 0.2 mL deionized water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the standard several times before use.

Note: The reconstituted standards are stable for 2 days at 2 °C to 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C.

Controls

Reconstitute the lyophilized content with 0.2 mL deionized water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the controls several times before use.

Note: The reconstituted controls are stable for 2 days at 2 °C to 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.



DRG[®] Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)



Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA: 

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of **Assay Buffer** into appropriate wells.
3. Dispense **20 µL** of each **Standard, Controls** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
4. Dispense **50 µL** of **Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature under agitation (300-700 rpm).
6. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells
3 x with **400 µL diluted Wash Solution** per well (if a plate washer is used) - or.
4 x with **300 µL diluted Wash Solution** per well for manual washing.
Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Dispense **100 µL** of **Enzyme Complex** into appropriate wells.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature **without agitation**.
9. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells
3 x with **400 µL diluted Wash Solution** per well (if a plate washer is used) - or.
4 x with **300 µL diluted Wash Solution** per well for manual washing.
Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
10. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
11. Incubate for **20 minutes** at room temperature.
12. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
13. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the **Stop Solution**.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 80 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com

6

DRG**DRG® Hecpidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)**

Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA:

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or heparin plasma can be used in this assay.

EDTA- and citrate plasma results in decreased (~20%) values.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Samples containing anticoagulant may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Assay Buffer* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Assay Buffer (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Assay Buffer (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com**5**



DRG® Hecpidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)



Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA: 

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2.14
Standard 1 (2 ng/mL)	1.84
Standard 2 (6.5 ng/mL)	1.56
Standard 3 (25 ng/mL)	0.87
Standard 4 (45 ng/mL)	0.57
Standard 5 (80 ng/mL)	0.35

7 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control material results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

8 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

DRG**DRG[®] Hcpidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)**

Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)

USA: **9 LEGAL ASPECTS****9.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

9.2 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results are invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

DRG**DRG[®] Hepcidin 25 bioactive ELISA (EIA-5258)****Revised 28 April 2014 rm (Vers. 4.1)****USA: ****10 REFERENCES**

1. Scamuffa N, et al. Regulation of prohepcidin processing and activity by the subtilisin-like proprotein convertases Furin, PC5, PACE4 and PC7. *Gut*. 2008; 57(11):1573-82.
2. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin. Chem.* 2007; 53(4):620-8.
3. Krause A et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000; 480(2-3):147-50.
4. Kroot J et al. Hepcidin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. *Clin. Chem.* 2011; 57:121650–1669.
5. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 2009; 122(2-3):78-86.
6. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010; 142:24–38.
7. Swinkels DW, Jorna AT, Raymakers RA. Synopsis of the Dutch multidisciplinary guideline for the diagnosis and treatment of hereditary haemochromatosis. *Neth. J. Med.* 2007; 65(11):452-5.
8. Camaschella C, Silvestri L. Molecular mechanisms regulating hepcidin revealed by hepcidin disorders. *ScientificWorldJournal.* 2011; 11:1357-66.
9. Girelli D et al. Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2009; 51(5):845-52.
10. Gardenghi S et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by downregulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood.* 2007; 109:5027–35.
11. Uehata T et al. Serum hepcidin-25 levels and anemia in non-dialysis chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Nephrol Dial. Transplant.* 2012; 27(3):1076-83.
12. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008; 103: 381–91.

Rev. 03/10/14rm

Annexe 2 : Cusabio Dog Heparin (HAMP) (CSB-EL010124DO)



Dog hepcidin (HAMP) ELISA kit

Catalog Number. CSB-EL010124DO

For the quantitative determination of dog hepcidin (HAMP) concentrations in serum, plasma.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

If You Have Problems

Technical Service Contact information

Phone: 86-27-87582341

Fax: 86-27-87196150

Email: tech@cusabio.com

Web: www.cusabio.com

In order to obtain higher efficiency service, please ready to supply the lot number of the kit to us (found on the outside of the box).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. Antibody specific for HAMP has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any HAMP present is bound by the immobilized antibody. After removing any unbound substances, a biotin-conjugated antibody specific for HAMP is added to the wells. After washing, avidin conjugated Horseradish Peroxidase (HRP) is added to the wells. Following a wash to remove any unbound avidin-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of HAMP bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

DETECTION RANGE

3.12 ng/ml-200 ng/ml.

SENSITIVITY

The minimum detectable dose of dog HAMP is typically less than 0.78 ng/ml. The sensitivity of this assay, or Lower Limit of Detection (LLD) was defined as the lowest protein concentration that could be differentiated from zero. It was determined the mean O.D value of 20 replicates of the zero standard added by their three standard deviations.

SPECIFICITY

This assay has high sensitivity and excellent specificity for detection of dog HAMP. No significant cross-reactivity or interference between dog HAMP and analogues was observed.

Note: Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between dog HAMP and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist.

PRECISION

Intra-assay Precision (Precision within an assay): CV%<8%

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess.

Inter-assay Precision (Precision between assays): CV%<10%

Three samples of known concentration were tested in twenty assays to assess.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- **FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with Sample Diluent and repeat the assay.
- Any variation in Sample Diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- This assay is designed to eliminate interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

MATERIALS PROVIDED

Reagents	Quantity
Assay plate (12 x 8 coated Microwells)	1(96 wells)
Standard (Freeze dried)	2
Biotin-antibody (100 x concentrate)	1 x 120 µl
HRP-avidin (100 x concentrate)	1 x 120 µl
Biotin-antibody Diluent	1 x 10 ml
HRP-avidin Diluent	1 x 10 ml
Sample Diluent	1 x 20 ml
Wash Buffer (25 x concentrate)	1 x 20 ml
TMB Substrate	1 x 10 ml
Stop Solution	1 x 10 ml
Adhesive Strip (For 96 wells)	4
Instruction manual	1

STORAGE

Unopened kit	Store at 2 - 8°C. Do not use the kit beyond the expiration date.	
Opened kit	Coated assay plate	May be stored for up to 1 month at 2 - 8°C. Try to keep it in a sealed aluminum foil bag, and avoid the damp.
	Standard	May be stored for up to 1 month at 2 - 8° C. If don't make recent use, better keep it store at -20°C.
	Biotin-antibody	
	HRP-avidin	
	Biotin-antibody Diluent	May be stored for up to 1 month at 2 - 8°C.
	HRP-avidin Diluent	
	Sample Diluent	
	Wash Buffer	
	TMB Substrate	
Stop Solution		

***Provided this is within the expiration date of the kit.**

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- An incubator which can provide stable incubation conditions up to $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- Absorbent paper for blotting the microtiter plate.
- 100 mL and 500 mL graduated cylinders.
- Deionized or distilled water.
- Pipettes and pipette tips.
- Test tubes for dilution.

PRECAUTIONS

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

- **Serum** Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for two hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 15 minutes at 1000 ×g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- **Plasma** Collect plasma using EDTA, or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 ×g at 2-8°C within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

SAMPLE PREPARTION

Serum and plasma samples require a 2-fold dilution into Sample Diluent. The recommended dilution factor is for reference only. The optimal dilution factor should be determined by users according to their particular experiments.

Note:

1. CUSABIO is only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
2. Samples to be used within 5 days may be stored at 2-8°C, otherwise samples must be stored at -20°C (≤1month) or -80°C (≤2month) to avoid loss of bioactivity and contamination.
3. Grossly hemolyzed samples are not suitable for use in this assay.
4. If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of the kit is necessary.
5. Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments.
6. Tissue or cell extraction samples prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected ELISA results due to the impacts of certain chemicals.
7. Owing to the possibility of mismatching between antigen from other resource and antibody used in our kits (e.g., antibody targets conformational epitope rather than linear epitope), some native or recombinant proteins from other manufacturers may not be recognized by our products.
8. Influenced by the factors including cell viability, cell number and also sampling time, samples from cell culture supernatant may not be detected by the kit.
9. Fresh samples without long time storage are recommended for the test. Otherwise, protein degradation and denaturalization may occur in those samples and finally lead to wrong results.

REAGENT PREPARATION

Note:

- **Kindly use graduated containers to prepare the reagent. Please don't prepare the reagent directly in the Diluent vials provided in the kit.**
- Bring all reagents to room temperature (18-25°C) before use for 30min.
- Prepare fresh standard for each assay. Use within 4 hours and discard after use.
- Making serial dilution in the wells directly is not permitted.
- Please carefully reconstitute Standards according to the instruction, and avoid foaming and mix gently until the crystals have completely dissolved. To minimize imprecision caused by pipetting, use small volumes and ensure that pipettors are calibrated. It is recommended to suck more than 10µl for once pipetting.
- Distilled water is recommended to be used to make the preparation for reagents or samples. Contaminated water or container for reagent preparation will influence the detection result.

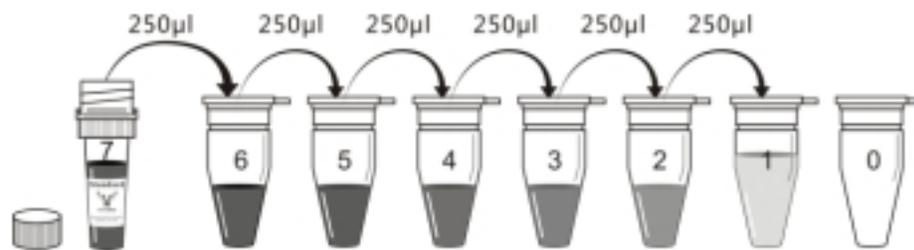
1. **Biotin-antibody (1x)** - Centrifuge the vial before opening.
Biotin-antibody requires a 100-fold dilution. A suggested 100-fold dilution is 10 µl of **Biotin-antibody** + 990 µl of **Biotin-antibody Diluent**.
2. **HRP-avidin (1x)** - Centrifuge the vial before opening.
HRP-avidin requires a 100-fold dilution. A suggested 100-fold dilution is 10 µl of **HRP-avidin** + 990 µl of **HRP-avidin Diluent**.
3. **Wash Buffer(1x)**- If crystals have formed in the concentrate, warm up to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 20 ml of Wash Buffer Concentrate (25 x) into deionized or distilled water to prepare 500 ml of Wash Buffer (1 x).

4. **Standard**

Centrifuge the standard vial at 6000-10000rpm for 30s.

Reconstitute the **Standard** with 1.0 ml of **Sample Diluent**. Do not substitute other diluents. This reconstitution produces a stock solution of 200 ng/ml. Mix the standard to ensure complete reconstitution and allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 250 μ l of **Sample Diluent** into each tube (S0-S6). Use the stock solution to produce a 2-fold dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted Standard serves as the high standard (200 ng/ml). **Sample Diluent** serves as the zero standard (0 ng/ml).



Tube	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
ng/ml	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	0

ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. It is recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Refer to the Assay Layout Sheet to determine the number of wells to be used and put any remaining wells and the desiccant back into the pouch and seal the ziploc, store unused wells at 4°C.
3. Add 100µl of standard and sample per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at 37°C. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
4. Remove the liquid of each well, **don't wash**.
5. Add 100µl of **Biotin-antibody (1x)** to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C. (**Biotin-antibody (1x)** may appear cloudy. Warm up to room temperature and mix gently until solution appears uniform.)
6. Aspirate each well and wash, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (200µl) using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser, or autowasher, and let it stand for 2 minutes, complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
7. Add 100µl of **HRP-avidin (1x)** to each well. Cover the microtiter plate with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C.
8. Repeat the aspiration/wash process for five times as in step 6.
9. Add 90µl of **TMB Substrate** to each well. Incubate for 15-30 minutes at 37°C. **Protect from light**.
10. Add 50µl of **Stop Solution** to each well, gently tap the plate to ensure thorough mixing.

11. Determine the optical density of each well within 5 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. Subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

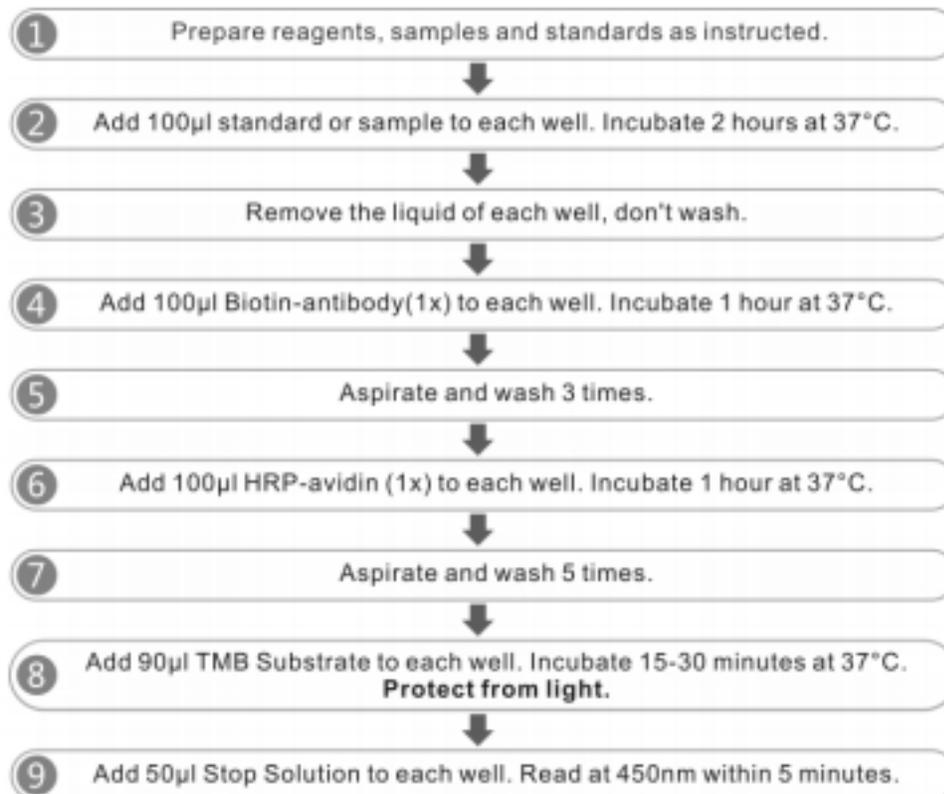
***Samples may require dilution. Please refer to Sample Preparation section.**

Note:

1. The final experimental results will be closely related to validity of the products, operation skills of the end users and the experimental environments.
2. Samples or reagents addition: Please use the freshly prepared Standard. Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall as possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
3. Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed.
4. Washing: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading. When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of wash buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.

5. Controlling of reaction time: Observe the change of color after adding TMB Substrate (e.g. observation once every 10 minutes), TMB Substrate should change from colorless or light blue to gradations of blue. If the color is too deep, add Stop Solution in advance to avoid excessively strong reaction which will result in inaccurate absorbance reading.
6. TMB Substrate is easily contaminated. TMB Substrate should remain colorless or light blue until added to the plate. Please protect it from light.
7. Stop Solution should be added to the plate in the same order as the TMB Substrate. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the TMB Substrate.

ASSAY PROCEDURE SUMMARY



***Samples may require dilution. Please refer to Sample Preparation section.**

CALCULATION OF RESULTS

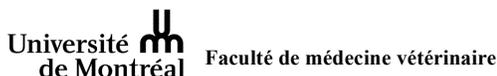
Using the professional soft "Curve Expert 1.3" to make a standard curve is recommended, which can be downloaded from our web.

Average the duplicate readings for each standard and sample and subtract the average zero standard optical density.

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the x-axis against the concentration on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the HAMP concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé



Nom du propriétaire/refuge

Nom et/ou numéro des chiennes participantes

Formulaire de consentement du client

Titre du Projet : Caractérisation du statut en fer chez des chiennes en santé avant et après une intervention chirurgicale (ovariohystérectomie).

Objectif : Caractériser le statut en fer sérique chez les chiens en situation d'inflammation et établir des liens entre le fer, l'inflammation (protéine C-réactive, Interleukine-6), les paramètres érythrocytaires et l'hepcidine.

Manipulations : Trois prélèvements (la veille de la chirurgie, lors du suivi post-opératoire et le lendemain matin après la chirurgie) de trois petits tubes de sang (2 secs et 1 EDTA) lors de la stérilisation de votre chienne.

Risques et inconvénients : J'ai été informé des risques et inconvénients associés à la participation de mon animal.

[Les risques associés aux prélèvements sanguins sont minimes, mais inclus la formation d'un hématome au site de ponction et la possibilité qu'une légère douleur lors des prélèvements et pour quelques heures le suivant pourrait être ressentie par votre animal (ce qui sera minimisé par l'analgésie que votre chienne recevra suite à sa chirurgie).]

Durée prévue de la participation volontaire et retrait de la participation : La participation de mon animal à cette étude sera de la durée de son séjour [3 jours] à la faculté, elle est volontaire, et je peux retirer mon animal en tout temps sans préjudice.

Confidentialité : Les informations collectées durant cette étude seront confidentielles et ne seront pas utilisées pour d'autres fins. Ces résultats pourraient être publiés dans une revue scientifique.

Acceptation : À la lumière des informations présentées dans ce document, j'accepte que les chiennes nommées dans l'encadré ci-haut participent à la présente étude.

Date : _____

Signatures : _____
Dre Liza Bau-G.

Nom du propriétaire/producteur

Coordonnées : *Liza Bau-G.*
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal
450 773-8521 poste: 8420 ou 450-501-5858 (cellulaire)

CÉUA-15A

Annexe 4 : Quantikine, R&D systems, Minnesota, USA (CA6000)

Quantikine® ELISA

Canine IL-6 Immunoassay

Catalog Number CA6000

For the quantitative determination of canine Interleukin 6 (IL-6) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma.

**This package insert must be read in its entirety before using this product.
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.**

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	2
TECHNICAL HINTS	2
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED	4
PRECAUTIONS.....	4
SAMPLE COLLECTION & STORAGE	4
REAGENT PREPARATION.....	5
ASSAY PROCEDURE	6
CALCULATION OF RESULTS.....	7
TYPICAL DATA.....	7
PRECISION	8
RECOVERY.....	8
LINEARITY.....	8
SENSITIVITY	9
CALIBRATION	9
SAMPLE VALUES.....	9
SPECIFICITY.....	9
REFERENCES	10

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400
E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

INTRODUCTION

Interleukin 6 (IL-6) is a pleiotropic, α -helical, 22-28 kDa phosphorylated and variably glycosylated cytokine that plays important roles in the acute phase reaction, inflammation, hematopoiesis, bone metabolism, and cancer progression (1-5). Mature canine IL-6 is 187 amino acids (aa) in length and shares 58%, 37%, 39%, and 76% aa sequence identity with human, mouse, rat, and feline IL-6, respectively. Cells known to express IL-6 include CD8⁺ T cells, fibroblasts, synoviocytes, adipocytes, osteoblasts, megakaryocytes, endothelial cells (under the influence of endothelins), sympathetic neurons, cerebral cortex neurons, adrenal medulla chromaffin cells, retinal pigment cells, mast cells, keratinocytes, Langerhans cells, fetal and adult astrocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils, colonic epithelial cells, B1 B cells and pancreatic islet beta cells (2, 6-28). IL-6 production is generally correlated with cell activation and is normally kept in control by glucocorticoids, catecholamines, and secondary sex steroids (2). Normal human circulating IL-6 is in the 1 pg/mL range, with slight elevations during the menstrual cycle, modest elevations in certain cancers, and large elevations after surgery (29-33).

IL-6 induces signaling through a cell surface heterodimeric receptor complex composed of a ligand binding subunit (IL-6 R α) and a signal transducing subunit (gp130). IL-6 binds to IL-6 R α , triggering IL-6 R α association with gp130 and gp130 dimerization (34). gp130 is also a component of the receptors for CLC, CNTF, CT-1, IL-11, IL-27, LIF, and OSM (35). Soluble forms of IL-6 R α are generated by both alternative splicing and proteolytic cleavage (5). In a mechanism known as trans-signaling, complexes of soluble IL-6 and IL-6 R α elicit responses from gp130-expressing cells that lack cell surface IL-6 R α (5). Trans-signaling enables a wider range of cell types to respond to IL-6, as the expression of gp130 is ubiquitous, while that of IL-6 R α is predominantly restricted to hepatocytes, monocytes, and resting lymphocytes (2, 5). Soluble splice forms of gp130 block trans-signaling from IL-6/IL-6 R α but not from other cytokines that use gp130 as a co-receptor (5, 36).

IL-6, along with TNF- α and IL-1, drives the acute inflammatory response. IL-6 is almost solely responsible for fever and the acute phase response in the liver, and it is important in the transition from acute inflammation to either acquired immunity or chronic inflammatory disease (1-5). When dysregulated, it contributes to chronic inflammation in conditions such as obesity, insulin resistance, inflammatory bowel disease, arthritis, and sepsis (2, 5). IL-6 modulates bone resorption and is a major effector of inflammatory joint destruction in rheumatoid arthritis through its promotion of Th17 cell development and activity (1). It contributes to atherosclerotic plaque development and destabilization as well as the development of inflammation-associated carcinogenesis (1, 2). IL-6 can also function as an anti-inflammatory molecule, as in skeletal muscle where it is secreted in response to exercise (2). In addition, it enhances hematopoietic stem cell proliferation and the differentiation of memory B cells and plasma cells (37).

The Quantikine[®] Canine IL-6 Immunoassay is a 4.5 hour solid-phase ELISA designed to measure canine IL-6 in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains *E. coli*-expressed recombinant canine IL-6 and antibodies raised against the recombinant factor. This immunoassay has been shown to accurately quantitate the recombinant factor. Results obtained using natural canine IL-6 showed linear curves that were parallel to the standard curves obtained using the Quantikine[®] kit standards. These results indicate that this kit can be used to determine relative mass values for natural canine IL-6.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A polyclonal antibody specific for canine IL-6 has been pre-coated onto a microplate. Standards, control, and samples are pipetted into the wells and any IL-6 present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for canine IL-6 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells. The enzyme reaction yields a blue product that turns yellow when the Stop Solution is added. The intensity of the color measured is in proportion to the amount of IL-6 bound in the initial step. The sample values are then read off the standard curve.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with the calibrator diluent and repeat the assay.
- Any variation in diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- This assay is designed to eliminate interference by other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine® Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- For best results, pipette reagents and samples into the center of each well.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Canine IL-6 Microplate	893125	96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a polyclonal antibody specific for canine IL-6.	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Canine IL-6 Conjugate	893126	21 mL of a polyclonal antibody specific for canine IL-6 conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Canine IL-6 Standard	893127	Recombinant canine IL-6 in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. <i>Refer to the vial label for reconstitution volume.</i>	
Canine IL-6 Control	893128	Recombinant canine IL-6 in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. The assay value of the control should be within the range specified on the label.	
Assay Diluent RD1-75	895811	11 mL of a buffered protein base with preservatives. <i>May contain a precipitate. Mix well before and during use.</i>	
Calibrator Diluent RD5T	895175	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Wash Buffer Concentrate	895003	21 mL of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	12 mL of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	12 mL of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895174	23 mL of diluted hydrochloric acid.	
Plate Sealers	N/A	4 adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- 500 mL graduated cylinder.
- Horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit) capable of maintaining a speed of 500 ± 50 rpm.
- Test tubes for dilution of standards.

PRECAUTIONS

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution.

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Color Reagent B may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Refer to the MSDS on our website prior to use.

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Allow blood samples to clot for 2 hours at room temperature before centrifuging for 20 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 20 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note: *Citrate plasma has not been validated for use in this assay.*

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

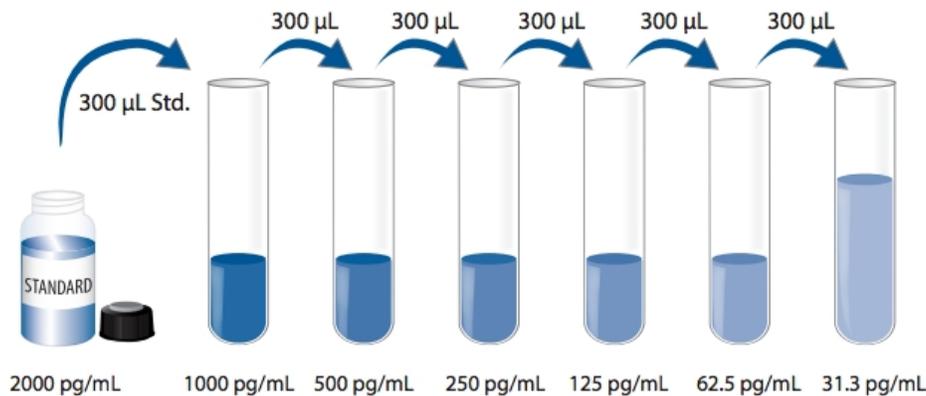
Canine IL-6 Control - Reconstitute the control with 1.0 mL of deionized or distilled water. Mix thoroughly. Assay the control undiluted.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 120 μ L of the resultant mixture is required per well.

Canine IL-6 Standard - Refer to the vial label for reconstitution volume. Reconstitute the Canine IL-6 Standard with Calibrator Diluent RD5T. Do not substitute other diluents. This reconstitution produces a stock solution of 2000 pg/mL. Allow the stock solution to sit for a minimum of 5 minutes with gentle mixing prior to making dilutions.

Pipette 300 μ L of Calibrator Diluent RD5T into each tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube gently but thoroughly before the next transfer. The undiluted Canine IL-6 Standard (2000 pg/mL) serves as the high standard. Calibrator Diluent RD5T serves as the zero standard (0 pg/mL).



ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples, standards, and control be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, standard dilutions, control, and samples as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 50 μL of Assay Diluent RD1-75 to each well.
4. Add 100 μL of standard, control, or sample per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit) set at 500 ± 50 rpm.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process four times for a total of five washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 200 μL of Canine IL-6 Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature on the shaker.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 120 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature **on the benchtop. Protect from light.**
9. Add 120 μL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

CALCULATION OF RESULTS

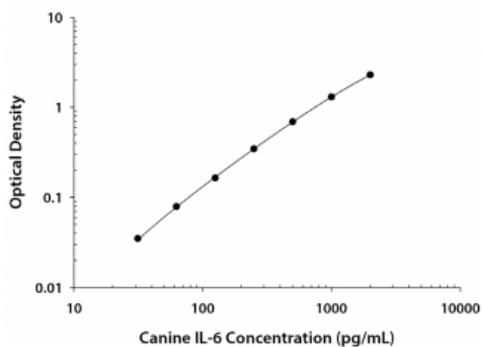
Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the canine IL-6 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.046 0.056	0.051	—
31.3	0.083 0.088	0.086	0.035
62.5	0.129 0.131	0.130	0.079
125	0.212 0.217	0.215	0.164
250	0.392 0.401	0.397	0.346
500	0.737 0.745	0.741	0.690
1000	1.331 1.373	1.352	1.301
2000	2.326 2.360	2.343	2.292

PRECISION

Intra-assay Precision (Precision within an assay)

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-assay Precision (Precision between assays)

Three samples of known concentration were tested in separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of kit components.

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	67	65	66
Mean (pg/mL)	92.6	256	685	90.7	262	666
Standard deviation	3.1	8.3	15.3	6.6	15.5	30.2
CV (%)	3.3	3.2	2.2	7.3	5.9	4.5

RECOVERY

The recovery of canine IL-6 spiked to three levels throughout the range of the assay in various matrices was evaluated

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture supernates (n=6)	94	87-103%
Serum (n=4)	93	84-102%
EDTA plasma (n=4)	97	91-103%
Heparin plasma (n=4)	92	83-100%

LINEARITY

To assess the linearity of the assay, samples containing and/or spiked with various concentrations of canine IL-6 in each matrix were diluted with calibrator diluent and assayed.

		Cell culture supernates (n=7)	Serum (n=4)	EDTA plasma (n=4)	Heparin plasma (n=4)
1:2	Average % of Expected	102	105	100	107
	Range (%)	93-106	97-110	96-105	102-112
1:4	Average % of Expected	102	109	98	108
	Range (%)	92-106	102-113	93-100	105-111
1:8	Average % of Expected	101	108	95	106
	Range (%)	86-108	101-111	90-98	104-110
1:16	Average % of Expected	96	100	90	103
	Range (%)	84-113	91-108	86-100	99-111

SENSITIVITY

Eighteen assays were evaluated and the minimum detectable dose (MDD) of canine IL-6 ranged from 1.5-11.8 pg/mL. The mean MDD was 6.1 pg/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant canine IL-6 produced at R&D Systems®.

SAMPLE VALUES

Serum/Plasma - Twelve individual canine serum, eleven EDTA plasma, and thirteen heparin plasma samples were evaluated for detectable levels of canine IL-6 in this assay. One serum sample measured 162 pg/mL, two EDTA plasma samples measured 32 and 107 pg/mL, and two heparin plasma samples measured 68 and 148 pg/mL. All other serum and plasma samples tested measured below the lowest standard, 31.3 pg/mL.

Cell Culture Supernates - Canine peripheral blood cells (1×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and stimulated with 1.0 µg/mL LPS and 1 µM histamine for 48 hours. An aliquot of the cell culture supernate was removed, assayed for canine IL-6, and measured 620 pg/mL.

SPECIFICITY

This assay recognizes natural and recombinant canine IL-6.

The factors listed below were prepared at 50 ng/mL in calibrator diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 50 ng/mL in a mid-range canine IL-6 control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Recombinant canine:

IFN-γ
IL-2
IL-4
IL-5
IL-8
IL-10
IL-12 p40
IL-18

Recombinant human:

IL-6
IL-6 R
IL-6 R/gp130

Recombinant mouse:

IL-6
IL-6 R

Other recombinants:

rat IL-6
cotton rat IL-6

Recombinant feline IL-6 cross-reacts approximately 7.9% in this assay.

Recombinant porcine IL-6 cross-reacts approximately 1.7% in this assay.

Recombinant equine IL-6 cross-reacts approximately 0.7% in this assay.

REFERENCES

1. Mansell, A. and B.J. Jenkins (2013) Cytokine Growth Factor Rev. **24**:249.
2. Schuett, H. *et al.* (2009) Thromb. Haemost. **102**:215.
3. Erta, M. *et al.* (2012) Int. J. Biol. Sci. **8**:1254.
4. Garbers, C. *et al.* (2012) Cytokine Growth Factor Rev. **23**:85.
5. Mihara, M. *et al.* (2012) Clin. Sci. (Lond.) **122**:143.
6. May, L.T. *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:8957.
7. Sad, S. *et al.* (1995) Immunity **2**:271.
8. Cichy, J. *et al.* (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. **227**:318.
9. Miyazawa, K. *et al.* (1998) Am. J. Pathol. **152**:793.
10. Fried, S.K. *et al.* (1998) J. Clin. Endocrinol. Metab. **83**:847.
11. Ishimi, Y. *et al.* (1990) J. Immunol. **145**:3297.
12. Jiang, S. *et al.* (1994) Blood **84**:4151.
13. Xin, X. *et al.* (1995) Endocrinology **136**:132.
14. Marz, P. *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:3251.
15. Ringheim, G.E. *et al.* (1995) J. Neuroimmunol. **63**:113.
16. Gadiant, R.A. *et al.* (1995) Neurosci. Lett. **194**:17.
17. Kuppner, M.C. *et al.* (1995) Immunology **84**:265.
18. Gagari, E. *et al.* (1997) Blood **89**:2654.
19. Cumberbatch, M. *et al.* (1996) Immunology **87**:513.
20. Fujisawa, H. *et al.* (1997) J. Interferon Cytokine Res. **17**:347.
21. Lee, S.C. *et al.* (1993) J. Immunol. **150**:2659.
22. Lafortune, L. *et al.* (1996) J. Neuropathol. Exp. Neurol. **55**:515.
23. Ericson, S.G. *et al.* (1998) Blood **91**:2099.
24. Melani, C. *et al.* (1993) Blood **81**:2744.
25. Lacy, P. *et al.* (1998) Blood **91**:2508.
26. Jung, H.C. *et al.* (1995) J. Clin. Invest. **95**:55.
27. Spencer, N.F.L. and R.A. Daynes (1997) Int. Immunol. **9**:745.
28. Campbell, I.L. *et al.* (1989) J. Immunol. **143**:1188.
29. D'Auria, L. *et al.* (1997) Eur. Cytokine Netw. **8**:383.
30. Yamamura, M. *et al.* (1998) Br. J. Haematol. **100**:129.
31. Angstwurm, M.W.A. *et al.* (1997) Cytokine **9**:370.
32. Mouawad, R. *et al.* (1996) Clin. Cancer Res. **2**:1405.
33. Sakamoto, K. *et al.* (1994) Cytokine **6**:181.
34. Murakami, M. *et al.* (1993) Science **260**:1808.
35. Muller-Newen, G. (2003) Sci. STKE **2003**:PE40.
36. Mitsuyama, K. *et al.* (2006) Clin. Exp. Immunol. **143**:125.
37. Cerutti, A. *et al.* (1998) J. Immunol. **160**:2145.

All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

©2017 R&D Systems®, Inc.

05.06

752547.3

10/17

10

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Annexe 5 : DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)

DRG



DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO**

This kit is intended for Research Use Only.

Not intended for diagnostic purposes.

Product Patent Protected: Pat. US 7,320,894B2; US 7,411,048 B2, US 7,649,081 B2, US 7,749,713 B2, US 7,998,691 B2, US 8,003,338 B2, US 8,017,737 B2, US 8,263,352 B2, US 8,304,197 B2, US 8,304,258 B2, EU 2 109 624, EU 603 43 464.9, EU 1,578,254, Japan 4638350, Russia 2 359 268 C2, China 200380108964.8, Hong Kong 1114419, Canada 2,506,668.
EU 07 723 512.5 (Pending)

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA is a **high sensitive** enzyme immunoassay for measurement of Hepcidin-25 in serum and plasma.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards an antigenic site of the Hepcidin-25 molecule. Endogenous Hepcidin-25 of a sample competes with a Hepcidin-25-biotin conjugate (Enzyme Conjugate) for binding to the coated antibody.

After incubation the microtiter plate is washed to stop the competition reaction. In the following incubation the bound biotin molecules are detected with streptavidin peroxidase (Enzyme Complex).

After incubation the plate is washed the second time.

After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of Hepcidin-25 in the sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for research use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.

DRG International Inc., USA

Page 1 of 11 Pages

Fax: (973) 564-7556 • E-mail: corp@drg-international.com • Web: www.drg-international.com

DRG**CE****DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)****Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)****USA: RUO**

6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

DRG



CE

DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO**

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-Hepcidin-25 antibody (monoclonal).
2. **Zero Standard**, 1 vial, 3 mL, ready to use;
0 ng/mL
Contains non-mercury preservative.
3. **Standard (Standard 1 - 5)**, 5 vials, 0.5 mL, ready to use;
Concentrations: 1 – 3 – 9 – 27 – 81 ng/mL
Conversion: 1 ng/mL = 0.358 nmol/L
Contain non-mercury preservative.
4. **Control Low & High**, 2 vials, 0.5 mL each, ready to use;
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contain non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 7 mL, ready to use,
Hepcidin-25 conjugated to biotin;
Contains non-mercury preservative.
6. **Enzyme Complex**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase
Contains non-mercury preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
See "Reagent Preparation".

Note: Additional Zero Standard for sample dilution is available upon request.

DRG



CE

DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO**

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.



DRG[®] Heparin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA:

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.

Do not use hemolytic, icteric or lipemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Samples containing anticoagulant may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 4 days at 2 to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Zero Standard* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Zero Standard* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Zero Standard* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.

DRG International Inc., USA

Page 5 of 11 Pages

Fax: (973) 564-7556 • E-mail: corp@drg-international.com • Web: www.drg-international.com

DRG



CE

DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO**

- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **20 µL** of each *Standard*, *Control* and *samples* with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **50 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells.
4 x with **400 µL diluted Wash Solution** per well (if a plate washer is used) - or
4 x with **300 µL diluted Wash Solution** per well for manual washing.
Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Dispense **100 µL of Enzyme Complex** into appropriate wells.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells.
4 x with **400 µL diluted Wash Solution** per well (if a plate washer is used) - or
4 x with **300 µL diluted Wash Solution** per well for manual washing.
Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
10. Incubate for **20 minutes** at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well.
12. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

DRG**DRG® Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)**

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO****6.3 Calculation of Results**

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 81 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2.03
Standard 1 (1 ng/mL)	1.70
Standard 2 (3 ng/mL)	1.29
Standard 3 (9 ng/mL)	0.77
Standard 4 (27 ng/mL)	0.37
Standard 5 (81 ng/mL)	0.17

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

DRG International Inc., USA**Page 7 of 11 Pages**

Fax: (973) 564-7556 • E-mail: corp@drg-international.com • Web: www.drg-international.com

DRG**DRG® Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)****Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)****USA: RUO**

Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.153 ng/mL – 81 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Analyte	% Cross-Reactivity
Prohepcidin	< 0.001
Insulin	< 0.001
Hepcidin-22	24.2
Hepcidin-20	87.7

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Hepcidin 25 in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

DRG**CE****DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)**

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO****11 LEGAL ASPECTS****11.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

1. Scamuffa N, et al. Regulation of prohepcidin processing and activity by the subtilisin-like proprotein convertases Furin, PC5, PACE4 and PC7. [Gut](#). 2008; 57(11):1573-82.
2. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. [Clin. Chem](#). 2007; 53(4):620-8.
3. Krause A et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. [FEBS Lett](#). 2000; 480(2-3):147-50.
4. Kroot J et al. Hepcidin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. [Clin. Chem](#). 2011; 57:121650-1669.
5. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. [Acta Haematol](#). 2009; 122(2-3):78-86.
6. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. [Cell](#). 2010; 142:24-38.
7. Swinkels DW, Jorna AT, Raymakers RA. [Synopsis of the Dutch multidisciplinary guideline for the diagnosis and treatment of hereditary haemochromatosis](#). [Neth. J. Med](#). 2007; 65(11):452-5.
8. [Camaschella C, Silvestri L](#). Molecular mechanisms regulating hepcidin revealed by hepcidin disorders. [Scientific World Journal](#). 2011; 11:1357-66.

DRG International Inc., USA**Page 9 of 11 Pages****Fax: (973) 564-7556 • E-mail: corp@drg-international.com • Web: www.drg-international.com**

DRG



DRG[®] Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

USA: **RUO**

9. Girelli D et al. [Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C](#). J. Hepatol. 2009; 51(5):845-52.
10. Gardenghi S et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by downregulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. Blood. 2007; 109:5027–35.
11. Uehata T et al. Serum hepcidin-25 levels and anemia in non-dialysis chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. Nephrol Dial. Transplant. 2012; 27(3):1076-83.
12. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. Eur. J. Appl. Physiol. 2008; 103: 381–91.

DRG



DRG® Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA (EIA-5782)

Revised 30 Mar. 2015 rm (Vers. 1.1)

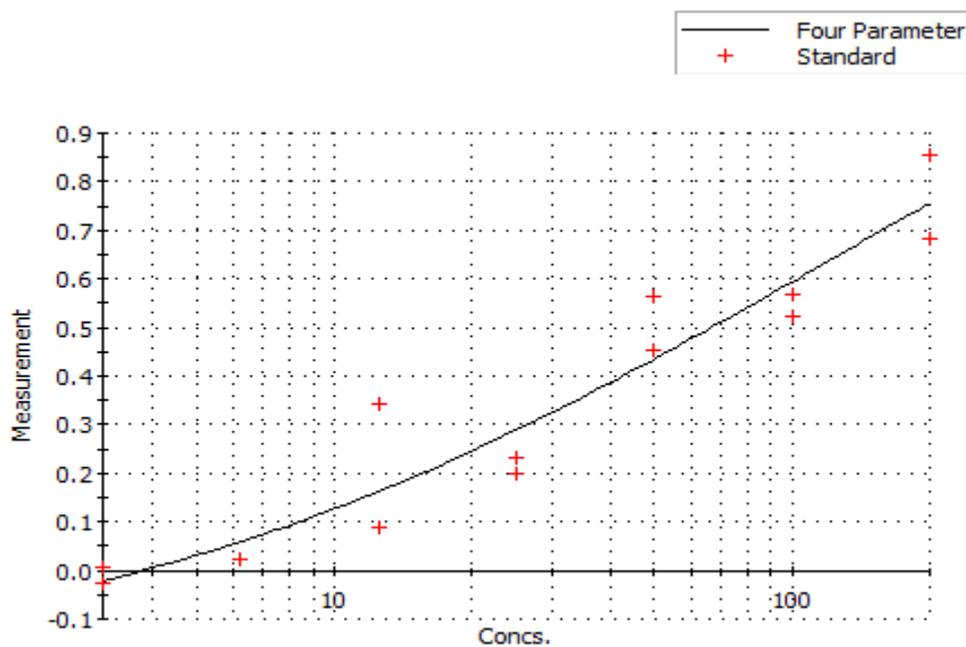
USA: **RUO**

Used Symbols

Symbol	English
	European Conformity
	Consult instructions for use
IVD	In vitro diagnostic device
RUO	For research use only
REF	Catalogue number
LOT	Lot. No. / Batch code
	Contains sufficient for ≥ 2 tests!
	Storage Temperature
	Expiration Date
	Legal Manufacturer
<i>Distributed by</i>	Distributor
<i>Content</i>	Content
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells
<i>Antiserum</i>	Antiserum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard
<i>Control</i>	Control
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH
<i>1N HCl</i>	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent

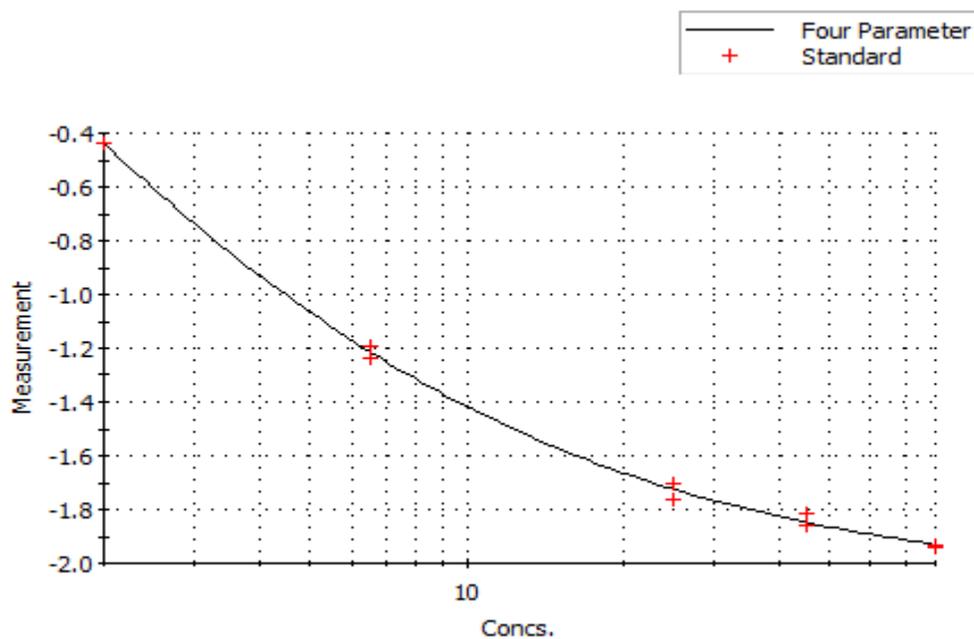
Rev. 2015/03-mh/vk_rm

Annexe 6 : Courbe standard de Cusabio Dog Hepcidin (HAMP) (CSB-EL010124DO)



Standard (ng/mL)	1	2	3	4	5	6	7
Attendues (ng/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200
Obtenues (ng/mL)	3.51	4.68	20.37	17.09	71.51	81.87	228.06

Annexe 7 : Courbe standard de DRG Hepcidin 25 Bioactive (EIA-5258)



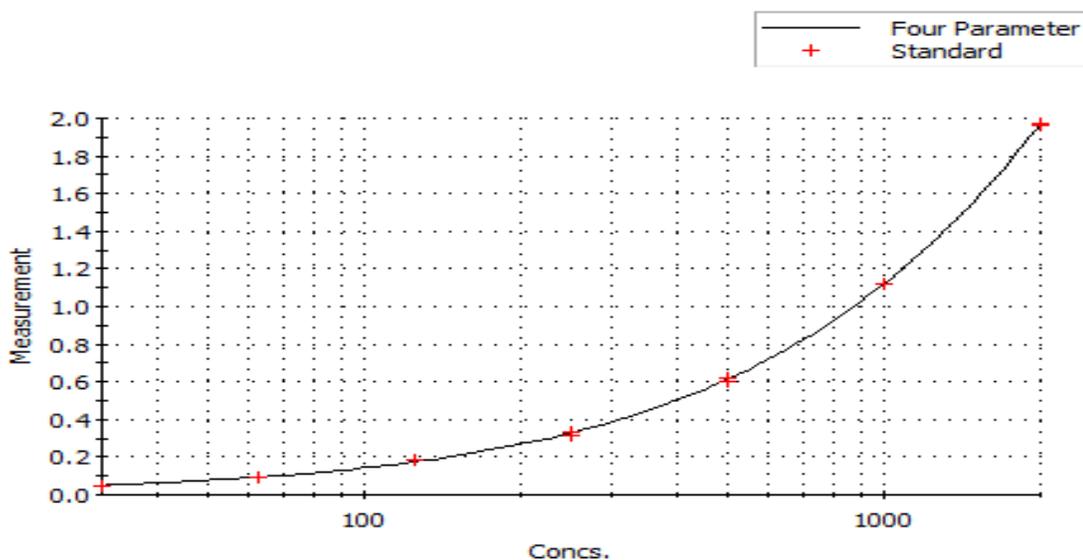
Standard (ng/mL)	1	2	3	4	5
Attendues (ng/mL)	2	6.5	25	45	80
Obtenues (ng/mL)	2	6.49	26.05	42.41	84.22

Bas : G1, G2 : 6.86 ng/mL [4.49 -10.5 ng/mL]

Haut : H1, H2 : 33.63 ng/mL [19.1-39.7 ng/mL]

Annexe 8 : Courbes standards de Quantikine, R&D systems, Minnesota, USA (CA6000)

Plaque #1



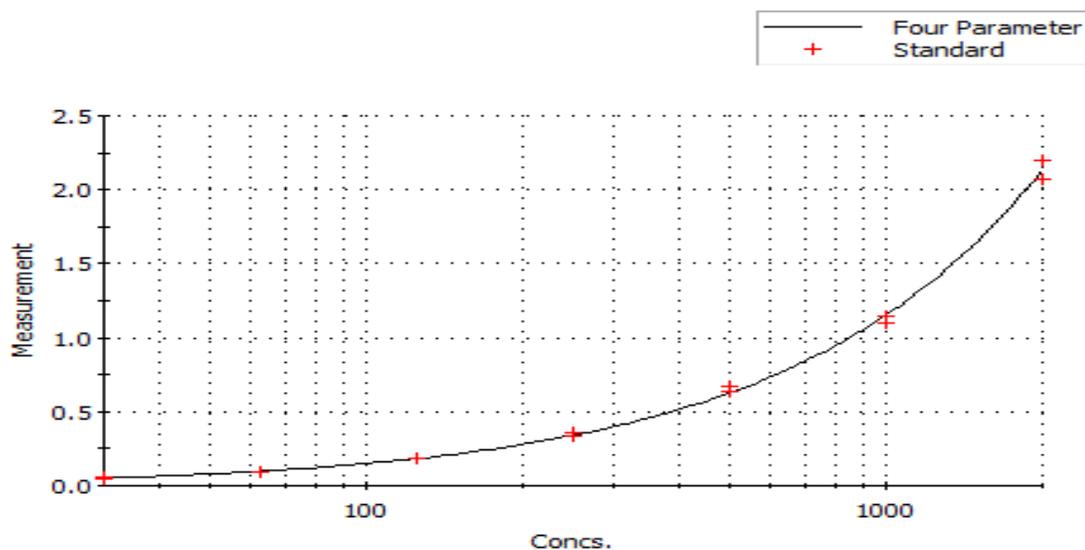
Standard (pg/mL)	1	2	3	4	5	6	7
Attendues (pg/mL)	31.3	62.5	125	250	500	1000	2000
Obtenues (pg/mL)	29	62.1	132.3	245.6	498.5	1002	1999.5

Contrôles début et fin de plaque :

A3, B3 : 255.7 pg/mL, H11, H12 : 236 pg/mL [125-500 pg/mL]*

* Cette plage de valeurs attendues est celle des derniers lots fournis par la compagnie. La plage exacte des contrôles utilisés pour cet ELISA n'est plus disponible, toutefois les valeurs obtenues étaient dans l'intervalle suggéré pour le lot utilisé.

Plaque #2



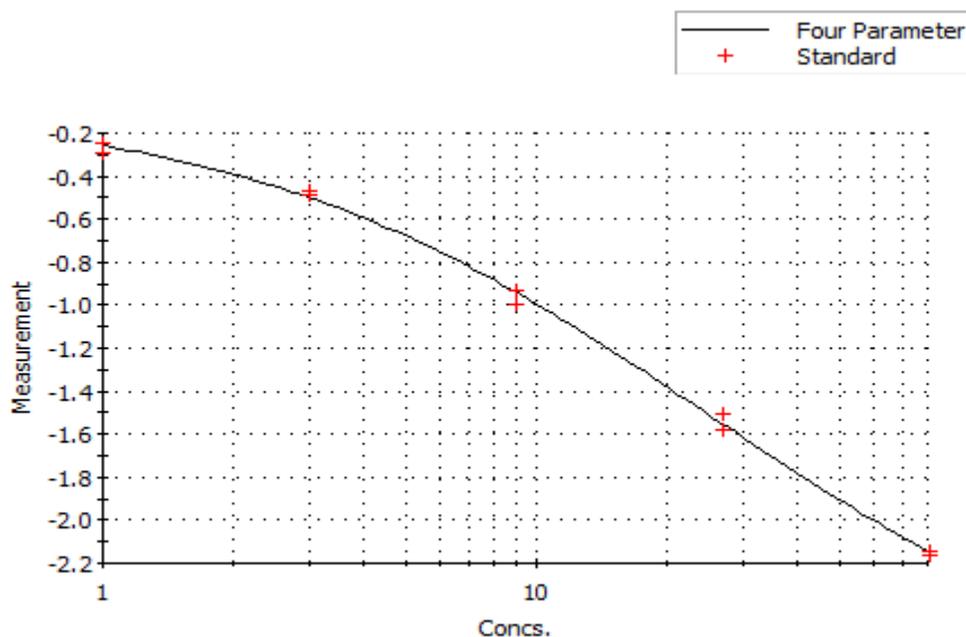
Standard (pg/mL)	1	2	3	4	5	6	7
Attendues (pg/mL)	31.3	62.5	125	250	500	1000	2000
Obtenues (pg/mL)	30.3	56	125.1	255.8	522.1	972.3	2008

Contrôles début et fin de plaque :

A3, B3 : 256.6 pg/mL, H11, H12 : 263.7 pg/mL [125-500 pg/mL]*

* Cette plage de valeurs attendues est celle des derniers lots fournis par la compagnie. La plage exacte des contrôles utilisés pour cet ELISA n'est plus disponible, toutefois les valeurs obtenues étaient dans l'intervalle suggéré pour le lot utilisé.

Annexe 9 : Courbe standard de DRG Hecpidin 25 (bioactive) HS (EIA-5782)



Standard (ng/mL)	1	2	3	4	5
Attendues (ng/mL)	1	3	9	27	81
Obtenues (ng/mL)	1.07	2.78	9.41	26.51	81.53

Contrôles début et fin de plaque :

Bas : G1, G2 : 2.29 ng/mL, G12 : 1.46 ng/mL [1.21-2.83 ng/mL]

Haut : H1, H2 : 37.5 ng/mL H12 : 33.11 ng/mL [21.5-44.6 ng/mL]