

Université de Montréal

**L'hepcidine : un possible lien entre l'inflammation chronique et le métabolisme du fer dans
les maladies rénales chroniques félines**

par Romain Javard

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître en sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Août 2015

©Romain Javard, 2015

RÉSUMÉ

Le rôle de l'inflammation dans le développement et la progression des maladies rénales chroniques (MRC) chez le chat a été peu étudié. L'hepcidin est une protéine de la phase aigue (PPA) de l'inflammation qui contribue au développement des anémies lors de MRC chez l'homme. Les objectifs de cette étude sont de comparer les concentrations en PPA, en érythropoïétine (EPO) ainsi que le statut en fer entre un groupe de chats sains et en MRC. 18 chats sains et 38 chats en MRC ont été recrutés de façon prospective. Les examens réalisés incluaient hématologie, biochimie, analyse d'urine, serum amyloid A (SAA), haptoglobine (HAP), EPO, hepcidine, fer, TIBC et ferritine.

Nous avons observé une augmentation significative des concentrations en SAA et en hepcidine ainsi qu'une diminution significative du fer et du TIBC dans le groupe MRC ($P < .05$). Une corrélation positive entre la créatinine et certaines PPA (SAA et hepcidine; $P < .05$) était présente. L'augmentation de SAA et de l'hepcidine était significativement associé avec une diminution du TIBC et de l'hématocrite dans le groupe MRC. Les 14 chats anémiques du groupe MRC (37%) avaient une concentration significativement plus basse en fer et en TIBC ($P < .05$), changements compatibles avec une déficience fonctionnelle en fer. Aucun chat n'avait un panel de fer compatible avec une carence en fer absolue.

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que les MRC chez le chat sont des conditions pro-inflammatoires, ayant un impact sur le métabolisme du fer.

Mots-clés : Serum amyloid A, hepcidine, érythropoïétine, ferritine, anémie

ABSTRACT

The role of inflammation in the development and progression of feline chronic kidney disease (CKD) is not well characterized. Hepcidin, a recently discovered acute phase protein (APP) contributes to the development of anemia in human patients with CKD. The objectives of our study were to compare plasma APP including hepcidin, iron status, and erythropoietin (EPO) concentrations between healthy and cats with naturally occurring CKD.

Eighteen healthy control cats and 38 cats with CKD were prospectively recruited. Complete physical examination along with hematology, biochemistry, serum amyloid A (SAA), haptoglobin (HAP), EPO, iron, TIBC, and ferritin were performed using routine laboratory analyzes and commercially available feline ELISA-assays. Hepcidin-25 concentration was assessed with a human ELISA kit (DRG® Diagnostics).

We found that mean SAA and hepcidin concentration were significantly higher and mean total iron and TIBC were significantly lower in the CKD group ($P < .05$). There was a significant positive correlation between creatinine and APPs (SAA and hepcidin; $P < .05$). The increase in SAA and hepcidin was also significantly associated with a decrease of TIBC and PCV in the CKD group. The 14 (37%) anemic cats with CKD had significantly and lower iron, TIBC, consistent with functional iron deficiency ($P < .05$). There were no patients with an iron profile suggestive of a true iron deficiency. There was no association with survival.

In conclusion, our data suggest that feline CKD is a pro-inflammatory state, having a significant impact on iron metabolism. With further validation, hepcidin may help better characterize these interactions.

Keywords: Serum amyloid A, hepcidin, erythropoietin, ferritin, anemia.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xi
INTRODUCTION	1
PARTIE I. Revue de la littérature	3
1. Le métabolisme du fer lors de maladie rénale chronique	4
1.1. Le métabolisme du fer en condition normale.....	4
1.2. Le métabolisme du fer lors de maladie inflammatoire chronique	6
1.3. Identification d'une anémie ferriprive vs une anémie d'inflammation chronique	8
1.4. Quand supplémenter en fer un patient anémique ?	11
1.5. Principes de supplémentation en fer	12
2. Le rôle de l'érythropoïétine	14
2.1. Inflammation & Érythropoïèse	14
2.2. Effets sur la synthèse d'EPO	14
2.3. Effets sur la sensibilité de la moelle osseuse à l'EPO.....	15
2.4. Mesure de l'EPO dans un contexte d'anémie	16
3. Le rôle des protéines de la phase aiguë de l'inflammation	17

3.1. Caractéristiques générales.....	17
3.2. Synthèse des protéines de la phase aigue chez le chat.....	18
3.3. Utilité diagnostique des PPA.....	20
3.4. Comment mesurer les PPA	22
3.5. Serum Amyloid A	23
3.6. Alpha-1-Glycoprotéine (AGP).....	24
3.7. Haptoglobine.....	26
3.8. Hepcidine.....	27
3.9. Effet de l'âge, du sexe et des maladies sur les PPA du chat	31
4. Rôle de l'Hepcidine dans les maladies rénales chroniques	35
4.1. Inflammation et maladie rénale chronique	35
4.2. Hepcidine : le lien entre l'inflammation et le métabolisme du fer.....	39
5. Ouvertures thérapeutiques et perspectives en médecine vétérinaire	42
PARTIE II. ARTICLE SCIENTIFIQUE:	44
Acute phase proteins and iron status in feline chronic kidney disease.....	44
Abstract.....	46
Introduction	47
Materials & Methods	49
Results	52
Discussion	57
Conclusion	65
Footnotes.....	66
Figures.....	67
References	77

DISCUSSION	85
CONCLUSION	94
BIBLIOGRAPHIE.....	96

Annexe 1 : Formulaire d'approbation du comité d'éthique de l'utilisation des animaux

(CÉUA)..... i

Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé..... ii

Annexe 3 : Affiche de recrutement du projet d'étude..... iii

Annexe 4 : Estimation du budget nécessaire pour l'étude iv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tests diagnostiques permettant de différencier une anémie de maladie rénale chronique d'une anémie ferriprive

Tableau 2: Valeurs de références publiées pour les principales protéines de la phase aigue du chat.

Tableau 3: Résultats comparés entre une population de chats sains et malades pour les principales protéines de la phase aigue du chat.

Tableau 4: Caractéristiques cliniques et concentrations en Serum Amyloid A et en Haptoglobine pour 88 chats regroupés en fonction de leur diagnostic.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma récapitulatif du métabolisme du fer

Figure 2: Schéma descriptif de l'absorption transmembranaire du fer via la protéine 'Divalent Metal Transporteur-1' (DMT1).

Figure 3: Schéma récapitulatif des mécanismes de production d'hepcidine et ses principaux effets sur l'organisme.

Figure 4: Concentrations en Serum Amyloid A dans différentes situations cliniques

Figure 5: Schéma récapitulatif des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le maintien et la progression des maladies rénales chroniques.

Figure 6: Différents mécanismes d'hypoxie chronique dans les maladies rénales chroniques, incluant la perte de capillaires péri-tubulaires (A,B), la stagnation péri-tubulaire de la circulation sanguine capillaire induite par la sclérose glomérulaire (C), le déséquilibre des substances vasoactives (D), la consommation d'énergie inappropriée induite par le stress oxydatif (E), l'augmentation des besoins métaboliques des cellules tubulaires (F), et la diminution des apports en oxygène à la suite de l'anémie (G).

Figure 7: Concentrations médianes en hepcidine chez des patients humains sains et malades (pédiatriques: PCKD; adultes: ACKD) ayant différent degrés de maladies rénales chroniques.

Article

Figure 1. Serum Amyloid A concentration in healthy cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

Figure 2: A. Correlation between plasma serum amyloid A (SAA) and plasma hepcidin. ($r=0,31$).
B. Correlation between plasma SAA and packed cell volume; PCV ($r=-0,49$).

Figure 3. Hepcidin concentration in healthy cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

Figure 4. Correlation between plasma creatinine and hepcidin concentrations ($r=0.46$).

Figure 5. A. Correlation between plasma hepcidin and total iron binding capacity; TIBC ($r=-0.32$). B. Correlation between plasma hepcidin and serum amyloid A ($r=0.32$). C. Correlation between plasma hepcidin and packed cell volume; PCV ($r=-0.32$).

Figure 6. Mean iron concentration in healthy cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

Figure 7. Correlation between plasma creatinine and total iron binding capacity; TIBC ($r=-0.44$)

Figure 8. Correlation between plasma iron and packed cell volume; PCV ($r=0.29$)

Figure 9. Log of creatinine, serum amyloid A and iron concentration in anemic and non-anemic cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

Figure 10. Total iron binding capacity (TIBC) in anemic and non-anemic cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

Figure 11. Log of erythropoietin (EPO) concentration in anemic and non-anemic cats and in the CKD group (mean +/- sd).

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AGP: Alpha-1-glycoprotéine

ARA: Antagoniste des récepteurs de l'aldostérone

Cp: Cerruloplasmine

CRP: Protéine C réactive

CKD: Chronic kidney disease

DMT-1: Divalent metal transporter-1

EPO: Érythropoïétine

GI: Gastro-intestinal

HAP: Haptoglobine

IECA: Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

LBP: LPS-Binding protein

MRA: Maladie rénale aigue

MRC: Maladie rénale chronique

TIBC: Total iron binding capacity

IL: Interleukine

LPS: Lipopolysaccharide

Nrf-2: Facteur nucléaire érythroïde-2

PEA: Palmitoyléthanolamide

PPA: Protéine de la phase aigue

RPA: Réaction de phase aigue

rTf: Recepteur de la transferrine

rhEPO: EPO recombinante humaine

TFG: Taux de filtration glomérulaire

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

UFC: Unité formant colonie

SAA: Sérum Amyloid A

SNC: Système nerveux central

REMERCIEMENTS

À ma directrice de recherche, Dre Marilyn Dunn et ma co-directrice Dre Carolyn Grimes. Vous m'avez permis de découvrir pleinement le monde de la recherche et j'ai adoré travailler avec vous ! Merci aussi pour votre écoute et votre bonne humeur constante lors de nos nombreuses réunions, vos conseils toujours très avisés et votre soutien infaillible ! Durant ces 3 années de travail commun, nous avons constitué une magnifique équipe de recherche et j'espère que nous pourrions continuer à travailler ensemble sur l'hepcidine et ses applications futures en médecine vétérinaire...:)

Merci aussi à ma directrice de résidence Dre Marie-Claude Bélanger qui a toujours cru en moi et m'a permis de réaliser cette maîtrise en parallèle de ma résidence. Toi et Marilyn êtes bien plus que des superviseurs pour moi !:)

Un énorme merci à Mario Guay, pour le temps passé avec moi dans le labo à faire des ELISA, tous tes conseils et l'aide absolument inestimable que tu as apporté sur ce projet. On ne serait certainement pas arrivés jusque là sans toi ! La bonne ambiance du labo va me manquer !:)

Merci à ma famille et ma conjointe pour m'avoir accompagné et épaulé durant ces longues années d'étude. Votre amour est la chose la plus importante pour moi.

INTRODUCTION

- Contexte de l'étude -

Les maladies rénales chroniques (MRC) sont des maladies communes dans la population de chats gériatriques, affectant plus de 30% des chats de plus de 15 ans.¹ La présence d'une anémie est une comorbidité fréquemment rencontrée dans cette affection, décrite chez 30 à 65% des chats en MRC.¹⁻⁴ En médecine humaine, la présence d'une anémie est un facteur pronostic négatif chez les patients en insuffisance rénale et la sévérité de l'anémie est directement reliée au degré d'avancement de la maladie rénale.^{5,6} Chez les animaux de compagnie et notamment le chat, il est bien accepté que la diminution du taux de globules rouges est responsable d'une diminution du système immunitaire, d'une progression plus rapide de la maladie rénale en raison des dommages ischémiques portés aux néphrons résiduels et affecte négativement la qualité de vie globale du patient.^{2,6-11}

L'origine de l'anémie lors de MRC est plurifactorielle, principalement expliquée par 4 mécanismes : diminution de la production d'érythropoïétine (EPO) secondairement à la perte de masse rénale fonctionnelle, diminution de la durée de vie des globules rouges à cause des toxines urémiques, pertes gastro-intestinales (GI) associées à la combinaison d'une gastrite urémique et à la diminution de l'agrégation plaquettaire; et carences ou déséquilibres nutritionnels liés à des troubles de l'appétit.^{2,3,7,12,13} Des études récentes en médecine humaine ont montré que les altérations du métabolisme du fer causées par de l'inflammation chronique et/ou des pertes GI contribuaient également au développement de l'anémie lors de MRC.^{14,15}

PARTIE I. Revue de la littérature

1. Le métabolisme du fer lors de maladie rénale chronique

1.1. Le métabolisme du fer en condition normale

Le maintien de l'équilibre du métabolisme du fer est essentiel au maintien des fonctions vitales comme la synthèse de l'hémoglobine, le transport de l'oxygène aux tissus ou encore certains réactions enzymatiques. La compréhension de la complexité du métabolisme du fer a augmenté considérablement au cours de la dernière décennie. La régulation du métabolisme du fer implique l'interaction d'un certain nombre de protéines spécifiques, ainsi que l'interaction entre l'absorption du fer et les pertes¹⁶. L'absorption intestinale du fer est modulée en fonction des réserves corporelles et selon la quantité de fer nécessaire à l'érythropoïèse.

Notre compréhension actuelle du métabolisme du fer et les caractéristiques de la carence en fer est fondée sur la biologie d'un certain nombre de protéines essentielles: la transferrine (mesurée en laboratoire qui correspond à la capacité totale de liaison du fer, TIBC), le récepteur de la transferrine (rTf), la ferritine (la protéine intracellulaire de stockage pour le fer), le transporteur duodénal de fer, la ferroportine et l'héphaestine (protéines contrôlant l'exportation du fer depuis les cellules de stockage), et enfin l'hepcidine, un puissant régulateur négatif de l'absorption intestinale du fer et de la libération depuis les macrophages (Figure 1).^{17,18}

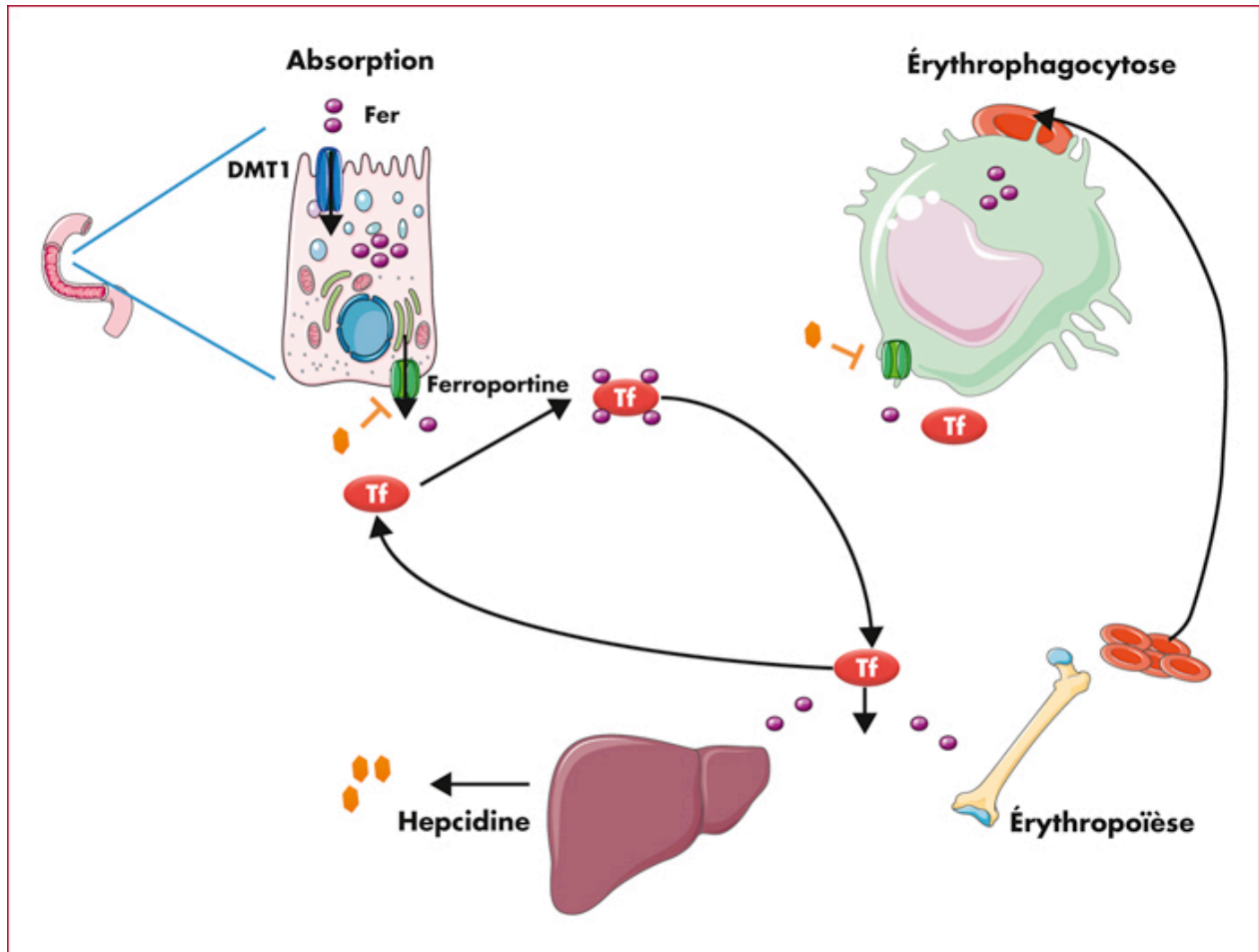


Figure 1 : Schéma récapitulatif du métabolisme du fer. Après une absorption digestive médiée par le récepteur DMT-1 (Divalent metal transporter-1) à la surface apicale, le fer est relargué en circulation grâce à la ferroportine, transporteur situé au niveau de la membrane basale dont la présence est régulée par l'hépcidine (hormone synthétisée par le foie). Il se retrouve ensuite libre en circulation ou relié à un transporteur soluble, la transferrine et est utilisé par les organes effecteurs (moelle osseuse principalement). La dégradation des globules rouges par les macrophages est une source importante de production de fer, dont la libération en circulation est également médiée par la ferroportine, sous l'influence de l'hépcidine.¹⁹

1.2. Le métabolisme du fer lors de maladie inflammatoire chronique

Une des caractéristiques des anémies de maladie chronique est le développement de troubles de l'homéostasie du fer, avec augmentation de l'absorption et de la rétention de fer à l'intérieur des cellules du système de réticulo-endothélial, limitant ainsi la disponibilité du fer pour les cellules progénitrices érythroïdes.

Chez les souris qui sont injectés avec les cytokines pro-inflammatoire IL-1 et TNF- α , on observe le développement à la fois d'une anémie et d'une hypoferrémie.²⁰ Cette combinaison est liée à la synthèse de cytokines induisant la synthèse de ferritine par les macrophages et les hépatocytes, contribuant ainsi à la séquestration du fer. Lors d'inflammation chronique, l'acquisition du fer par les macrophages est surtout réalisée par érythrophagocytose et l'importation transmembranaire du fer ferreux se fait par la protéine DMT1 (Figure 2).^{19,21}

En médecine humaine, il a été démontré que l'interféron- γ , le LPS (lipopolysaccharide), et le TNF- α stimulent l'expression de la protéine DMT1, permettant une absorption accrue de fer par les macrophages.²² Ces stimuli pro-inflammatoires induisent également la rétention de fer dans les macrophages en régulant l'expression de la ferroportine, bloquant ainsi la libération du fer à partir de ces cellules.²² L'hepcidine est le chaînon manquant entre l'inflammation, le métabolisme du fer et les anémies associées. Son mécanisme d'action est décrit plus loin dans ce manuscrit mais depuis sa découverte, il est bien accepté que cette protéine constitue la principale hormone de régulation du fer et son mécanisme d'action est centré sur la régulation de l'expression membranaire de la ferroportine.

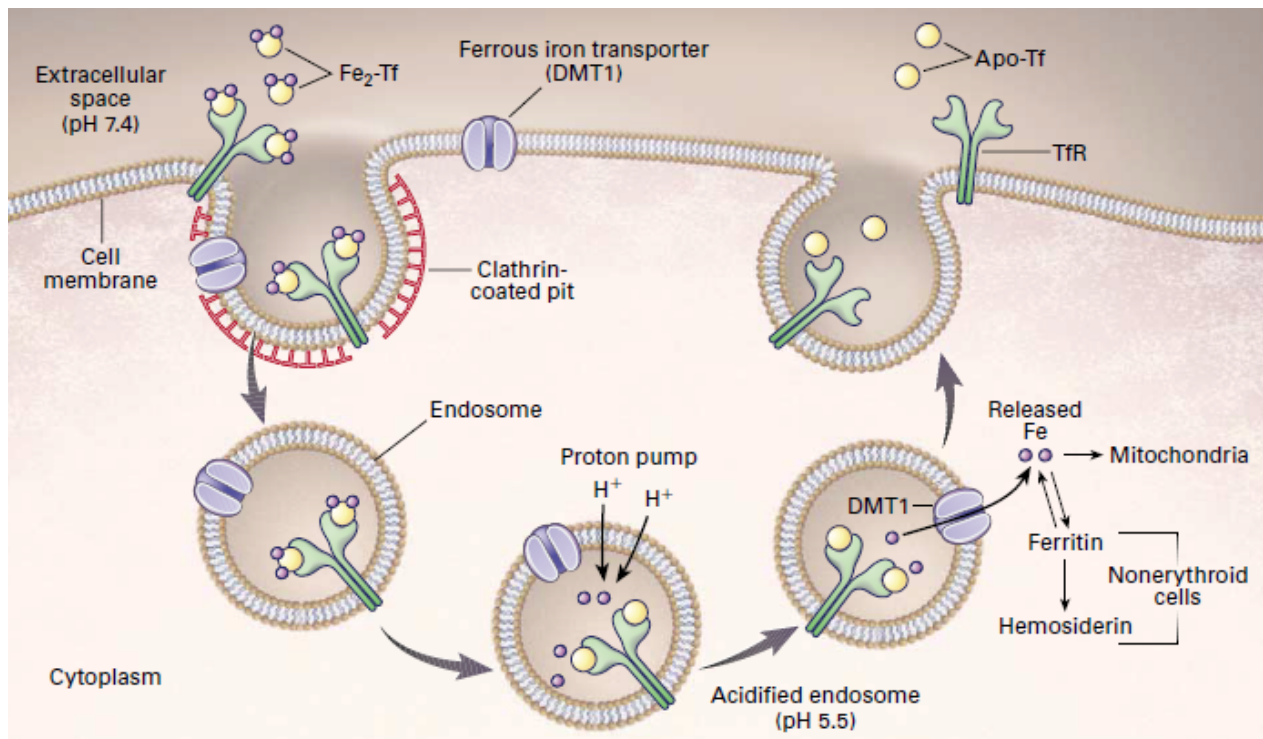


Figure 2 : Schéma descriptif de l'absorption transmembranaire du fer via la protéine 'Divalent Metal Transporteur-1' (DMT1). Le fer relié à la transferrine se lie au récepteur de la transferrine, ce qui active la formation d'un endosome contenant la protéine transmembranaire DMT-1. L'entrée d'ions H⁺ acidifie le contenu de l'endosome ce qui entraîne un changement de la conformation tridimensionnelle du récepteur et un détachement du fer, qui se retrouve dans le cytoplasme grâce au passage à travers le transporteur DMT-1.¹⁹

1.3. Identification d'une anémie ferriprive vs une anémie d'inflammation chronique

Une anémie de maladie chronique est une anémie qui se caractérise classiquement par les caractéristiques suivantes : normochrome, normocytaire et la plupart du temps légère à modérée (valeurs de référence du chat [0,28-0,47 L/L]). On observe également une numération en réticulocytes basse, ce qui indique une production de globules rouges diminuée. Le diagnostic définitif peut être confondu par la coexistence de pertes de sang. L'évaluation de ce type d'anémie devrait également inclure une détermination du statut en fer de l'organisme afin d'exclure une anémie ferriprive, habituellement hypochrome microcytaire.²³

La différence entre une anémie d'inflammation chronique et ferriprive est parfois difficile à mettre en évidence. À la fois dans les anémies de maladies chroniques et dans les anémie ferriprives, la concentration sérique totale en fer et la saturation de la transferrine sont réduite, ce qui reflète une carence en fer absolue pour l'anémie ferriprive et une hypoferrémie en raison d'une séquestration du fer par le système réticulo-endothélial lors l'anémie de maladie chronique.

La physiopathologie des anémies ferriprives implique une carence en fer absolue, alors que lors les anémie d'inflammation chronique sont généralement multifactorielles. La recherche d'une cause sous-jacente de la carence en fer devrait inclure une recherche de perte de sang chronique, souvent associé à des saignements gastro-intestinaux occultes, une maladie intestinale inflammatoire, une malnutrition, un cancer gastro-intestinal, ou enfin des infections parasitaires digestives.

La ferritine est utilisée comme marqueur des capacités de stockage du fer. Chez les patients souffrant d'anémie d'inflammation chronique, les taux de ferritine sont normaux ou augmentés (tableau 1), ce qui reflète l'augmentation du stockage et de la conservation du fer dans le système réticulo-endothélial. À l'inverse, lors de carence absolue en fer, la concentration en ferritine est généralement diminuée.

Variable	Anemia of Chronic Disease	Iron-Deficiency Anemia	Both Conditions†
Iron	Reduced	Reduced	Reduced
Transferrin	Reduced to normal	Increased	Reduced
Transferrin saturation	Reduced	Reduced	Reduced
Ferritin	Normal to increased	Reduced	Reduced to normal
Soluble transferrin receptor	Normal	Increased	Normal to increased
Ratio of soluble transferrin receptor to log ferritin	Low (<1)	High (>2)	High (>2)
Cytokine levels	Increased	Normal	Increased

* Relative changes are given in relation to the respective normal values.
† Patients with both conditions include those with anemia of chronic disease and true iron deficiency.

Tableau 1: Tests diagnostiques permettant de différencier une anémie de maladie rénale chronique d'une anémie ferriprive.

Le récepteur de la transferrine soluble est un fragment tronqué du récepteur de la membrane qui est augmenté lors de carence en fer, lorsque la biodisponibilité du fer pour l'érythropoïèse est faible.²⁴ À l'inverse, les niveaux de récepteurs solubles de la transferrine lors d'anémie de maladie chronique ne sont pas significativement différents de la normale, parce que l'expression du récepteur de la transferrine est négativement affectée par cytokines inflammatoires. Une détermination des niveaux de récepteurs solubles de la transferrine au

moyen de tests disponibles dans le commerce peut être utile pour la différenciation entre les patients atteints d'anémie de maladie chronique (avec un niveau normal ou élevé en ferritine et un niveau faible en récepteurs solubles de la transferrine) et les patients atteints d'anémie de maladie chronique ayant également une carence en fer (avec un taux de ferritine bas et des niveaux élevés de récepteurs solubles de la transferrine).²⁴

Les tests permettant la mesure des récepteurs de la transferrine soluble sont peu disponibles en médecine vétérinaire. Ainsi, puisque la concentration en fer est diminuée dans les deux situations, la différenciation entre les anémies d'inflammation chronique et les anémies ferriprives est souvent basée sur la mesure de la ferritine et du TIBC. Le TIBC (Total Iron Binding Capacity) correspond à la capacité de fixation du fer en circulation. C'est un test de laboratoire qui mesure la capacité du sang à lier le fer avec la transferrine. En médecine humaine, les principales causes de diminution du TIBC sont les maladies inflammatoires et la diminution des protéines plasmatiques.

L'identification des individus atteints d'anémie de maladie chronique ayant également une carence en fer est donc parfois difficile. Toutefois, les patients souffrant d'anémie de maladie chronique avec une anémie ferriprive concomitante ont plus fréquemment des anémies microcytaires, et leur anémie a tendance à être plus sévère. La détermination du pourcentage de globules rouges hypochromes ou la teneur en hémoglobine des réticulocytes peut également être utile dans la détection d'une érythropoïèse réduite par une quantité restreinte de fer chez des patients souffrant d'anémie de maladie inflammatoire chronique.^{19,23}

1.4. Quand supplémenter en fer un patient anémique ?

La justification du traitement des anémies de maladie chronique ou ferriprive est généralement basée sur deux principes. Tout d'abord, l'anémie peut être généralement nuisible en elle-même, car elle induit une augmentation compensatrice du débit cardiaque afin de maintenir une délivrance systémique de l'oxygène adéquate; en second lieu, l'anémie est associée à un pronostic plus mauvais dans une variété de conditions.

En médecine humaine, l'anémie est associée à un relativement mauvais pronostic chez les patients atteints de diverses conditions, y compris le cancer, l'insuffisance rénale chronique, et l'insuffisance cardiaque congestive.^{6,14,18,23} Cette association a été explorée de façon plus complète chez les patients subissant des hémodialyses à long terme. Dans une étude rétrospective de près de 100 000 patients subissant une hémodialyse, les niveaux d'hémoglobine de 8 g/dL ou moins étaient associés avec un doublement de la mortalité, en comparaison avec ceux ayant un taux d'hémoglobine de 10 à 11 g/dL.²⁵ Ces preuves ont contribué à l'élaboration de lignes directrices pour la gestion de l'anémie chez les patients atteints de cancer ou de maladie rénale chronique, recommandant de maintenir un taux d'hémoglobine cible de 11 à 12 g/dL. Toutefois, un essai prospectif multicentrique sur des patients humains cardiaques subissant une dialyse qui avait pour objectif d'atteindre des niveaux d'hématocrite normaux a dû être interrompu en raison d'une mortalité accrue dans le groupe ayant un l'hématocrite le plus élevé. Il est à noter que les patients qui avaient des niveaux élevés d'hématocrite dans cette étude avaient reçu des doses plus élevées d'érythropoïétine et de fer dextran par voie intraveineuse que les patients qui avaient un hématocrite plus faible.²⁶

Malgré l'augmentation des études à niveau de preuves élevé et l'apparition de consensus permettant de donner des directives de gestion, les mécanismes de développement des anémies dans le contexte des maladies rénales chroniques demeure encore en partie méconnus et le traitement de ces patients avec une supplémentation en fer est toujours débattu.

1.5. Principes de supplémentation en fer

Le fer est peu absorbé par voie orale en raison de la régulation à la baisse de l'absorption dans le duodénum. Seulement une fraction du fer absorbé va atteindre les sites de l'érythropoïèse, en raison de dérivation par des cytokines, qui dirigent le fer dans le système réticulo-endothélial.

La supplémentation en fer des patients ayant une anémie d'inflammation chronique est controversée. En effet, le fer est un nutriment essentiel pour le développement des microorganismes et des cellules tumorales et sa séquestration dans le système réticulo-endothélial est une stratégie de défense. Une étude réalisée en médecine humaine portant sur des mesures visant à prédire le risque de bactériémie chez les patients hémodialysés qui reçoivent par voie parentérale du fer a montré que les patients avec une saturation de transferrine ou une concentration en ferritine plus élevée ont un risque significativement plus élevé de développement de bactériémie.²⁷ Un des mécanismes explicatifs est relié au fait que le fer a un effet en inhibiteur sur l'immunité cellulaire et diminue l'activation des voies associées à la production d'interféron- γ , une cytokine pro-inflammatoire fondamentale dans l'activation du système immunitaire et la protection contre les microorganismes. Par ailleurs, la supplémentation

en fer favorise la formation de radicaux hydroxyles hautement toxiques qui peuvent endommager les tissus, occasionner une dysfonction endothéliale et augmenter le risque de développement d'accidents vasculaires.²⁸

Toutefois, une supplémentation en fer peut aussi s'avérer bénéfique, surtout lorsqu'une carence en fer absolue accompagne une anémie d'inflammation chronique. Par ailleurs, une carence fonctionnelle en fer peut se développer dans des conditions d'érythropoïèse intense, tel que suite à une supplémentation avec de l'EPO.²⁹ Il a été démontré que l'administration parentérale de fer permet d'améliorer le taux de réponse à la supplémentation en EPO chez les patients atteints de cancer qui subissent une chimiothérapie et chez les patients avec des maladies rénales chroniques.³⁰

Sur la base des données actuelles, les patients humains atteints d'anémie associée à des maladies chroniques ayant une carence absolue de fer devraient recevoir une supplémentation en fer.^{30,31} Il en est de même pour les patients qui ne répondent pas à une thérapie avec de l'EPO à cause d'une déficience fonctionnelle en fer. Dans ce dernier contexte, le fer est plus susceptible d'être absorbé et utilisée par la moelle osseuse plutôt que par les pathogènes.³² Cependant, un traitement à base de fer n'est pas recommandé pour des patients atteints d'anémie associé à des maladies chroniques qui ont un taux de ferritine normal ou élevé, en raison d'un risque d'effets aduerses plus élevé.^{11,14,28,33-35}

2. Le rôle de l'érythropoïétine

2.1. Inflammation & Érythropoïèse

Chez les patients humains atteints de maladies inflammatoires chroniques, la prolifération et la différenciation des précurseurs érythroïdes est affectée par les effets inhibiteurs de l'interféron- α - β et γ , du TNF- α , et de l'interleukine-1.^{14,36} Les mécanismes sous-jacents impliquent l'induction de cytokines de l'apoptose, la régulation négative de l'expression de récepteurs de l'EPO sur les cellules souches, des dérégulations de la production et de l'activité de l'EPO, et la diminution de l'expression d'autres facteurs hématopoïétiques, comme les 'stem-cell factor'.^{36,37} De plus, les cytokines pro-inflammatoires exercent des effets toxiques directs sur les cellules souches en induisant la formation de radicaux libres labiles tels que l'oxyde nitrique ou l'anion superoxyde par les cellules voisines 'macrophage-like'.^{14,38}

2.2. Effets sur la synthèse d'EPO

L'EPO régule la prolifération des cellules érythroïdes au niveau central. L'expression de l'EPO est inversement corrélée à l'oxygénation tissulaire et au taux d'hémoglobine, et il existe une relation semi-logarithmique entre la production d'EPO et le degré d'anémie. Parfois, la réponse de l'EPO lors d'anémie de maladie chronique est insuffisante pour le degré d'anémie observé. Les cytokines IL-1 et TNF- α inhibent directement l'expression de l'EPO in-vitro, une constatation qui

est probablement due, au moins en partie, à la synthèse de radicaux libres par ces cytokines, ce qui affecte les capacités de liaison érythropoïétine avec ses récepteurs et endommage les cellules productrices d'EPO.³⁹ Il a été démontré que l'injection de LPS chez des souris induit une réduction de l'expression de l'ARNm de l'EPO dans les reins ainsi qu'une diminution des concentrations d'EPO en circulation.^{14,39}

2.3. Effets sur la sensibilité de la moelle osseuse à l'EPO

La réactivité des cellules progénitrices érythroïdes à l'EPO semble être également inversement reliée à la sévérité de la maladie chronique sous-jacente et à la quantité de cytokines circulantes, car en présence de concentrations élevées d'interféron- γ ou TNF- α , des quantités beaucoup plus élevées d'EPO sont nécessaires pour rétablir la formation des cellules UFC-Érythroïdes.⁴⁰ Après liaison à son récepteur, l'EPO stimule des voies de transduction du signal en activant la phosphorylation de tyrosines kinases, processus affectés par les cytokines inflammatoires.³⁹

La régulation négative des récepteurs de l'EPO et la disponibilité limitée du fer contribuent à l'inhibition de la prolifération des cellules progénitrices érythroïdes ainsi que de la synthèse de l'hémoglobine. Par ailleurs, l'augmentation de l'érythrophagocytose au cours de l'inflammation et les dommages occasionnés aux érythrocytes médiés par les cytokines et les radicaux libres entraîne une diminution importante de la demi-vie érythrocytaire.³³

2.4. Mesure de l'EPO dans un contexte d'anémie

La mesure des niveaux d'EPO est utile uniquement pour les patients anémiques avec des niveaux inférieurs à 10 g/dL d'hémoglobine chez l'homme, car à des concentrations d'hémoglobine plus élevées, les taux d'EPO restent normalement dans les valeurs usuelles.⁴¹ Aussi, toute interprétation d'un niveau d'EPO dans une situation d'anémie de maladie chronique doit prendre en compte le degré de anémie.

3. Le rôle des protéines de la phase aiguë de l'inflammation

3.1. Caractéristiques générales

Le terme réaction de phase aiguë (RPA) décrit une série d'évènements physiopathologiques qui se produisent chez des animaux exposés à des stimuli potentiellement pathogènes. La pathogénie de la RPA commence dans les sites inflammatoires, où les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée (soit les macrophages et, dans une moindre mesure, les neutrophiles) produisent et libèrent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α .⁴² Ces cytokines ont un effet non négligeable sur les organes impliqués dans l'homéostasie, comme le système nerveux central (SNC), le système nerveux autonome et la glande surrénale, afin d'établir une réponse protectrice rapide et intense.

Dans le SNC, les cytokines induisent une cascade d'évènements qui potentialisent la réponse immunitaire, favorisant ainsi l'apparition des trois caractéristiques de la RPA, à savoir la fièvre, la leucocytose et une augmentation de la concentration sérique des protéines inflammatoires de la phase aiguë (PPA). Bien que les techniques d'étude sur l'expression des gènes de cytokines ont déjà été établies chez le chat⁴³, la majorité des études félines ont examiné la réponse des PPA suite à des infections virales spécifiques.^{44,45}

La pathogénèse moléculaire de la RPA du chat reste encore méconnue. Il a néanmoins été démontré que la production de cytokines est plus élevée chez les individus jeunes ou âgés et diminue à la période adulte, ce qui s'explique notamment par l'apparition fréquente de maladies inflammatoires chez les animaux jeunes et âgés.⁴⁶ Il semblerait également que l'induction des

cytokines pro-inflammatoires peut être reproduit chez les chats en réponse à l'administration de LPS, de la même façon que cela a été démontré dans d'autres espèces.⁴⁷

3.2. Synthèse des protéines de la phase aigue chez le chat

Une des 3 caractéristiques de la RPA est la modulation de la synthèse de protéines par les hépatocytes, avec des variations plasmatiques de PPA pouvant dépasser plus de 25% après un stimulus inflammatoire. Certaines protéines augmentent (PPA positifs), tandis que la concentration d'autres protéines diminuent (PPA négatifs).

Le mécanisme responsable de l'altération de la synthèse protéique implique les cytokines libérées depuis les sites inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) et également les glucocorticoïdes endogènes. Les cytokines agissent de manière synergique: le TNF- α mobilise les acides aminés périphériques par l'activation d'un processus protéolytique dans les muscles, ce qui augmente les molécules disponibles dans le foie pour la synthèse de nouvelles protéines. L'IL-1 est essentiel dans la modulation de la synthèse des protéines hépatiques car il a un effet inhibiteur sur la synthèse des PPA négatives et, en revanche, une activité de stimulation sur la synthèse des PPA positives. Enfin, l'IL-6 facilite la libération de PPA dans le sang.⁴⁸ Ce modèle complexe de l'induction est surtout défini comme une réponse de type I mais certaines PPA comme l'Hepcidine sont induites principalement par l'IL-6, selon une réponse de type II.⁴⁹

Chez les espèces autres que le chat, l'albumine est la PPA négative la plus importante. La diminution de la synthèse de l'albumine permet de rendre disponible une grande quantité d'acides

aminés pour la synthèse des PPA positives. La transferrine, l'apo-lipoprotéine A1, la protéine de liaison du rétinol, la protéine de liaison du cortisol et la transthyrétine, sont d'autres PPA négatives. Aucune donnée n'est disponible sur le rôle possible de l'albumine comme une protéine négative de la phase aiguë chez le chat, et bien qu'une diminution ait été observée dans de nombreux processus inflammatoires félines, il n'a jamais pas été déterminé si cette diminution est causée par une extravasation de l'albumine vers les tissus inflammatoires ou si elle correspond à une vraie diminution de la production hépatique.

Le groupe des PPA positives comprend un grand nombre de protéines. Les plus connues sont la protéine C-réactive (CRP), les protéines du complément (C3 et C4), l' α 1-acid glycoprotéine (AGP), la protéine de liaison du LPS (LBP), l'haptoglobine (HAP), la céruloplasmine (Cp), le Sérum Amyloid A (SAA) ou encore les α -globulines ayant une activité anti-protéase (par exemple α 1-antitrypsine) et le fibrinogène.⁵⁰ Le groupe de PPA positives tend à augmenter en permanence avec l'inclusion de molécules nouvellement découvertes, tels que, par exemple, l'hepcidine, une protéine impliquée dans la régulation du métabolisme du fer lors de l'inflammation (décrite plus loin) ou des molécules qui sont impliquées dans des processus différents de l'inflammation, mais qui se caractérisent par un comportement de type PPA (montrant une augmentation de $> 25\%$ au cours de l'inflammation). C'est le cas de l'antithrombine III, qui peut agir comme une PPA chez le chat.⁵¹

En général, la fonction principale des PPA est de contribuer à la défense de l'organisme au cours de l'inflammation par la modulation de l'efficacité du système immunitaire (CRP, C3 et C4, AGP, LBP), par le transport de certaines molécules évitant ainsi leur perte potentielle (HAP, Cp), ou par la protection des tissus contre les dommages excessifs générés par des médiateurs

inflammatoires (SAA, α 1-antitrypsine). La plupart de ces protéines, cependant, ont plus d'une fonction. Cp, par exemple, peut agir comme transporteur de cuivre et comme antioxydant, la CRP se lie aux peptides bactériens mais peut aussi moduler la réponse de certaines cellules immunitaires/inflammatoires et l'HAP se lie à l'hémoglobine libre et est également en mesure de contrôler la fonction des neutrophiles.⁵² Les PPA les plus importantes du chat sont le SAA, l'HAP et l'AGP.^{49,50}

3.3. Utilité diagnostique des PPA

Les stimuli inflammatoires induisent la production et la libération des PPA. La concentration des PPA positives commence donc à augmenter en quelques heures, atteint un pic en 24-48 h, et reste élevée tant que le stimulus inflammatoire persiste. Pour cette raison, ces protéines représentent un outil idéal pour l'identification précoce d'une inflammation et permettent de surveiller la résolution d'un processus inflammatoire.

L'ampleur de l'augmentation des PPA, cependant, est variable. Par rapport aux valeurs de base, qui sont souvent négligeables, certaines PPA augmentent de moins de 2 fois, d'autres de 3 à 10 fois ou même de 10 à 1000 fois. Sur la base de ces magnitudes, les PPA ont été classées comme 'mineures', 'moyennes' ou 'majeures'.^{49,50} La magnitude de l'augmentation varie selon les espèces et chacun a ses propres PPA majeures et mineures.⁵⁰ Certains auteurs préfèrent utiliser les termes 'mineur' ou 'majeur' sur la base de quelle protéine augmente plus souvent dans une espèce donnée, indépendamment de la magnitude de l'augmentation.⁵³

D'un point de vue diagnostique, l'augmentation rapide dans les PPA majeures permet un diagnostic précoce des maladies inflammatoires. Malheureusement, l'augmentation des PPA est peu spécifique, car elles augmentent en présence d'inflammation indépendamment de l'agent responsable. Pendant le suivi d'un patient, la surveillance des niveaux de PPA peut être importante dans la prise de décision clinique. En effet, une fois que les stimuli inflammatoires ont été éliminés, la concentration en PPA diminue plus tôt que d'autres indicateurs de la maladie (comme les anticorps, qui peuvent rester élevés plus longtemps), mais restera élevé si l'agent pathogène ou la cause sous-jacente persiste dans l'organisme (en dépit d'une éventuelle normalisation des paramètres physiques ou clinico-pathologiques suite au traitement mis en place). Dans ce cas, le traitement devrait être changé ou modifiée jusqu'à ce qu'une réponse complète impliquant une diminution des PPA soit observée.⁴²

Les valeurs de référence varient beaucoup selon les méthodologies utilisées. Une étude récente (2012) a publié un résumé des différents résultats obtenus chez des chats sains :

	Giordano et al. (2004)	Duthie et al. (1997)	Kajikawa et al. (1999)	Sasaki et al. (2003)
Serum amyloid A (µg/mL)	10.21 ± 8.32		16.6 ± 11.4	0.6 ± 1.06
α1-Acid glycoprotein (µg/mL)	1200 ± 620	100-480	244.1 ± 96.1	
Haptoglobin (mg/mL)	1.3 ± 0.64	0.04-3.84	0.416 ± 0.367	

Tableau 2 : Valeurs de références publiées pour les principales protéines de la phase aigue du chat.

Les différences dans les concentrations de protéines de phase aiguë chez les chats en bonne santé sont probablement dues à l'utilisation de différentes méthodes, à un problème de spécificité des anticorps utilisés dans l'essai et à l'absence de matériel complètement standardisé pour ces dosages.

3.4. Comment mesurer les PPA

La plupart des PPA positives migrent dans la portion α ou β des globulines mesurées par électrophorèse. Une électrophorèse des protéines sériques peut ainsi fournir des informations générales sur la présence de conditions inflammatoires, qui entraînent généralement une augmentation des globulines en α ou β .⁵⁴ Cette mesure est toutefois peu spécifique puisque d'une part il existe d'autres protéines avec une motilité en portion α ou β (comme les lipoprotéines ou la plupart des protéines de transport), et d'autre part, ce test ne révèle pas quelle protéine est réellement responsable de l'augmentation observée.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer spécifiquement certaines PPA. Il s'agit notamment de la méthode colorimétrique proposée par Eckersall et al. (1999) pour mesurer l'HAP en fonction de sa capacité à lier l'hémoglobine, et de nombreuses méthodes immunologiques telles que la radio-immunologie (RIA) ou les techniques d'ELISA.^{55,56} L'interprétation des résultats de sérums hémolysés, ictériques et des échantillons de lipémiques doit être faite avec prudence, en raison de l'influence possible de ces substances interférant sur les résultats.⁵⁵ Toutefois, la plupart de ces méthodes prennent du temps et sont relativement dispendieuses ce qui limite leur utilisation à grande échelle pour la pratique clinique. Récemment, des tests immunoturbidimétriques pour mesurer certaines PPA félines ont été validées et

devraient probablement réduire le coût individuel du test, permettant ainsi une plus grande utilisation du dosage des PPA.^{57,58}

3.5. Serum Amyloid A

Le sérum amyloïde A (SAA) est une PPA majeure du chat, comme dans de nombreuses autres espèces. Le SAA fonctionne comme un chélateur du cholestérol oxydé qui est potentiellement toxique mais a également des activités de immunomodulatrice. Les concentrations en SAA augmentent tôt lors de l'inflammation chez le chat, en particulier dans les cas de PIF mais l'ampleur de l'augmentation du SAA chez le chat (environ 10-50x) est plus faible que dans d'autres espèces (> 100x chez l'homme).^{50,59} Il a été démontré que le SAA augmente également lors de tumeurs, de maladies hépatiques, lors de diabète ou en cas d'insuffisance rénale aiguë.⁶⁰ Sa spécificité en tant que marqueur de conditions inflammatoires est donc limitée, bien que l'ampleur de l'augmentation est généralement plus élevée chez les chats souffrant d'une maladie associée à une inflammation comparativement avec les chats souffrant de troubles non-inflammatoires.⁶⁰

Le suivi des concentrations sériques en SAA pourrait être utile chez les chats abyssins, somaliens ou orientaux, prédisposée à l'amyloïdose systémique où les concentrations sériques en SAA sont élevées et qui possèdent certaines séquences de SAA dites amyloïdogènes.⁶¹ Chez ces patients, le SAA produit durant une inflammation légère et non spécifique subit une extravasation depuis le compartiment sanguin vers les tissus où il ne peut pas être complètement protéolysé et

subit ainsi une protéolyse partielle qui génère des fibrilles de SAA avec une β -conformation particulière responsable de l'accumulation de substance amyloïde dans les tissus.

3.6. Alpha-1-Glycoprotéine (AGP)

La plupart des études sur les applications cliniques des PPA félines ont été concentrés sur l'AGP, et en particulier sur ses concentrations dans le sérum ou dans les tissus chez les chats atteints de PIF. L'AGP appartient à la famille des lipocalines, un groupe de protéines de liaison extracellulaire spécifique pour les molécules hydrophobes, et plus précisément à la sous-famille des immunocalines, qui comprend des protéines avec des propriétés immunomodulatrices.⁶² L'AGP humain est caractérisé par un poids moléculaire assez faible (41-43kDa), une solubilité élevée, et un pourcentage élevé de carbohydrates (45%). Son profil de glycosylation est très variable (12-20 glycoformes) en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques, comme la grossesse, l'inflammation ou le cancer.⁶³

La fonction de l'AGP n'a pas été complètement définie, en particulier chez le chat. Cependant, un effet immunomodulateur et un rôle anti-inflammatoire a été suggéré, en régulant à la baisse la réactivité des neutrophiles, en stimulant la production d'antagoniste de l'IL-1 par les macrophages, en inhibant l'agrégation plaquettaire et la prolifération des lymphocytes et en modulant la production de cytokines anti-inflammatoires par les leucocytes. Chez le chat, on observe une augmentation d'AGP lors d'inflammation spontanée ou induite expérimentalement. L'AGP peut également augmenter chez les chats atteints de néoplasmes, notamment avec le

lymphome, bien que l'intensité de l'augmentation de l'AGP ne semble pas avoir un rôle pronostique, comme cela a été constaté chez le chien.⁶⁴

La plupart des études sur l'AGP du chat ont porté sur les maladies infectieuses, avec un accent particulier sur le virus de la PIF. La PIF est une maladie infectieuse mortelle causée par un coronavirus félin (FCoV) qui est difficile à diagnostiquer par des approches classiques. Une augmentation de l'AGP a été identifiés depuis de nombreuses années au cours des infections expérimentales avec la PIF.⁶⁵ Dans les tissus de chats atteints de PIF, la présence d'AGP semble être associée à la présence de l'antigène viral et l'AGP semble être présent en grandes quantités.⁶⁶ Des études d'infections spontanées par le virus de la PIF ont confirmé que les augmentations d'AGP sont si évidents et marqués que cela peut contribuer de façon importante au diagnostic de la maladie.⁶⁷ De même, les niveaux élevés d'AGP dans les effusions peuvent être utilisés pour confirmer une suspicion clinique de PIF humide.⁵⁷ Néanmoins, il a été démontré que excréteurs non symptomatiques de FCoV ont également des fluctuations cycliques de l'AGP sérique, probablement en raison de réinfections continues.⁵⁹ Partant de ce constat, les niveaux AGP doivent être interprétés avec prudence chez les chats vivant en élevage où la maladie est endémique.⁶⁶

En dehors de ces changements quantitatifs, l'hypothèse que la présence de différentes glycoformes de l'AGP pourrait jouer un rôle dans la détermination de résistance ou la sensibilité aux maladies infectieuses a stimulé plusieurs chercheurs à examiner les caractéristiques structurelles de l'AGP chez les chats atteints de PIF.^{42,59} En revanche, après les flambées de PIF, les titres d'anticorps, le pourcentage d'excréteurs et les niveaux d'AGP chez des chats qui n'ont pas développé la maladie diminuent, mais le degré de $\alpha(2-3)$ -syalilation de l'AGP sérique

augmente.⁶⁸ Ces résultats soulèvent des questions intéressantes sur les interactions possibles entre FCoV et l'AGP qui pourraient jouer un rôle pathogène dans le développement de la PIF ou bien un rôle protecteur contre l'infection par le FCoV, selon les glycoformes, et aussi sur les rôles possibles du $\alpha(2-3)$ et du $\alpha(2-6)$ -acide sialic comme molécule de liaison du coronavirus et d'autres virus pathogènes.⁶⁹

3.7. Haptoglobine

L'Haptoglobine fait aussi partie des PPA mineures de l'inflammation du chat. L'un des effets métaboliques de l'haptoglobine dans les plaies infectées est de lier l'hémoglobine afin de limiter la disponibilité du fer de l'hémoglobine pour la croissance bactérienne.⁵⁰ En effet, certaines maladies infectieuses et inflammatoires induisent la séquestration du fer dans les macrophages pour éviter son utilisation par des bactéries et diminuent l'absorption intestinale du fer, processus aboutissant finalement à l'apparition d'une anémie d'inflammation chronique.⁷⁰ Les valeurs de références pour l'haptoglobine ont été établies dans une populations de 40 chats sains : [0.04 - 3.84g/L] dans une première étude en 1997⁶⁷ puis dans d'autres études dont une récente (2012) comparant les valeurs entre une population de 37 chats sains et 36 chats malades. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Acute Phase Protein		Healthy cats	Sick cats
Serum amyloid A ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cats	34	32
	Mean \pm SD	1.8 \pm 2.3	16.0 \pm 32.1
	Median	1.2	2.1
	Range	0.1–12.7	0.4–124.8
α 1-Acid glycoprotein ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cats	34	33
	Mean \pm SD	532.8 \pm 204.1	870.3 \pm 784.2
	Median	515.0	560.0
	Range	195.0–1120.0	220.0–3210.0
Haptoglobin (mg/mL)	Number of cats	22	18
	Mean \pm SD	2.5 \pm 2.1	5.6 \pm 5.8
	Median	1.8	3.6
	Range	0.1–7.4	0.8–20.4
Albumin (g/L)	Number of cats	26	32
	Mean \pm SD	28.2 \pm 4.7	28.7 \pm 3.8
	Median	27.2	29.0
	Range	19.7–41.2	19.5–35.0

Tableau 3 : Résultats comparés entre une population de chats sains et malades pour les principales protéines de la phase aigue du chat.⁷¹

3.8. Hepsidine

L'identification récente de l'hepcidine a considérablement amélioré notre compréhension des interactions entre les mécanismes inflammatoires et le métabolisme du fer. L'hepcidine est une protéine positive de la phase aigue de l'inflammation dont la forme active est composée de 25 acides aminés (Hepcidin-25). C'est un petit peptide similaire aux peptides de la famille des défensines dont la production par les hépatocytes est modulée en réponse à l'anémie, l'hypoxie, ou l'inflammation. Elle constitue la principale hormone de régulation du fer. En effet, en limitant

l'absorption digestive de fer et la mobilisation des réserves de l'organisme, l'hepcidine représente une enzyme clef dans l'homéostasie du fer (Figure 3). Sa synthèse contribue ainsi aux mécanismes de protection de l'organisme contre une infection par un organisme étranger.

14,19,70,72,73

La production d'hepcidine par le foie cause donc une déficience fonctionnelle relative en fer, diminue la production d'EPO et diminue les interactions entre l'EPO et les cellules progénitrices de la moelle osseuse, différents mécanismes aboutissant tous au développement progressif d'une anémie non régénérative. Des études expérimentales ont montré que les souris exprimant de façon anormale l'hepcidine meurent en très jeune âge à cause d'anémies non régénératives par carence en fer. A l'inverse, les humains et les souris ayant une déficience génétique en hepcidine souffrent d'hémochromatose, une maladie qui se caractérise principalement par une intoxication chronique au fer lié à l'absence de régulation des réserves en fer par l'hepcidine.⁷⁰

Dans le passé, en raison de l'absence d'un dosage sérique précis, la plupart des études de l'hepcidine chez l'homme ont été réalisées en utilisant un test urinaire. Parce que un tel dosage peut ne pas refléter de façon fiable les niveaux en hepcidine sérique chez les patients atteints de MRC, ces études ont été difficiles à interpréter parce que la relation entre pro-hepcidin (mesurée dans l'urine), l'hepcidine, et les paramètres de fer reste incertaine.⁷⁴ La spectrométrie de masse est capable de mesurer l'hepcidine sérique et a été utilisée pour détecter une corrélation positive entre l'hepcidine sérique et de la ferritine dans les situations de MRC.⁷⁵ Malheureusement, cette technique reste limitée même en médecine humaine par sa nature semi-quantitative, les coûts associés et le manque de disponibilité de l'équipement nécessaire.

Malgré des avancées importantes et récentes suite à la découverte de l'hepcidine, beaucoup de travail doit encore être fait. Par exemple, la présence dans le sang de la pro-hepcidine à des concentrations supérieures au fer sous sa forme active reste énigmatique. Huang et al ont récemment suggéré que la conversion de la pro-hepcidine en hepcidine se produit dans la circulation périphérique, sous un contrôle médié par le fer mais cette hypothèse devra être confirmée par des études plus larges. Il reste aussi des questions à clarifier quant aux fluctuations de l'hepcidine liés à rythme circadien et suite aux repas ou encore à savoir quelles informations peut-on tirer de la quantification de l'hepcidine urinaire. Depuis la découverte que l'hepcidine est directement impliquée dans la régulation de l'homéostasie du fer, il semble de plus en plus évident que sa mesure pourrait se révéler être un outil utile dans le diagnostic différentiel des troubles de la surcharge en fer et de la carence en fer. Le rapport hepcidine/ferritine sera probablement un outil majeur dans le cadre clinique.⁷⁶

De même, l'évolution des concentrations hepcidine suite à une supplémentation orale en fer pourrait s'avérer un test utile pour évaluer l'absorption du fer dans le contexte des carences ou des surcharges en fer, notamment lors d'hémochromatose. Enfin, une importance particulière devra être portée sur des études de collaboration entre les différents laboratoires visant à comparer les performances des différentes méthodes d'analyse, afin de permettre la standardisation du dosage de l'hepcidine. À cet égard, les résultats de la première ronde internationale pour la quantification de l'hepcidine urinaire et plasmatique sont attendus avec impatience.¹⁵ Toutefois, à notre connaissance, l'hepcidine n'a encore jamais été évalué chez les animaux de compagnie.

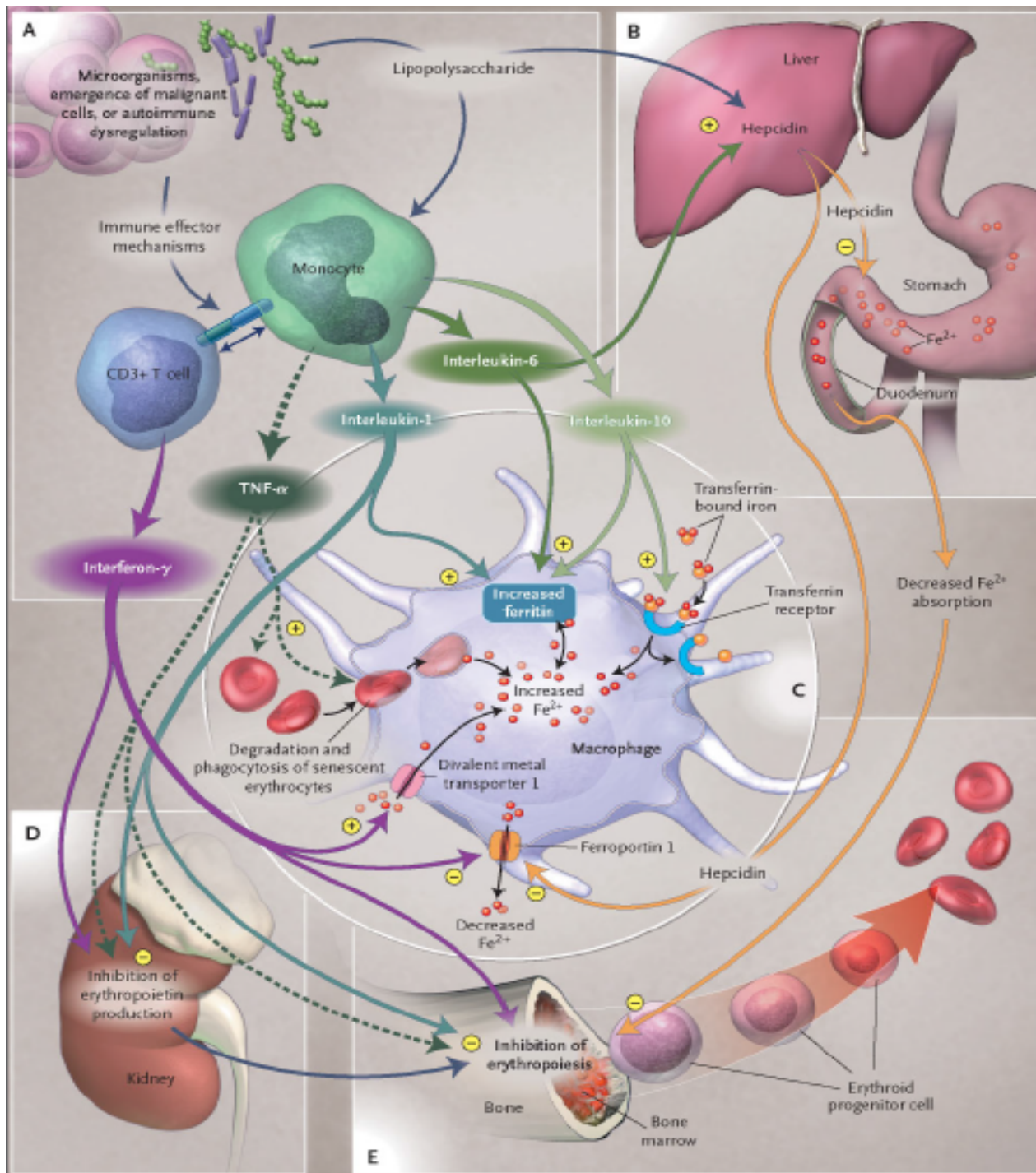


Figure 3: Schéma récapitulatif des mécanismes de production d'hepcidine et ses principaux effets sur l'organisme. Sous l'effet de l'IL-6 principalement, le foie produit de l'hepcidine qui diminue l'absorption digestive du fer et induit une séquestration de ce dernier dans les macrophages par la

régulation négative de l'expression de la ferroportine. Ces mécanismes, combinés aux autres médiateurs de l'inflammation, induisent une inhibition de l'érythropoïèse.⁷⁰

3.9. Effet de l'âge, du sexe et des maladies sur les PPAs du chat

Dans l'étude de Kann et al en 2012, l'association entre l'âge, le sexe, la maladie et les concentrations sériques en PPA a été évaluée⁷¹. Dans cette étude, l'âge a été associé à des niveaux sériques en SAA plus élevés (après transformation logarithmique). Les concentrations plus élevées chez les chats âgés pourraient être attribuables à l'incidence plus élevée de maladies sous-cliniques. La découverte d'une association entre les concentrations en PPA et le sexe (PPA plus élevées chez les femelles) est aussi un fait intéressant. Dans la littérature humaine, des différences dans les concentrations en PPA selon le sexe ont déjà été rapportées, avec des résultats variables entre les études. Ces différences ont été observées chez les rats à la fois dans des conditions normales et lors d'inflammation induite expérimentalement et il est maintenant généralement admis que les concentrations en PPA diffèrent entre les rats mâles et femelles. Il apparaît donc important de prendre en compte le signalement du patient lors de l'utilisation des PPA en situation clinique ou de recherche.

La présence de concentrations plus élevées en PPA chez les animaux malades n'est pas surprenante compte-tenu du fait que les PPA sont connues pour augmenter dans de nombreux états pathologiques.^{60,66} Une variété de conditions physiopathologiques ont été rapportées comme étant associées à une augmentation de la concentration en SAA, AGP et HAP chez les chats tels que des maladies endocriniennes, des maladies infectieuses, des néoplasies, des blessures, des

chirurgies ou des insuffisances rénales.⁴² La plupart des conditions publiées associées à une augmentation des PPA chez le chat sont rappelées dans le graphique suivant :

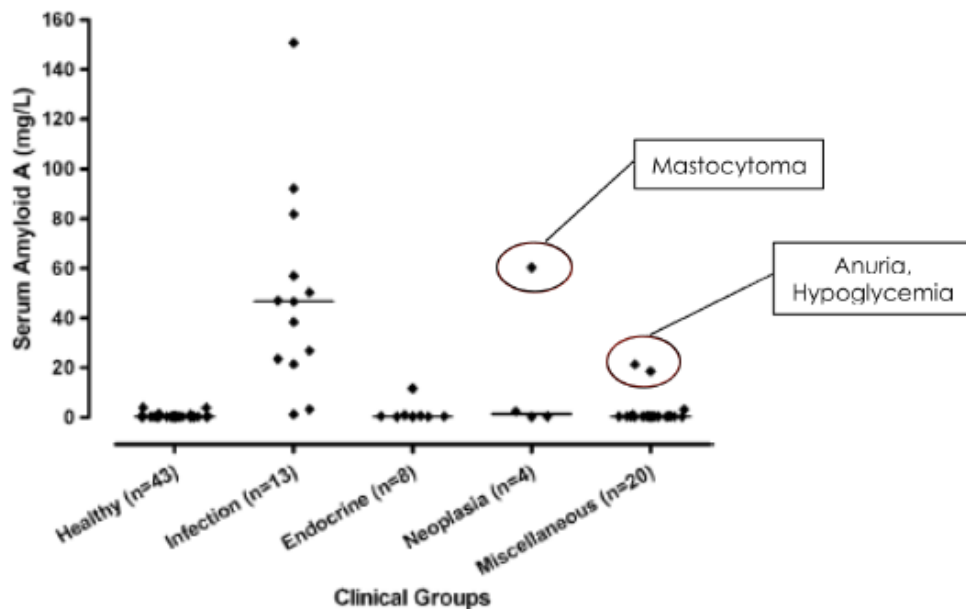


Figure 4: Concentrations en Serum Amyloid A (SAA) dans différentes situations cliniques. On observe que la plupart des augmentations en SAA sont associées à des conditions infectieuses ou plus sporadiquement d'autres affections comme un cas de mastocytome, un cas d'anurie et un cas d'hypoglycémie.⁴²

Physiologiquement, il semble logique de s'attendre à ce que les concentrations des différentes PPA soient corrélées entre elles. Ainsi, il a été montré l'existence d'une corrélation entre le SAA et AGP, HAP ainsi qu'entre AGP et HAP.⁷¹

Les principales maladies pour lesquelles un dosage de PPA a été réalisé sont énumérées dans le tableau suivant.⁵⁸

Clinical diagnosis	Breed	Sex (F/M)	Age (year/month)	AGP (g/L)	SAA (mg/L)
Infection/inflammation					
Keratoconjunctivitis	Siamese	F	2/10	1.5	23.6
Peridontitis/ lymphadenitis	Maine coon	M	1/0	1.3	26.9
Focal necrotic stomatitis	DSH	M	11	1.3	38.4
Dermatitis	Norwegian forest	M	1/10	1.0	3.3
Fracture	DSH	F	1/11	0.3	1.2
Severe head and pelvic trauma	DSH	M	12	2.0	150.6
Keratoconjunctivitis	Siamese	M	3/5	1.2	57.0
Acute laryngitis/pharyngitis	DSH	M	2/2	2.3	81.9
Acute pancreatitis	DSH	F	8/8	1.2	92.1
Penetrating foreign body/peritonitis	Burmese	M	0/8	1.2	46.6
Pyothorax	Maine coon	M	2/0	1.7	47.0
Deeply infected ulcer/dermatitis	DSH	F	17/1	0.9	21.4
Cystitis	DSH	M	19	1.5	50.3
Range (median)			0/8–19	0.3–2.3 (1.3)	1.2–150.6 (46.6)
Neoplasia					
Adenoma	DSH	F	6/0	0.6	0.2
Multicentric lymphosarcoma	DSH	F	14	1.1	2.5
Adenoma	DSH	F	8/8	0.3	0.4
Mastocytoma	DSH	F	10/0	0.5	60.4
Range (median)			6/0–10/0	0.3–1.1 (0.6)	0.2–60.4 (1.5)
Endocrine/metabolic disorder					
Diabetes mellitus	Siamese	F	15/7	0.3	0.7
Diabetes mellitus	DSH	F	9/0	0.4	0.9
Hyperthyroidism	DSH	F	15	0.5	11.6
Hyperthyroidism	Persian	F	12/0	0.7	0.3
Hyperthyroidism	DSH	M	16	0.4	0.3

Clinical diagnosis	Breed	Sex (F/M)	Age (year/month)	AGP (g/L)	SAA (mg/L)
Diabetes mellitus	DSH	M	9/1	0.7	0.3
Hyperthyroidism	DSH	F	N/A	0.3	0.5
Diabetes mellitus	DSH	M	9/2	0.5	0.4
Range (median)			9/0–16	0.3–0.7 (0.5)	0.3–11.6 (0.5)
Miscellaneous					
Epilepsy	Norwegian forest	F	0/11	0.7	0.4
Acute renal failure	DSH	F	15/9	0.6	3.2
Cystic kidneys	Persian	M	15	0.6	0.4
Hepatic encephalopathy	DSH	F	5/10	0.4	0.4
Vomiting	DSH	F	9/9	0.6	0.5
Hepatic steatosis	Norwegian forest	M	9/1	0.5	1.0
Hepatic cyst	DSH	F	14	0.5	0.4
Acute smoke poisoning	DSH	F	0/11	0.5	0.6
Hypertension	DSH	F	14	0.3	0.3
FLUTD	DSH	M	5/8	0.4	0.2
Anuria	DSH	M	5/3	1.6	21.3
Weight loss	DSH	F	5/1	0.4	0.3
Hepatopathy	Siamese	F	0/11	0.7	0.5
Depression	N/A	M	5	0.4	0.3
Hypoglycaemia	DSH	M	14	0.7	18.6
Chronic renal failure	Persian	F	4/8	0.4	0.4
Ileus	DSH	M	12	0.4	0.4
Pain, lumbal region	DSH	F	2/0	0.5	0.5
Neurological syndrome	DSH	M	4	0.4	0.5
FLUTD	DSH	M	7	0.5	0.6
Range (median)			0/11–15/9	0.3–1.6 (0.5)	0.2–21.3 (0.5)
Clinically healthy (<i>n</i> = 43)	Maine coon	N/A	N/A		
Range (median)				0.1–1.6 (0.4)	0.0–3.9 (0.4)

DSH, domestic short hair; FLUTD, feline lower urinary tract disease; N/A, not available; F, female; M, male

Tableau 4: Caractéristiques cliniques et concentrations en Serum Amyloid A et en Haptoglobine pour 88 chats regroupés en fonction de leur diagnostic.

4. Rôle de l'Hepcidine dans les maladies rénales chroniques

4.1. Inflammation et maladie rénale chronique

Les MRC sont des états pathologiques associées à un dysfonctionnement mitochondrial qui conduit à un déséquilibre entre la production de radicaux libres et d'antioxydants qui vont normalement neutraliser la production de ces radicaux libres pathologiques. L'inflammation chronique et le stress oxydatif, facteurs étroitement associés à l'activation du facteur nucléaire (NF- κ B) qui code pour la production de cytokines pro-inflammatoires, jouent un rôle clé dans le développement et la progression des MRC en médecine humaine (Figure 5). Le stress oxydatif est notamment au cœur de la pathogenèse des maladies rénales aiguës et chroniques et est connu pour jouer un rôle important dans le développement des glomérulonéphrites, des néphrotoxicités induites par certains médicaments, et des MRC.⁷⁷⁻⁸⁰

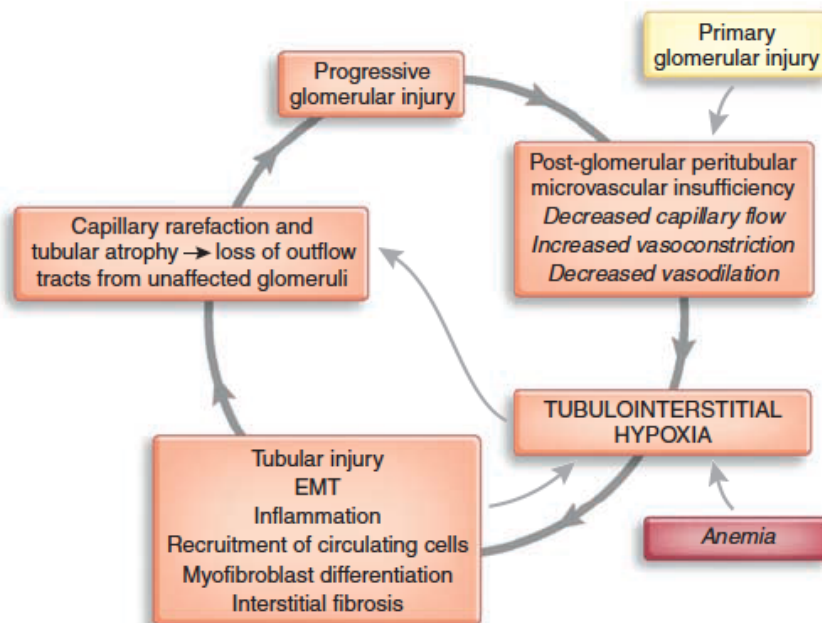


Figure 5: Schéma récapitulatif des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le maintien et la progression des maladies rénales chroniques.⁷⁸

Le traitement des MRC vise à ralentir sa progression, mais les thérapies efficaces restent limitées. Le contrôle de la pression artérielle ou de la protéinurie en utilisant des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou des bloqueurs de l'angiotensine II (ARA) est associé à un haut niveau de preuves mais l'efficacité clinique à long terme de ces approches est souvent limitée. Le méthyle de bardoxolone, un antagoniste oral du Nrf-2 (facteur nucléaire érythroïde-2) a montré un potentiel considérable pour la gestion d'une gamme de maladies chroniques, et notamment pour améliorer la fonction rénale chez des patients ayant une néphropathie diabétique avancée avec peu d'effets indésirables dans un essai de phase 2. Le palmitoléthanolamide (PEA), un acide gras essentiel de la famille des éthanolamines, est un nouvel agent anti-inflammatoire non stéroïdien étant très sécuritaire pour la fonction rénale ayant également des effets anti-fibrotiques. Ce médicament pourrait aussi représenter un candidat potentiel dans le traitement de l'inflammation associée aux MRC.⁷⁹

Dans l'insuffisance rénale chronique, la perte de néphrons est en corrélation avec la fibrose tubulo-interstitielle caractérisée par une inflammation, l'accumulation de matrice extracellulaire, l'atrophie tubulaire et la raréfaction des capillaires péri-tubulaires (Figure 6). L'inflammation persistante est considérée comme une composante intrinsèque de la réponse fibrotique. La perte de la microvascularisation crée un milieu hypoxique et l'ensemble des données disponibles suggère un rôle important de l'hypoxie comme explication à la nature progressive de la fibrose tubulo-interstitielle et glomérulaire. L'hypoxie fournit un signal de ralliement pour les cellules inflammatoire qui s'accumulent aux sites de lésion. Il peut également activer les cellules immunitaire résidentes ce qui peut constituer un stimulus inflammatoire très important dans le cadre des MRC. L'hypoxie chronique peut potentialiser une réponse pro-inflammatoire existante ou entraver la résolution des lésions et stimuler la mise en place de la

fibrose. En outre, il a été suggéré que certaines cellules inflammatoires ont le potentiel de se différencier en fibroblastes qui vont alors s'accumuler de façon pathologique dans la matrice extracellulaire si l'hypoxie se poursuit.^{77,78}

Étant donné que l'accumulation des données suggère que l'hypoxie chronique est une voie finale commune pour aboutir à l'insuffisance rénale, les stratégies thérapeutiques qui ciblent l'hypoxie semblent appropriées afin de retarder la progression des MRC. Les cibles potentielles pour les futurs traitements dans ce contexte sont la normalisation de la microvascularisation, l'administration de facteurs pro-angiogéniques pour restaurer l'intégrité microvasculaire ou encore la mobilisation de cellules souches progénitrices induites par l'hypoxie. Le succès limité des stratégies existantes pour retarder la progression des MRC suggère que de nouvelles pistes de traitement doivent être explorées.

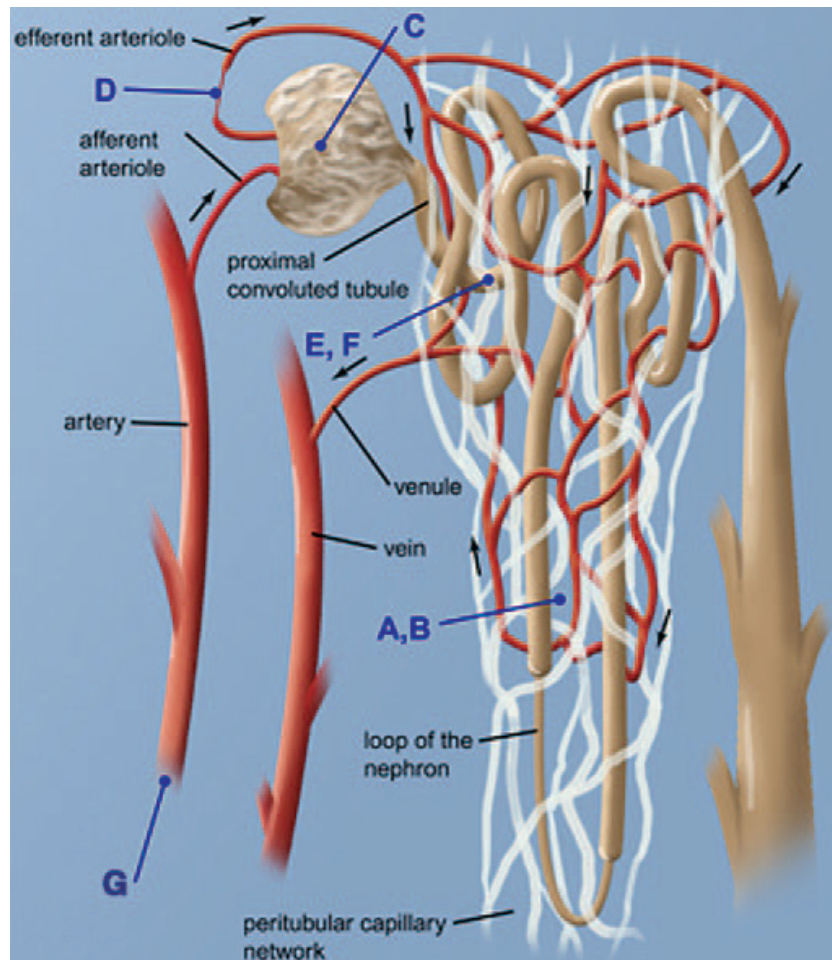


Figure 6 : Schéma des différents mécanismes d'hypoxie chronique dans les maladies rénales chroniques, incluant la perte de capillaires péri-tubulaires (A,B), la stagnation péri-tubulaire de la circulation sanguine capillaire induite par la sclérose glomérulaire (C), le déséquilibre des substances vas actives (D), la consommation d'énergie inappropriée induite par le stress oxydatif (E), l'augmentation des besoins métaboliques des cellules tubulaires (F), et la diminution des apports en oxygène à la suite de l'anémie (G).⁷⁷

4.2. Hepcidine : le lien entre l'inflammation et le métabolisme du fer

En médecine humaine, il a été montré récemment que les reins sont également impliqués dans le métabolisme du fer. L'hepcidine, soit dans le sérum ou dans l'urine, montre une forte corrélation avec le taux de ferritine sérique chez les patients atteints d'anémie associée à des conditions inflammatoires.^{18,70} Parce que la production d'hepcidine est augmentée par une inflammation et les concentrations élevées en hepcidine limitent la disponibilité du fer pour l'érythropoïèse, l'hepcidine joue probablement un rôle majeur dans l'anémie des patients souffrant de MRC ainsi que dans les mécanismes de résistance à l'EPO recombinante (rhEPO).⁸¹

Les niveaux en hepcidine élevés chez des patients hémodialysés à cause de MRC pourraient être dus à la combinaison d'une carence fonctionnelle en fer et d'une inflammation de faible grade. Il a également été suggéré que les reins sont impliqués dans l'élimination de ce peptide et ainsi les patients ayant une fonction rénale altérée pourraient avoir une élimination d'hepcidine inadéquate, contribuant également à son accumulation.⁸² Dans une étude sur 46 patients atteints d'insuffisance rénale chronique, non encore dialysés, l'hepcidine sérique était corrélée avec la clairance de la créatinine sérique et la cystatine C.¹⁸

Une étude transversale a été réalisée en médecine humaine pour évaluer les corrélations en hepcidine avec la fonction rénale, le statut en fer, et la CRP chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique étant soit sous traitement médical conservateur, soit sous hémodialyse, ou ayant reçu une transplantation rénale. Il a été démontré que la ferritine et l'hepcidine étaient plus élevés chez les patients hémodialysés, les transplantés et les patients

atteints d'insuffisance rénale chronique en comparaison avec les contrôles. Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, l'hepcidine est corrélée de manière significative avec des protéines totales, l'albumine, la créatinine, et le TFG. L'analyse de régression multiple chez les transplantés rénaux a montré que l'hepcidine était indépendamment reliée au TFG et à la ferritine. Il a été supposé que l'hepcidine élevée dans tous les groupes de patients étudiés pouvait être due à une inflammation de faible grade, fréquemment rencontrée dans la population de patients humains ayant une fonction rénale altérée.^{18,83}

Une étude plus récente a étudié les concentrations en hepcidine sérique chez des patients pédiatriques et adultes sains ou atteints de MRC à différents stades.¹⁵ Les résultats sont présentés dans la figure 7.

Par rapport à leurs témoins respectifs (médiane pédiatrique= 25,3 ng/ml, adulte = 72,9 ng/ml), on peut voir que l'hepcidine est significativement augmentée dans les groupes : pédiatrique en MRC (Pediatric Chronic Kidney Disease; PCKD) de stade modéré (PCKD2-4; 127,3 ng/ml), adulte en MRC (Adult Chronic Kidney Disease; ACKD) de stade modéré (ACKD2-4; 269,9 ng / ml), et pédiatrique en MRC de avancé (PCKD5D; 652,4 ng/ml). L'analyse de régression multiple a été utilisée pour évaluer la relation entre l'hepcidine et indicateurs de l'anémie, le statut en fer, l'inflammation et la fonction rénale. Dans le groupe PCKD2-4, il a été montré que la ferritine est significativement corrélée avec l'hepcidine ($R^2=0,57$). Dans le groupe ACKD2-4, la ferritine et le récepteur soluble de la transferrine étaient positivement associés avec l'hepcidine alors que TFG était inversement corrélé avec l'hepcidine ($R^2=0,78$). Dans le groupe PCKD5D, le pourcentage de saturation en fer et de la ferritine étaient des facteurs prédictifs de

l'hepcidine ($R^2=0,52$). Dans une analyse multivariée intégrant les trois groupes, l'hepcidine était prédite par les concentrations en ferritine et en protéine C-réactive ($R^2=0,6$).¹⁵

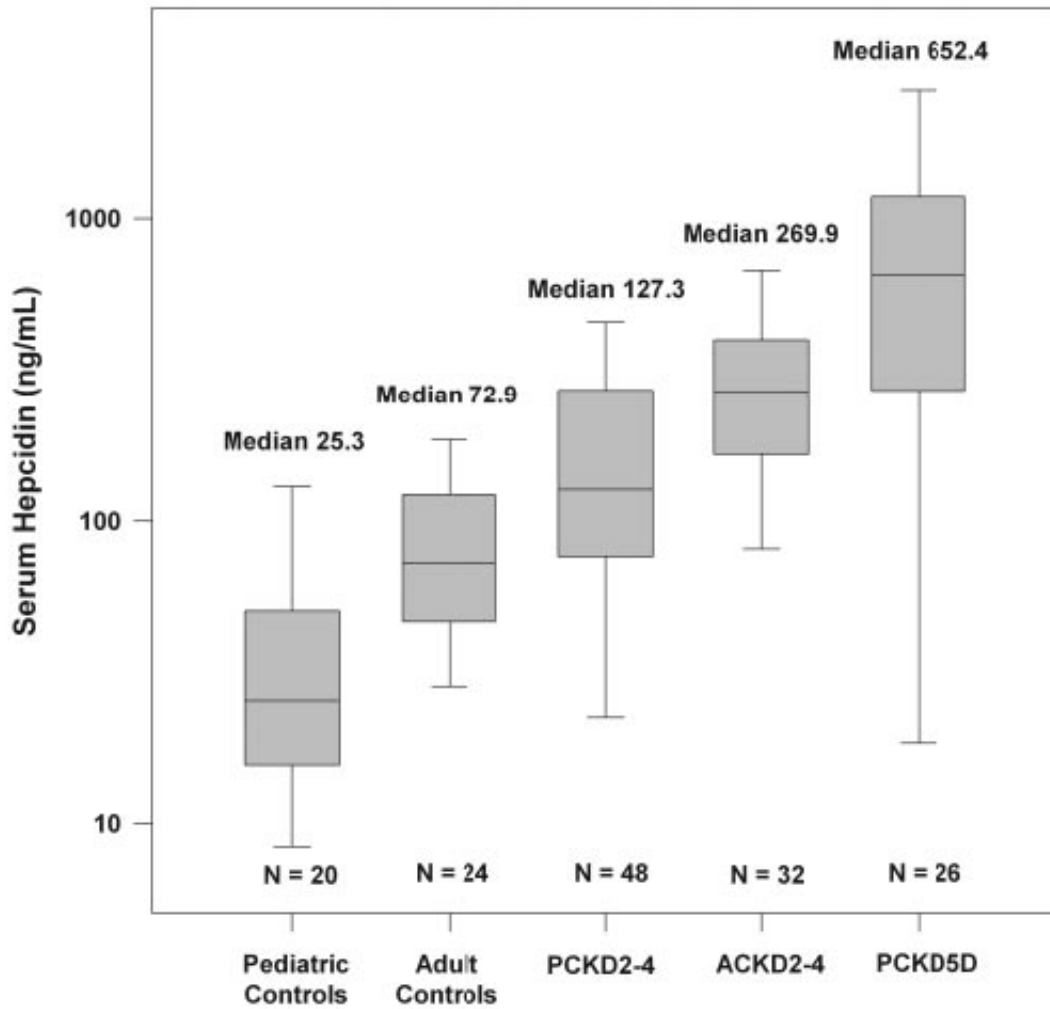


Figure 7 : Concentrations médianes en hepcidine chez des patients humains sains et malades (pédiatriques: PCKD; adultes: ACKD) ayant différents degrés de maladies rénales chroniques.⁸¹

5. Ouvertures thérapeutiques et perspectives en médecine vétérinaire

L'utilisation d'érythropoïétine exogène a révolutionné la néphrologie vétérinaire et constitue aujourd'hui un des principaux axes de traitement des anémies lors de maladie rénale chronique féline.⁸⁴ Néanmoins, un traitement raisonné doit tenir compte du statut en fer de l'animal, de la nécessité ou non d'une supplémentation en fer adjuvante au traitement à l'EPO et de l'ensemble des effets secondaires à moyen et long terme associés à ces traitements.⁸⁵ Malheureusement, les principaux marqueurs des concentrations en fer comme la ferritine ou la saturation de la transferrine ont été peu étudiés en médecine vétérinaire et sont connus comme étant peu sensibles et spécifiques.⁸⁵ La nécessité d'avoir recours à d'autres marqueurs du statut en fer est donc une nécessité.

Les premières études publiées en médecine humaine montrent que l'hepcidine est un excellent marqueur du statut en fer, significativement corrélé à la ferritine⁸¹ et aide à la différenciation des carences relatives en fer de celles qui sont réelles et responsables d'une anémie par carence en fer. L'identification d'un patient avec une hepcidine basse permet également d'espérer une meilleure réponse lors de supplémentation en fer. Le suivi des valeurs d'hepcidine pourrait également être un outil supplémentaire, permettant de suivre la réponse de l'organisme à une supplémentation en fer et guider ainsi la poursuite ou non de la supplémentation.⁸⁵ Des études contradictoires ont également montré que l'hepcidine pouvait participer au guidage de la supplémentation en EPO.^{81,86}

Dans un futur proche, il est possible que des antagonistes de l'hepcidine soient utilisés de façon courante dans la gestion des anémies de MRC, diminuant ainsi la séquestration du fer afin de le rendre disponible pour la moelle osseuse et ses fonctions erythropoïétiques, diminuant ainsi les besoins en rhEPO.⁸⁵ De nombreux groupes de recherche en médecine humaine s'intéressent activement à ces questions et des études sont en cours afin d'essayer de trouver un antagoniste de l'hepcidine utilisable en chez des patients en MRC. Des anticorps neutralisant l'hepcidine ont été utilisés avec succès dans un modèle murin in-vivo et ouvrent des perspectives intéressantes quand à son utilisation chez des patients humains et vétérinaires.

PARTIE II. ARTICLE SCIENTIFIQUE:

Acute phase proteins and iron status in feline chronic kidney disease

Acute phase proteins and iron status in feline chronic kidney disease

- In correction -

Romain Javard¹, DVM, DACVIM; Carolyn Grimes², DVM, DACVP; Liza Bau-Gaudreault², DMV; Marilyn Dunn¹, DVM, MSc, DACVIM

From the Companion Animal Research Group, Department of Clinical Sciences¹ and the Department of Pathology and Microbiology², Université de Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 7C6.

Address correspondence and reprint request to Dr. Romain Javard

Conflicts of interest, grants, acknowledgments: None

Previous presentation: 2014 ACVIM Forum; 2014 ACVP/ASVCP Annual Meeting

Study period: 2012-2015

Running head: APP and iron status in feline CKD.

Keywords: Serum amyloid A, hepcidin, erythropoietin, ferritin, anemia.

Abstract

Background: The role of inflammation in the development and progression of feline chronic kidney disease (CKD) is not well characterized. Hepcidin, a recently discovered acute phase protein (APP) is a key regulator of iron metabolism and contributes to the development of anemia in human patients with CKD.

Objectives: To compare plasma APP including hepcidin, iron status, and erythropoietin (EPO) concentrations between healthy and cats with naturally occurring CKD.

Animals: 18 healthy control cats, 38 cats with CKD,

Methods: Prospective, observational, control study. Complete physical examination along with hematology, biochemistry, serum amyloid A (SAA), haptoglobin (HAP), EPO, iron, TIBC, and ferritin were performed using routine laboratory analyzes and commercially available feline ELISA-assays. Hepcidin-25 concentration was assessed with a human ELISA kit (DRG® Diagnostics).

Results: Mean SAA and hepcidin concentration were significantly higher and mean total iron and TIBC were significantly lower in the CKD group ($P < .05$). There was a significant positive correlation between creatinine and APPs (SAA and hepcidin; $P < .05$). The increase in SAA and hepcidin was also significantly associated with a decrease of TIBC and PCV in the CKD group. The 14 (37%) anemic cats with CKD had significantly and lower iron, TIBC, consistent with functional iron deficiency ($P < .05$). There were no patients with an iron profile suggestive of a true iron deficiency. There was no association between survival and APP, EPO or iron changes.

Conclusions: Our data suggest that feline CKD is a pro-inflammatory state, having a significant impact on iron metabolism. With further validation, hepcidin may help better characterize these interactions.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) affects approximately 15 to 30% of geriatric cats¹⁻³ and the role of inflammation in the development and progression of the disease is not well characterized. In human patients, chronic inflammation and oxidative stress play a key role in the development and progression of CKD.⁷⁹ Elevated levels of positive acute phase proteins, such as C-reactive protein (CRP) and inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6, have been described in humans with CKD and are associated with a poor outcome.^{79,87} Anemia is also considered a negative prognostic factor in humans with renal failure and evidence suggests that the severity of anemia is directly related to the progression of the renal disease.^{5,6,88}

An estimated 30 to 65% of cats will develop anemia as their renal disease progresses.¹⁻³ Although there is no consensus regarding the relationship of anemia to prognosis in cats with CKD, however, it is generally accepted that anemia is associated with decreased immunity, the progression of disease due to hypoxic injury to the remaining renal tissue, poor body condition, and decreased the quality of life.^{2,5,7,8,10,11} The origin of anemia in CKD is multifactorial, explained principally by decreased production of erythropoietin (EPO) secondary to loss of functional renal mass. Decreased red blood cell lifespan secondary to accumulation of uremic toxins, gastrointestinal blood loss, and nutritional imbalances caused by decreased appetite are also thought to contribute.^{2,3,7,12,13} Data from human medicine indicate that alterations in iron metabolism caused by chronic inflammation and/or chronic GI blood loss may also contribute to the development of anemia in CKD.^{14,81} Hepcidin is a relatively recently discovered acute phase protein that is a key regulator of iron metabolism. Hepcidin downregulates the expression of the membrane iron transport protein ferroportin, thus limiting intestinal iron absorption and the

mobilization of intracellular iron stores.^{14,19,70,72,73} Heparin appears to be responsible for a functional iron deficiency through decreased EPO production and modifications of the interactions between EPO and progenitor cells.^{11,70} Plasma hepcidin is freely filtered through the glomerulus into the urine and, as with other filtered analytes, changes in the glomerular filtration rate (GFR) may affect plasma concentrations of hepcidin.^{73,81} Recent findings suggest that increased hepcidin in human patients with CKD may contribute to abnormal iron regulation and dyserythropoiesis, which have important implications for management of CKD.

The objectives of this study were to compare plasma hepcidin and other inflammatory markers, iron status, and plasma EPO concentrations between healthy cats and cats with CKD. We hypothesized that inflammatory markers would be increased in feline patients with CKD, relative to healthy controls and that inflammation would be associated with dysregulation of iron, anemia, and decreased survival time.

Materials & Methods

Cats that presented to the veterinary teaching hospital of the Université de Montréal between February 2013 and January 2015 were eligible for inclusion in the study. The Committee of ethics of the utilization of animals approved the study protocol, in accordance with Canadian Council of Animal Welfare guidelines, and owner consent was obtained prior to enrollment.

Patient selection

Based on history, physical examination, and clinicopathologic results, two groups were formed: a control group and a group with CKD. Cats that had both plasma creatinine concentration $>140 \mu\text{mol/L}$ at 2 sampling times and urine specific gravity ≤ 1.035 were included in the CKD group. The majority of these cats had been previously diagnosed and samples used in the study were collected during recheck appointments. Cats in the CKD group were then further divided into groups based on their International Renal Interest Society (IRIS) classification^a stage (either stage II (CKD-2), stage III (CKD-3), or stage IV (CKD-4)). The control group was composed of clinically healthy cats with a plasma creatinine concentration $\leq 140 \mu\text{mol/L}$ and a urine specific gravity > 1.035 . Patients were included only one time in the study and then followed during a variable period (6-36 months), depending on the moment of enrollment.

Cats were excluded from the study if they had received any form of iron supplementation (oral or parenteral) or a previous blood transfusion. Concurrent diseases were recorded but did not constitute exclusion criteria from the CKD group, unless evidence of acute kidney injury

(AKI; based on IRIS AKI classification^a) was present. Criteria used to diagnose AKI were acute onset of clinical signs and azotemia in a prior healthy cat, signs of acute tubular injury on urinalysis (eg, glucosuria, urinary casts), imaging findings compatible with AKI such as perirenal free fluid or enlarged kidneys, as well as absence of chronic changes or resolution or marked improvement of azotemia within 30 days of discharge (in survivors). Cats with known or suspected acute-on-chronic kidney disease were also excluded. Cats with plasma creatinine concentration $\leq 140 \mu\text{mol/L}$ and a urine specific gravity ≤ 1.035 (consistent with IRIS stage 1 classification) were excluded from the study. The outcome was assessed by a phone call at the end of the study period.

Blood sampling and laboratory evaluation

Blood was collected by jugular venipuncture (using 21G needles and 5mL syringes) and the following tests were done: complete hematology (ADVIA 120), routine biochemistry, iron testing and measurement of acute phase proteins. Immediately after centrifugation at 1,300g for 10 minutes at room temperature, plasma was separated, aliquoted into 1.5 ml Eppendorf tubes (REF) and stored at -80°C until analysis. The time between sampling and analysis was no more than 12 months; a first analysis was performed in the middle of the study period. Blood samples for iron analysis were submitted to Kansas State Veterinary Diagnostic Laboratory^b and included plasma ferritin, total iron binding capacity (TIBC) and total iron. Reference ranges for iron analysis were provided by the laboratory performing those tests and used to determine abnormal values in the present study. Serum amyloid A, haptoglobin (HAP), and erythropoietin (EPO) were measured with commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits^{c,d}, validated for use in cats. Each analysis was performed in duplicates, according to

the manufacturer's instructions. Hepcidin concentration was measured with a commercially available human sandwich ELISA kit^e.

Statistical analysis

Normality of the data was assessed with the Anderson-Darling test. The log base 10 transformation was used for non-normally distributed variables. An unequal-variance t-test was used to compare age and body mass between the two groups of cats (CKD and healthy). The same test was used to compare the mean between the two groups of cats for each biochemical variable. To compare the mean among the three CKD classes, the Welch's analysis of variance was used with CKD class as a between-subject factor taking into account unequal variances among classes. Tukey's posthoc tests were used to compare pairs of means after the anova. The Pearson's correlation was used to examine the linear relationship between pairs of biochemical variables. Cox's survival analysis was used to determine whether the concentration of various biochemical variables affected survival time. Actual death lags from the onset of the study or follow-up duration were used as estimates of survival. Follow-up duration was considered a censored event. In an attempt to better characterize the effect of CKD on the variables measured in a clinical situation, a secondary analysis was performed in which patients with evidence of other diseases than CKD based on history, physical exam and laboratory results; were excluded from this secondary statistical analysis. The level of statistical significance was set at 0.05. Statistical analyzes were carried out with SAS statistical software.^f

Results

Sixty-four cats were included in the study: 43 in the CKD group and 20 in the healthy (control) group. Seven cats were excluded: 5 in the CKD group (2 because of evidence of AKI; 3 because of incomplete data) and 2 in the healthy group (because of low USG). The remaining 56 cats (38 in the CKD group and 18 in the healthy group) were included in the final statistical analysis. All clinicopathologic parameters were available for the 56 cats except for EPO which was available for only 31 cats (20 in the CKD group and 11 in the healthy group). Cats in the CKD group were significantly older and weighed less than those in the healthy group (mean 11.3 years (+/- 4.5) and 4 kg (+/-1.42) in the CKD group vs 7 years (+/- 3.3) and 4.9 kg (+/- 1.5) in the healthy group [p = 0.002 and 0.046; respectively]). Twenty-six cats had CKD-2, seven cats had CKD-3, and five cats had CKD-4.

Acute phase proteins

Mean SAA concentration was significantly higher in the CKD group (8.1 µg/ml (+/-6.5)), compared with healthy cats (4.3 µg/ml (+/- 1.2); p=0.002; [Figure 1](#)). There was a significant positive correlation between plasma creatinine and SAA concentrations (p=0.02). Mean SAA concentrations were 7.7 µg/ml (+/-6.4) in cats with CKD-2, 5.1 µg/ml (+/- 2.1) in cats with CKD-3, and 14.1 µg/ml (+/- 8.1) in cats with CKD-4. There was no significant difference in SAA concentrations between CKD IRIS stages 2-4 (p=0.1). Increase in SAA concentrations in the CKD group was also significantly associated with increase in hepcidin concentrations (p=0.02) and decrease in PCV (p=0.02; [Figure 2](#))

Mean HAG concentration in the CKD group was 3.6 µg/ml (+/- 1.6), compared to 4.5 µg/ml (+/- 3.3) in healthy cats, but the difference was not significant (p=0.91). Increase in HAG concentrations in the CKD group was significantly associated with increase in ferritin (p=0.05) and decrease in hepcidin concentrations (p=0.05)

Mean hepcidin concentration was significantly higher in the CKD group (5 µg/ml (+/- 3.7)) relative to the healthy group (3.4 µg/ml (+/-2.3); p=0.046; [Figure 3](#)). There was a significant positive correlation between plasmatic creatinine and hepcidin concentrations (p=0.0008; [Figure 4](#)). Mean hepcidin concentrations in CKD subgroups were 4.2 µg/ml (+/- 3.2) (CKD-2), 6.1 µg/ml (+/- 4.7) (CKD-3), and 7.6 µg/ml (+/- 3.8) (CKD-4). There was no significant difference in hepcidin concentrations between these subgroups (p=0.12). Increase in hepcidin concentrations in the CKD group was also significantly associated with decrease in TIBC (p=0.02) increase in SAA concentrations (p=0.02) and decrease in PCV (p=0.02; [Figure 5](#)).

The 2 cats excluded because of AKI had among the most elevated values of APP (respectively >50 µg/ml and 51.9 µg/ml for SAA; 13.8 and 2.6 µg/ml for HAG; 11.9 and 11.7 ng/ml for hepcidin).

Iron Status

Mean plasmatic iron concentration was significantly lower in the CKD group: 85.5 µg/ml (+/- 32.9), compared to 100.7 µg/ml (+/- 21.7) in healthy cats (reference range 62-196 µg/ml; p=0.01; [Figure 6](#)). Nine cats in the CKD group (27%) had low iron concentrations (7/26 with CKD-2, 1/7 with CKD-3, and 2/5 with CKD-4) and one had high plasma iron concentration (178 µg/ml; CKD-2 group). None of the healthy cats had abnormal iron concentrations. There was a

significant positive correlation between iron concentrations and PCV in the CKD group ($p=0.03$; Figure 7).

Mean TIBC in the CKD group ($297.7 \mu\text{g/ml}$ (± 66.3)) was significantly lower, compared to healthy cats ($341.1 \mu\text{g/ml}$ (± 52); $p=0.01$; reference range $250\text{-}470 \mu\text{g/ml}$). Eleven cats in the CKD group (29%) had low TIBC (5/26 cats with CKD-2, 2/7 with CKD-3, and 4/5 with CKD-4) and none had high TIBC. None of the healthy cats had abnormal TIBC values. There was a significant negative correlation in the CKD group between TIBC and plasma creatinine concentration ($p=0.0008$; figure 8), a positive correlation with PCV ($p=0.03$) and a negative correlation with hepcidin concentration ($p=0.02$).

Mean ferritin concentration in the CKD group was $247.9 \pm 96 \mu\text{g/ml}$, compared to 274.2 ng/ml (± 75) in healthy cats (reference range $82\text{-}395 \text{ ng/ml}$), but the difference was not significant ($p=0.62$). Four cats in the CKD group (11%) had high ferritin concentrations (1/26 with CKD-2, 1/27 with CKD-3, and 1/5 with CKD-4) and none had low plasma ferritin concentration. Two healthy cats had low ferritin values (44 and 68 ng/ml). There was a significant positive correlation between plasma ferritin and HAG concentrations in the CKD group ($p=0.05$).

Among the nine cats with low iron concentrations, 3 had decreased TIBC and normal ferritin concentration and another one had decreased TIBC and increased ferritin, all changes consistent with a functional iron deficiency. There were three other cats with increased ferritin concentrations, normal TIBC, and low normal plasma iron concentrations, also consistent with functional iron deficiency. The other 5 cats with low iron concentrations had normal ferritin and

TIBC levels. None of the cats had decreased ferritin levels or increased TIBC, findings that could suggest a true iron deficiency.

Effect of anemia

There were 14 (37%) anemic patients in the CKD group. Mean PCV was significantly decreased in the CKD group: 29.4% (+/-7.7), compared to 41.2% (+/-3.7) in healthy cats ($p=0.001$). Thirteen cats (34%) in the CKD group had low PCV values (6/26 with CKD-2, 3/7 with CKD-3, and 5/5 with CKD-4). None of the healthy cats were anemic. There was a significant negative correlation between plasma creatinine concentration and PCV ($p<0.0001$, [Figure 9](#)) in the CKD group and cats with CKD-4 had significantly lower PCV values compared to cats with CKD-3 and CKD-2 ($p=0.01$). In the CKD group, anemic cats had significantly higher creatinine values compared to non-anemic cats ($p<0.0001$), higher SAA concentrations ($p=0.0003$), lower iron concentrations ($p=0.04$) and lower TIBC ($p=0.01$; [Figure 10](#)). There was no significant difference between anemic and non-anemic cats for hepcidin ($p=0.07$) and ferritin concentrations ($p=0.09$).

Erythropoietin

For the 31 cats in which EPO concentration was available, there was no significant difference between EPO concentration in the CKD group (mean values 0.09 UI +/- 0.05) compared with healthy cats (mean values 0.092 UI +/- 0.05; $p=0.69$). There was no significant difference in EPO concentrations between CKD IRIS stages 2-4 ($p=0.63$). However, anemic cats in the CKD group had significantly lower EPO concentrations compared to non-anemic of the CKD group or compared to healthy cats ($p=0.02$; [Figure 11](#))

Effect of concomitant diseases

There were 13 cats (34%) in the CKD group with evidence of concomitant disease, including six patients with urolithiasis including 4 with ureteroliths that were previously treated with subcutaneous ureteral bypass (SUB) or ureteral stenting and two with non-obstructive kidney stones; three with confirmed cardiac disease (two hypertrophic cardiomyopathy and one pericardial effusion); three with neoplasia (colonic carcinoma, soft tissue sarcoma, and cutaneous lymphoma); two with inflammatory bowel disease; one with feline asthma; and one with hyperthyroidism. Three cats had ≥ 2 concurrent diseases. After removing patients with evidence of concomitant disease in the CKD group for the secondary analysis, patients with CKD still showed significantly higher hepcidin concentrations ($p=0.047$), and significantly lower TIBC ($p=0.002$), compared to healthy cats. The difference in iron ($p=0.06$) and SAA ($p=0.06$) concentrations was no longer significant.

Survival analysis

Follow-up information was available for all 56 cats and ranged from 6 months to 2 years, depending on the time of inclusion. There was no significant relationship between survival time and creatinine concentration, EPO concentration, iron parameters, APP (including hepcidin) concentrations, or the presence of concomitant disease.

Discussion

The aim of the present study was to better understand the role of inflammation in feline chronic kidney disease and assess its impact on iron metabolism, development of anemia and on survival. We found that cats with CKD had significantly increased concentrations of two different acute phase proteins (SAA and hepcidin), suggesting that, as in humans, feline CKD may be a pro-inflammatory state. Plasma APPs are produced in response to both acute and chronic inflammatory conditions and are increasingly used in the assessment of human and animal health to monitor inflammatory processes for diagnostic, prognostic and therapeutic purposes.^{49,50,89} SAA, a plasma precursor of amyloid protein A, is one of the major feline APP. In our study, mean SAA concentration was significantly higher in the CKD group, relative to healthy controls. The difference between the different stages of CKD was not significant, however, the low number of patients in each group may have limited detection of a significant difference. Increased SAA concentrations have previously been demonstrated in cats with renal diseases, but that study was not limited to patients with CKD. Interestingly, the 2 cats excluded in our study because of suspected pyelonephritis had the most elevated values of APP, as previously demonstrated with various infectious diseases.^{42,60,71} To our knowledge, this is the first study demonstrating an association between feline CKD and a pro-inflammatory state. The presence of a positive correlation between plasma creatinine concentrations and certain APP indicates that more advanced CKD may be associated with more severe inflammation. The association between inflammation and CKD is well known in human medicine and is gaining increasing attention as a major cause of morbidity and mortality in end-stage renal disease.⁹⁰ Uremia is recognized as an inflammatory state, with some patients showing considerable increases in biomarkers of

inflammation and immune activation. Many patients with uremia show significant increases in pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-12, and soluble IL-2 receptors compared with healthy controls.⁹¹ Elevated levels of pro-inflammatory cytokines in CKD are associated with poor outcomes and IL-6 is a strong predictor of outcome in hemodialysed patients.⁹² Further research is needed in veterinary medicine to determine if APP has similar prognostic value, but no association between APP and survival was found in the present study. Targeting inflammation constitutes a new therapeutic approach in human CKD and different strategies, such as nutritional changes, omega-3 supplementation, nonspecific immunomodulation, and targeted anticytokine interventions (e.g., IL-1rA) are being used.⁷⁹ In dogs, the use of n-3 PUFA to provide an n-6/n-3 ratio of approximately 5:1 slowed the rate of decline of GFR and reduced the severity of proteinuria, glomerulosclerosis, and interstitial fibrosis.⁸ However, there is no evidence that such therapy may improve survival in feline CKD.

Another finding of this study is that feline CKD is associated with changes in iron status. Iron is an essential element for all living organisms. It is a key functional component of oxygen transport and storage molecules (eg, hemoglobin and myoglobin) and of many enzymes that catalyze the redox reactions required for the generation of energy (eg, cytochromes), the production of various metabolic intermediates, and host defense. Humans and other vertebrates strictly conserve iron by recycling it from senescent erythrocytes and from other sources.^{11,19} It is generally accepted that iron deficiency contributes to the anemia of CKD in humans and iron supplementation is routinely used to treat anemia in these patients. However, there is little evidence regarding iron status in feline CKD⁹³ and the use of iron supplementation must be considered judiciously, as inappropriate use could have deleterious effects associated with iron overload.⁸¹ We found that patients with CKD had significantly decreased plasma iron

concentration and TIBC. TIBC measures the blood's ability to bind iron and is, thus, an indirect measure of transferrin concentration. Transferrin is a negative APP and a decrease in TIBC is thus expected in an inflammatory state. This change may represent a functional adaptation to chronic inflammation, participating in iron sequestration in the reticuloendothelial (RES) cells.⁹⁴ Decreased plasma iron concentration in CKD patients (as seen in the feline CKD patients of our study) may be due to gastrointestinal hemorrhage and reduced intestinal absorption or intake, or may represent a functional iron deficiency due to sequestration of iron in storage pools.^{2,94} Differentiation between true and functional iron deficiency can be difficult. True iron deficiency is characterized by low plasma iron and ferritin concentrations and increased TIBC, whereas, in cases of functional iron deficiency, ferritin concentrations may be normal or above the reference interval, whereas plasma iron concentrations and TIBC should be below the reference interval.^{2,94} In the present study, there was no significant difference in ferritin levels between healthy cats and cats with CKD, but the significantly decreased total iron concentration combined with low TIBC observed in the CKD-group is most consistent with functional iron deficiency, and this is supported by the absence of hypoferritinemia among CKD cats. In the present study, there were no patients with an iron profile suggestive of a true iron deficiency, however, 14 cats (37%) in the CKD group had decreased TIBC and/or increased ferritin, and 4 of these had low iron concentrations, consistent with a functional iron deficiency. We also observed a significant association between markers of iron homeostasis and APP as an increase in haptoglobin was significantly associated with increased ferritin concentration and increased hepcidin was significantly associated with decreased TIBC. Some APP seems to play an important role in iron sequestration. For example, one of the effects of haptoglobin in infected wounds is to bind hemoglobin, limiting the availability of hemoglobin iron for bacterial growth.⁵⁰ It is known that infectious and inflammatory diseases induce iron sequestration in macrophages to avoid its use

by invading bacteria and decrease iron absorption in the small intestine, eventually leading to the development of anemia of inflammation.⁷⁰ In the present study, there was a significant negative correlation between plasma creatinine concentration and TIBC ($p=0.0008$), suggesting that the severity of CKD may be associated with increased iron sequestration. However, true iron deficiency has been described in patients with CKD, underlying the importance of assessing iron status in individual patients with CKD, in order to appropriately determine the appropriateness of iron supplementation. In people with CKD, the two most commonly used markers of iron status, transferrin saturation, and ferritin, lack sufficient sensitivity and specificity to predict a response to iron supplementation.⁸⁵ Given these limitations, hepcidin has emerged as a key regulator of iron homeostasis that may be used to better target iron therapy in patients with CKD.⁸¹

In this study, the mean value of hepcidin in cats with CKD was significantly higher than that of healthy cats. The connection between hepcidin and iron metabolism was first made by Pigeon et al during studies of the hepatic response to iron overload.⁹⁵ Fleming and Sly proposed that hepcidin was the long-anticipated iron regulatory hormone and raised the possibility that overproduction of hepcidin during infection and inflammation may be responsible for the anemia of inflammation.⁹⁶ Hepcidin's known biological functions are mediated by its binding to ferroportin, the principal cellular iron efflux channel. Once hepcidin is bound, it causes the rapid internalization and degradation of ferroportin.⁹⁷ In the case of duodenal enterocytes, hepcidin prevents the movement of dietary iron through ferroportin into circulation. In macrophages and hepatocytes, hepcidin similarly sequesters iron such that it is biologically unavailable. This rapid sequestration of iron in macrophages and long-term decrease of intestinal iron absorption eventually lead to anemia by decreasing iron availability for erythropoiesis.

In the present study, we found that increased hepcidin concentration in the CKD group was significantly associated with increased SAA concentration ($p=0.02$). Previous studies revealed that hepcidin correlated with C-reactive protein (CRP) in humans. It is known that hepcidin synthesis is up-regulated by inflammation, a relationship that appears to be mediated by IL-6.⁹⁸ Since our data support that CKD is an inflammatory state, this positive correlation is expected. Given our exclusion criteria (patients with active infectious disease and AKI), we may have selected patients with lower hepcidin concentrations. Using the same competitive ELISA assay as in the present study, it has been demonstrated that plasma hepcidin is elevated in pediatric and adult patients with stages 2 through 4 CKD and in pediatric peritoneal dialysis patients compared with respective controls.⁹⁹ Multivariate analysis showed that hepcidin was inversely correlated with GFR in adults with stages 2 through 4 CKD and was independently predicted by dialysis status, ferritin, and CRP, suggesting that inflammation may also upregulate hepcidin levels in CKD, as in the present study.⁸¹ In the majority of CKD studies, hepcidin correlates very well with ferritin, which is both a measure of iron stores and an acute-phase reaction.^{70,100} In the present study, in addition to being positively associated with SAA, increased hepcidin was associated with decreased TIBC ($p=0.02$) and decreased PCV ($p=0.02$). We also found that increased SAA concentrations in the CKD group were significantly associated with increased hepcidin concentrations ($p=0.02$) and decreased PCV ($p=0.0002$), suggesting that patients with elevated SAA concentrations may have also higher hepcidin levels and are more prone to developing anemia. It, therefore, appears that, as in human studies, diminished renal clearance and increased inflammation in the setting of renal failure contribute to elevated plasma hepcidin concentrations in feline patients with CKD which likely impact iron homeostasis and contribute to the development of anemia.

In the present study, anemic cats had significantly higher SAA concentrations ($p=0.0003$), lower iron concentrations ($p=0.04$) and lower TIBC ($p=0.01$) compared to non-anemic and healthy cats. Several mechanisms have been proposed to explain anemia in patients with CKD, including decreasing EPO production, intestinal bleeding, impaired iron metabolism, malnutrition and suppression of bone marrow responsiveness and erythropoietin production. Chronic inflammation likely also contributes to anemia in patients with CKD.⁹⁰ Our study showed a significant positive relationship between TIBC and PCV in cats with CKD, and also between iron concentration and PCV, indicating that cats with low iron concentrations and high TIBC levels are at greater risk of developing anemia. Some authors argue that anemia may be one of the many links between raised pro-inflammatory cytokines and poor outcomes in renal patients.⁹⁰ Thus, minimizing inflammation and its consequences could be an effective strategy to reduce anemia in CKD patients.⁹⁰

Limited data are available regarding EPO concentrations in feline CKD. We found that anemic cats with CKD had significantly lower EPO concentrations, compared to non-anemic cats with CKD and healthy cats ($p=0.02$). In the present study, EPO concentration was not significantly associated with APP but a strong trend was observed with HAG ($p=0.07$). This may have resulted from a type-II error, as EPO was assessed in only half of cats in the CKD group. Erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) have revolutionized the treatment of anemia in chronic kidney disease (CKD). However, some patients with uremia show resistance to rHuEPO, possibly because of high levels of immune activation, causing increased release of pro-inflammatory cytokines by the bone marrow.⁹¹ It was demonstrated that patients with CKD having higher CRP concentrations required higher doses of rHuEPO to manage their anemia and many authors recommend increasing the rHu-EPO dose by 30-70% to achieve target haemoglobin levels in

iron-replete patients with inflammation.¹⁰¹ Strategies utilizing anti-cytokine therapy may prove to be a useful adjuvant in optimizing the response to rHuEPO therapy.⁹¹ It is not known if cats with low EPO in our study would have required higher EPO supplementation but the relationship between EPO concentration, inflammation and iron status in the feline CKD population warrants further investigation. Ashby *et al.* also noted a negative correlation between hepcidin and rhEPO dosage, suggesting that rhEPO suppressed hepcidin, a finding supported after observing decreased hepcidin levels after initiation of rhEPO in seven ESA-naive patients.⁸⁶ Thus, in the future, hepcidin assessment in feline CKD patients could be useful to predict and monitor responsiveness to ESA therapy.

The present study has several limitations. First, the hepcidin ELISA assay used was developed for use in humans and has not been validated in cats. However, human and feline hepcidin share a relatively high (80%) homology and the results obtained in our CKD patients relative to healthy controls are compatible with the known biological behavior of hepcidin in humans, giving credence to the relationships suggested. It is interesting that the absolute values of hepcidin may vary as much as 10-fold depending on the hepcidin assay used.^{81,85} Possible reasons for such wide ranges include hepcidin-binding factors in the plasma, differing hepcidin standards, cross-reaction with hepcidin metabolites, and hepcidin adsorption by assay surfaces. Efforts are being undertaken to resolve these discrepancies and provide standardization to hepcidin assays. We chose to assess SAA and HAG as being two common feline APPs, but other proteins like alpha-1-glycoprotein could also have been measured and may have provided complementary data. Further limitations of the study are the small number of animals included, especially in the more advanced CKD IRIS stages. Moreover, it remains unclear how much concomitant disease conditions may have influenced our results. We aimed to assess a population of cats with CKD in

a clinical situation and, as CKD often affects geriatric patients, many of our cats had concurrent diseases. An attempt was made to eliminate this effect by removing patients with evidence of concomitant diseases in the CKD group during the secondary analysis. Finally, the etiology of CKD was not determined for individual patients, as we did not perform histopathological analysis of kidney biopsies and imaging studies were not standardized. Because the definitive test to differentiate AKI from CKD is renal histopathology, it is possible that some cats might have been falsely classified.

Conclusion

To conclude, our data suggest that feline CKD is a pro-inflammatory state associated with an increase in acute phase proteins. We showed that feline CKD is associated with changes in iron stores and found a relatively high incidence of functional iron deficiency, consistent with changes observed in human inflammatory diseases. We suggest that iron status should be assessed in order to determine the true necessity of iron supplementation in individual patients. Moreover, as inflammation appears to play an important role in feline CKD, further research regarding new therapeutic approaches targeting inflammation appears warranted. With further validation, hepcidin may become an important biomarker of iron status in feline CKD. In the future, development of a hepcidin antagonist could be an important therapeutic tool in the treatment of CKD-associated anemia. Specifically, lowering hepcidin levels or antagonizing its actions could reverse the negative effects of inflammation on erythropoiesis by allowing mobilization of stored iron and improved enteral iron absorption.⁸⁵

Footnotes

^a <http://www.iris-kidney.com>

^b Kansas State Veterinary Diagnostic laboratory. Kansas State University College of veterinary Medicine. Manhattan, KS.

^c SAA ELISA kit/Haptoglobin ELISA kit “Tridelta Development Limited”.

^d Erythropoietin ELISA kit.

^e DRG Heparin-25 bioactive ELISA kit, 96T.

^f SAS statistical software v9.4 (Cary, N.C.).

Figures

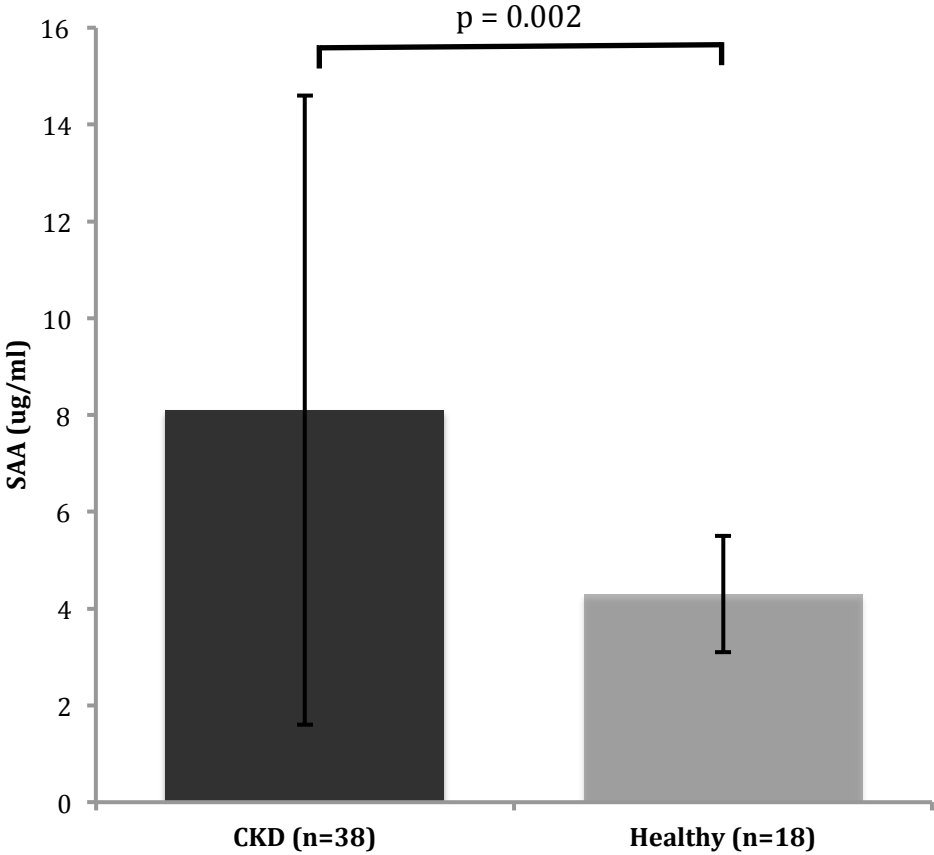


Figure 1. Serum Amyloid A concentration in healthy cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

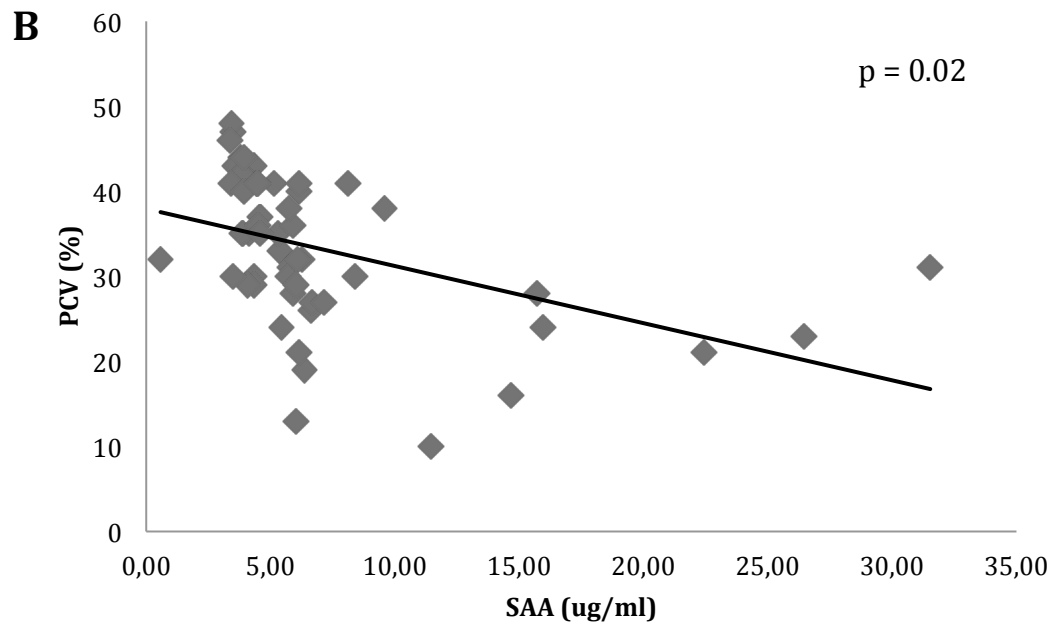
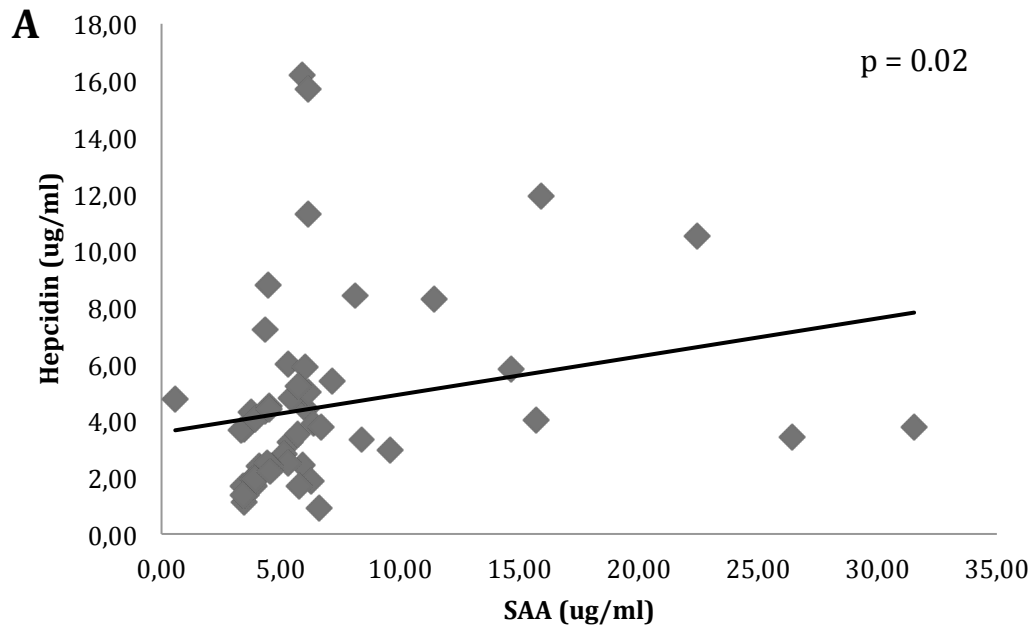


Figure 2: A. Correlation between plasma serum amyloid A (SAA) and plasma hepcidin. ($r=0.31$).

B. Correlation between plasma SAA and packed cell volume; PCV ($r=-0.49$).

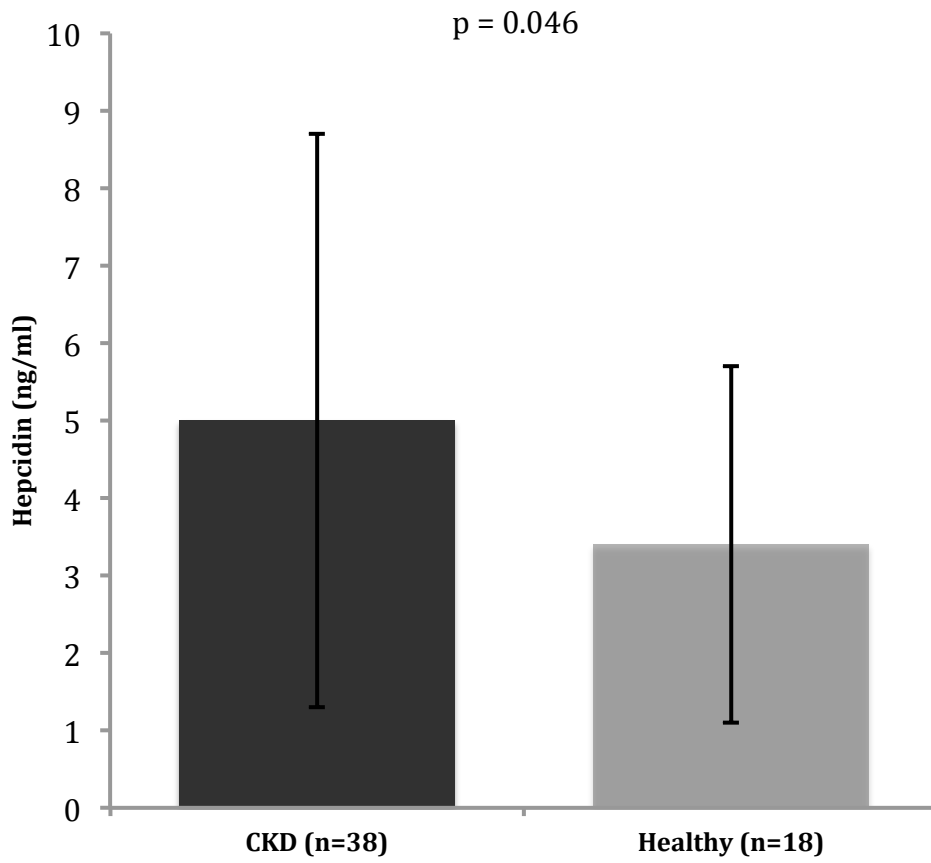


Figure 3. Hepcidin concentration in healthy cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

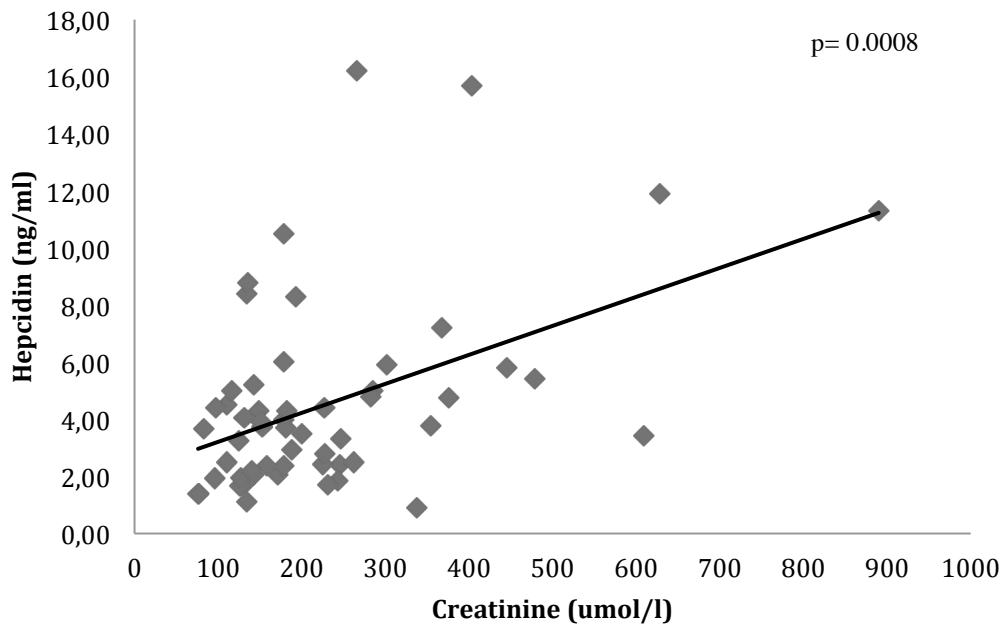


Figure 4. Correlation between plasma creatinine and hepcidin concentrations ($r=0.46$).

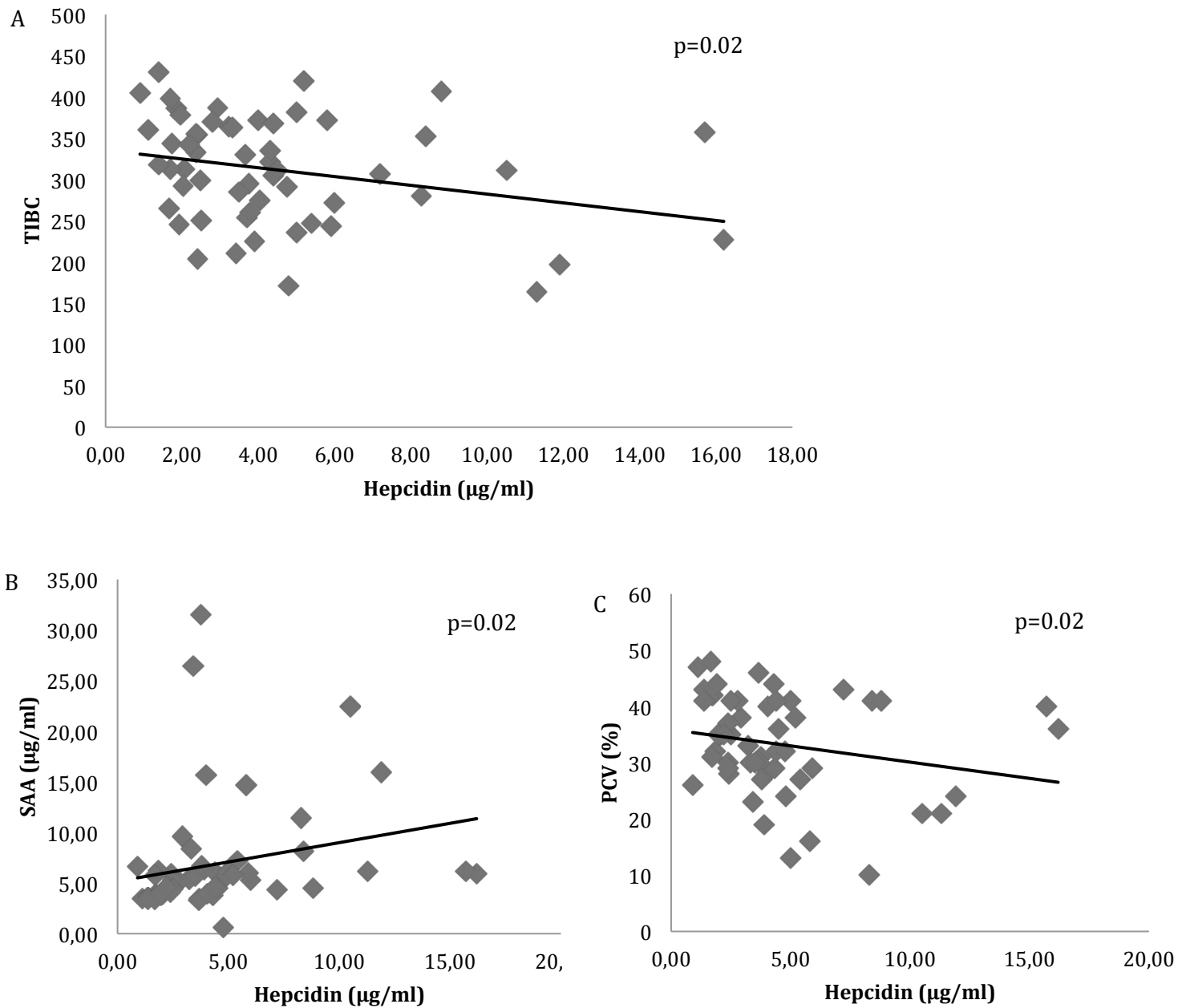


Figure 5. A. Correlation between plasma hepcidin and total iron binding capacity; TIBC ($r=-0.32$). B. Correlation between plasma hepcidin and serum amyloid A ($r=0.32$). C. Correlation between plasma hepcidin and packed cell volume; PCV ($r=-0.32$).

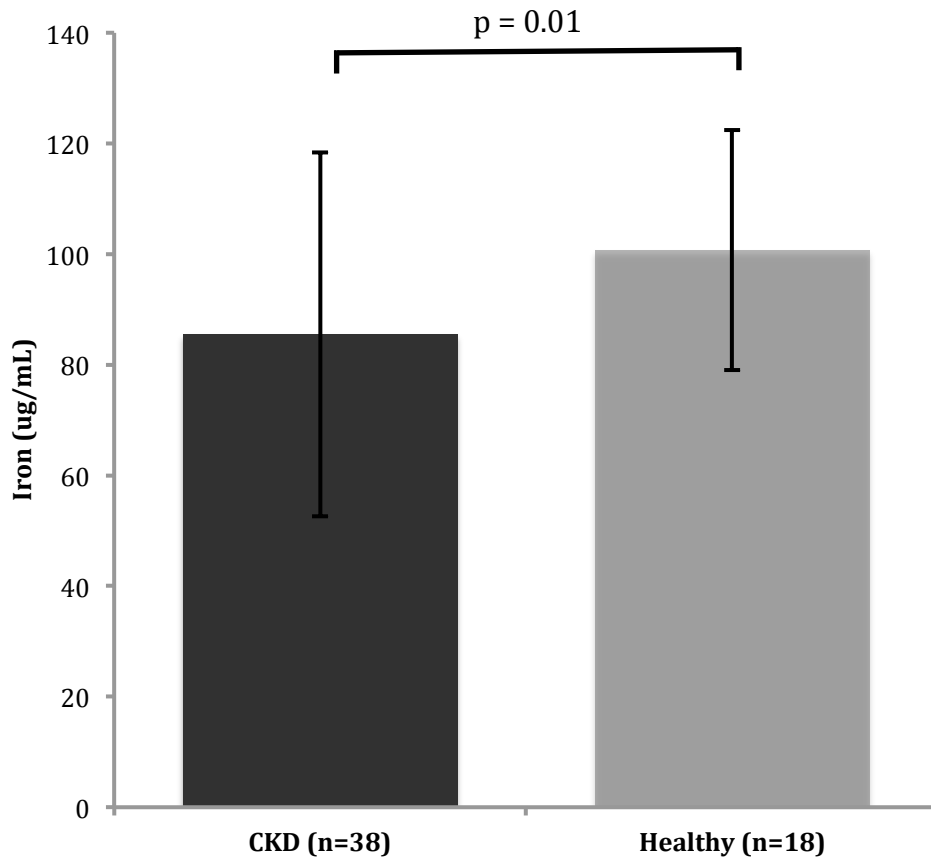


Figure 6. Mean iron concentration in healthy cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

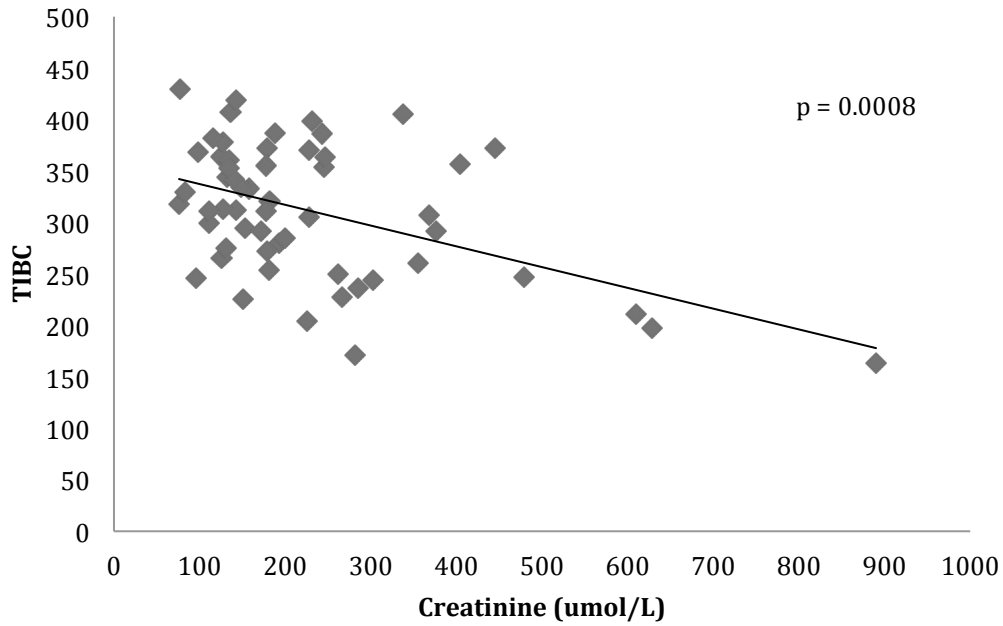


Figure 7. Correlation between plasma creatinine and total iron binding capacity; TIBC ($r=-0.44$)

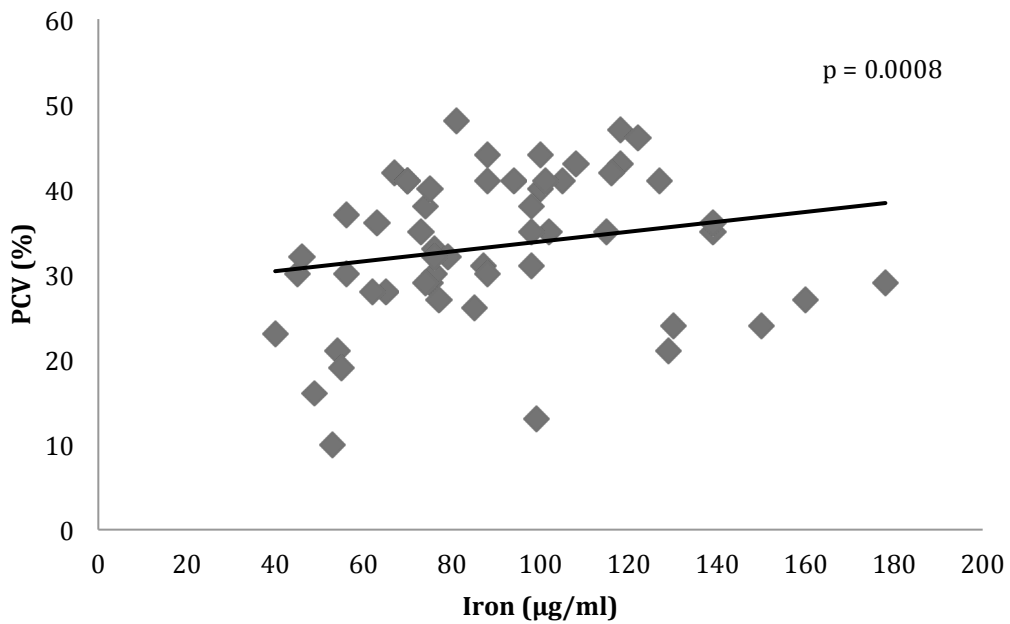


Figure 8. Correlation between plasma iron and packed cell volume; PCV ($r=0.29$)

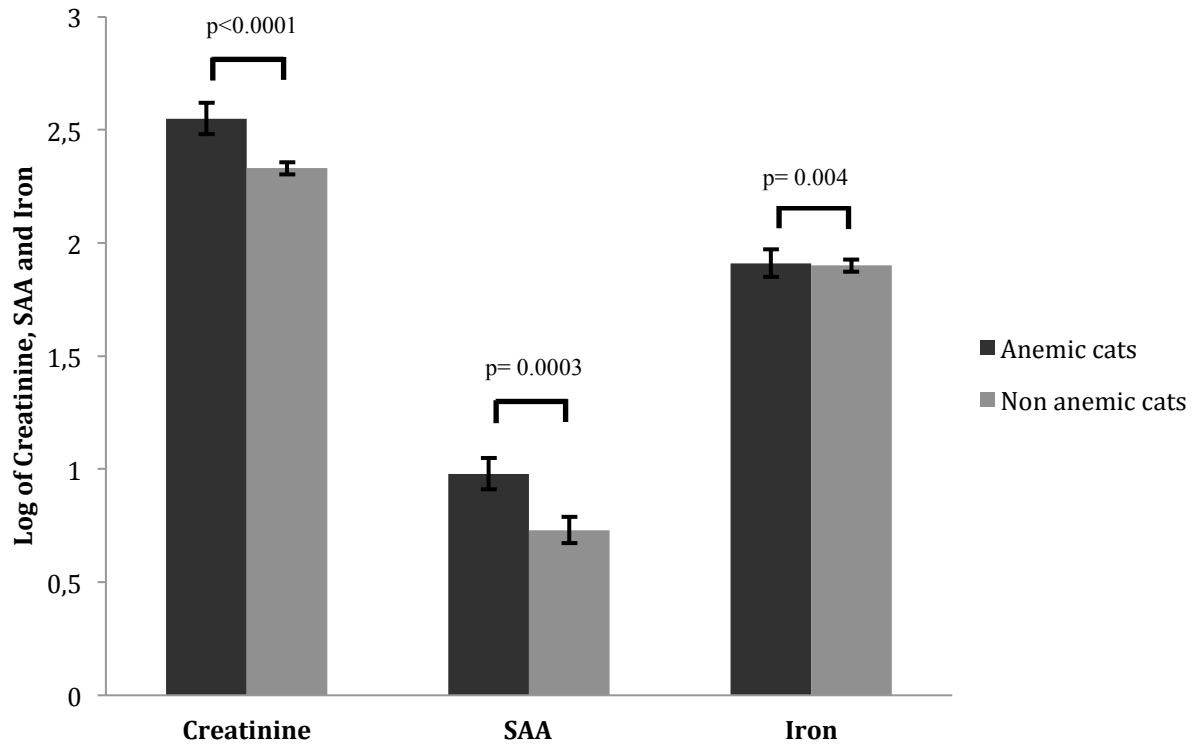


Figure 9. Log of creatinine, serum amyloid A and iron concentration in anemic and non-anemic cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

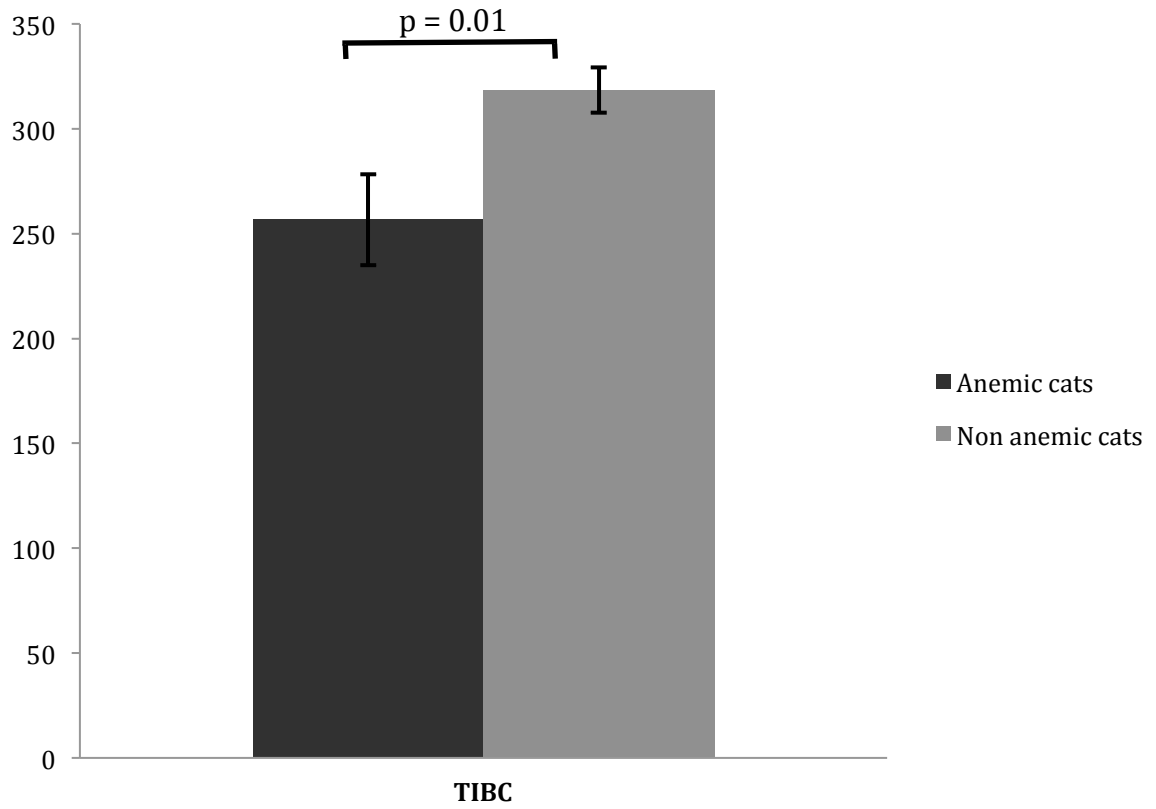


Figure 10. Total iron binding capacity (TIBC) in anemic and non-anemic cats and in the chronic kidney disease (CKD) group (mean +/- sd).

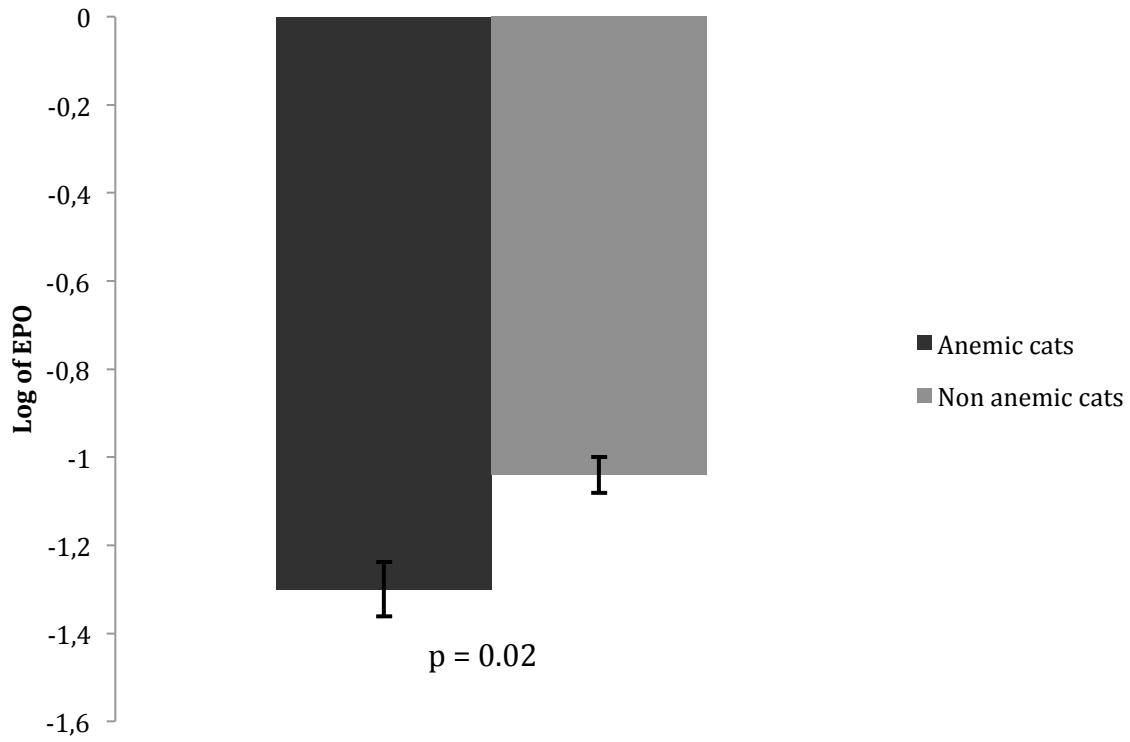


Figure 11. Log of erythropoietin (EPO) concentration in anemic and non-anemic cats and in the CKD group (mean +/- sd).

References

1. Lulich JP, Osborne CA, O'Brien TD, Polzin DJ. Feline renal failure: questions, answers, questions. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. 1992 Feb 1;v. 14(2) p. 127-153 (21 p. not consecutive).
2. Chalhoub S, Langston CE, Eatroff A. Anemia of renal disease. *Journal of Feline Medicine & Surgery*. 2011 Sep;13(9):629–40.
3. Cowgill LD. Pathophysiology and manageme... [Semin Vet Med Surg (Small Anim). 1992] - PubMed - NCBI. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small 1992*.
4. Elliott J, Barber PJ. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *Journal of Small Animal Practice*. 1998 Feb;39(2):78–85.
5. King JN, Tasker S, Gunn-Moore DA, Strehlau G. Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2007 Sep;21(5):906–16.
6. THORP ML, JOHNSON ES, YANG X, PETRIK AF, PLATT R, SMITH DH. Effect of anaemia on mortality, cardiovascular hospitalizations and end-stage renal disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrology*. 2009 Mar;14(2):240–6.
7. Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012 Jul;42(4):669–92–vi.
8. Brown SA. Oxidative Stress and Chronic Kidney Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2008 Jan;38(1):157–66.
9. González FF, Fuentes CV, Castro HC. Economic impact of Losartan use in type 2 diabetic patients with nephropathy]. *Revista médica de 2009*.
10. Hoerger TJ, Wittenborn JS, Segel JE, Burrows NR, Imai K, Eggers P, et al. A health policy model of CKD: 1. Model construction, assumptions, and validation of health consequences. *Am J Kidney Dis*. 2010 Mar 1;55(3):452–62.
11. Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword - Weiss - 2002 - *European Journal of Clinical Investigation* - Wiley Online Library. *European journal of clinical investigation*. 2002.
12. Caride VJV. Occult gastrointestinal bleeding. *The New England journal of medicine*. 1999 Nov 4;341(19):1477–8.
13. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2011 Jan;41(1):15–30.
14. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of Chronic Disease. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):1011–23.

15. Zaritsky J, Young B, Wang H-J, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hcpidin—A Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the ...* 2009.
16. Małyszko J, Małyszko JS, Hryszko T, Pawlak K, Mysliwiec M. Is hepcidin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol.* 2005 Nov;25(6):586–90.
17. Paubelle É, Herbaux C. *John Libbey Eurotext : Éditions médicales et scientifiques France : revues, médicales, scientifiques, médecine, santé, livres. Hématologie.* 2013.
18. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. Hcpidin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am J Hematol.* 2006;81(11):832–7.
19. Andrews NC. Disorders of Iron Metabolism — *NEJM.* *N Engl J Med.* 1999.
20. Alvarez-Hernández X, Licéaga J, McKay IC, Brock JH. Induction of hypoferrremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest.* 1989 Sep;61(3):319–22.
21. Andrews NC. The iron transporter DMT1. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 1999.
22. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood.* 2003 May 15;101(10):4148–54.
23. RT M Jr. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep.* 2003 Mar 1;2(2):116–21.
24. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clinica Chimica Acta.* 2003.
25. MA JZ, EBBEN J, XIA H, COLLINS AJ. Hematocrit Level and Associated Mortality in Hemodialysis Patients. *Journal of the American Society ...* 1999.
26. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, et al. The Effects of Normal as Compared with Low Hematocrit Values in Patients with Cardiac Disease Who Are Receiving Hemodialysis and Epoetin. *N Engl J Med.* 1998. 27;339(9):584–90.
27. Teehan GS, Bahdouch D, Ruthazer R, Balakrishnan VS, Snyderman DR, Jaber BL. Iron Storage Indices: Novel Predictors of Bacteremia in Hemodialysis Patients Initiating Intravenous Iron Therapy. *Clinical infectious ...* 2004.
28. Kletzmayer J. High dose intravenous iron: a note of caution. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002 Jun 1;17(6):962–5.

29. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*. American Society of Hematology; 2000 Aug 1;96(3):823–33.
30. IV. NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease: update 2000. *American Journal of Kidney Diseases*. 2001. pp. S182–238.
31. Rizzo JD. Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. *Blood*. American Society of Hematology; 2002 Aug 29;100(7):2303–20.
32. Auerbach M. Intravenous Iron Optimizes the Response to Recombinant Human Erythropoietin in Cancer Patients With Chemotherapy-Related Anemia: A Multicenter, Open-Label, Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Feb 23;22(7):1301–7.
33. JL S. Iron and the anemia of chronic disease. *Oncology (Williston Park)*. 2002 Sep 1;16(9 Suppl 10):25–33.
34. SULLIVAN JL. Iron therapy and cardiovascular disease. *Kidney Int*. 1999 Mar;55:S135–7.
35. M Reyes GI. Iron loading and disease surveillance. *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention; 2001;7(1):164.
36. Means RT. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep*. 2003 Mar;2(2):116–21.
37. Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol*. 1995 Jan;162(1):134–8.
38. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF, et al. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):1085–92.
39. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res*. 1998 Aug;18(8):555–9.
40. Means RT, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by interferons alpha and beta: differing mechanisms despite shared receptor. *Exp Hematol*. 1996 Feb;24(2):204–8.
41. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. ... *England Journal of* 1990.
42. Paltrinieri S. The feline acute phase reaction. *Vet J*. 2008 Jul;177(1):26–35.

43. Kipar A, Leutenegger CM, Hetzel U, Akens MK, Mislin CN, Reinacher M, et al. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001 Feb;78(3-4):305–15.
44. Kipar A, Meli ML, Failing K, Euler T. Natural feline coronavirus infection: Differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Veterinary immunology* 2006.
45. Dean GA, LaVoy A, Yearley J, Stanton C. Cytokine Modulation of the Innate Immune Response in Feline Immunodeficiency Virus–Infected Cats. *J INFECT DIS*. 2006 Jun;193(11):1520–7.
46. Kipar A, Baptiste K, Meli ML, Barth A, Knietzsch M. Age-related dynamics of constitutive cytokine transcription levels of feline monocytes. *Experimental* 2005.
47. Otto CM, Rawlings CA. Tumor necrosis factor production in cats in response to lipopolysaccharide: an in vivo and in vitro study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1995 Nov;49(1-2):183–8.
48. Cecilian F, Giordano A, Spagnolo V. The Systemic Reaction During Inflammation: The Acute-Phase Proteins. *PPL*. 2002 Jun 1;9(3):211–23.
49. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res. EDP Sciences*; 2004 Mar;35(2):163–87.
50. Ceron JJ, Eckersall PD, Martı́nez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005 Jun;34(2):85–99.
51. Brazzell JL, Borjesson DL. Evaluation of plasma antithrombin activity and D-dimer concentration in populations of healthy cats, clinically ill cats, and cats with cardiomyopathy. *Vet Clin Pathol*. 2007 Mar;36(1):79–84.
52. Rossbacher J, Wagner L, Pasternack MS. Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol*. 1999 Oct;50(4):399–404.
53. Gruys E, Toussaint MJM, Upragarin N, Van EAM, Adewuyi AA, Candiani D, et al. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005 Oct;6(10):941–7.
54. Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary Hematology*. John Wiley & Sons; 2011. 1 p.
55. Cerón JJ, Eckersall PD, Martı́nez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005 Jun;34(2):85–99.
56. Eckersall PD, Duthie S, Safi S, Moffatt D, Horadagoda NU, Doyle S, et al. An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin.

Comp Haematol Int. Springer-Verlag; 1999 Sep;9(3):117–24.

57. Bence LM, Addie DD, Eckersall PD. An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol*. 2005 Dec;34(4):335–40.
58. Hansen AE, Schaap MK, Kjelgaard-Hansen M. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidimetric immunoassay for determination of feline SAA concentration. *Vet Res Commun*. 2006 Nov;30(8):863–72.
59. Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S. Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *The Veterinary Journal*. 2004 Jan;167(1):38–44.
60. SASAKI K, MA Z, KHATLANI TS, OKUDA M, INOKUMA H, ONISHI T. Evaluation of Feline Serum Amyloid A (SAA) as an Inflammatory Marker. *J Vet Med Sci*. 2003;65(4):545–8.
61. DiBartola SP, REITER JA, CORNACOFF JB, KOCIBA GJ, BENSON MD. Serum Amyloid a Protein-Concentration Measured by Radial Immunodiffusion in Abyssinian and Non-Abyssinian Cats. *American Journal of Veterinary Research*. 1989 Aug;50(8):1414–7.
62. Logdberg L, Wester L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):284–97.
63. Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate Journal*. Kluwer Academic Publishers; 1997;14(5):569–76.
64. Correa SS, Mauldin GN, Mauldin GE, Mooney SC. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2001 Mar 1;37(2):153–8.
65. Stoddart ME, Whicher JT, Harbour DA. Cats inoculated with feline infectious peritonitis virus exhibit a biphasic acute phase plasma protein response. 1988.
66. Paltrinieri S, Metzger C, Battilani M, Pocacqua V. Serum α 1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *Journal of Feline ...* 2007.
67. Duthie S, Eckersall PD, Addie DD, Lawrence CE, Jarrett O. Value of 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Veterinary Record*. 1997 Sep 20;141(12):299–303.
68. S Paltrinieri FCVPAMRMEGAG. Correlation between coronaviral burden and qualitative changes of serum alpha-1-acid glycoprotein. *European colloquium of ...* null; 2006;51–1.

69. Schwegmann-Weßels C, Herrler G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconjugate Journal*. 2006 Feb;23(1-2):51–8.
70. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):783–8.
71. Kann RKC, Seddon JM, Henning J, Meers J. Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Res Vet Sci*. 2012 Oct;93(2):649–54.
72. Dec GW. Anemia and iron deficiency—new therapeutic targets in heart failure. *N Engl J Med*. 2009.
73. Grimes CN, Giori L, Fry MM. Role of hepcidin in iron metabolism and potential clinical applications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012 Jan;42(1):85–96.
74. Hadley KB, Johnson L, Hunt JR. Iron absorption by healthy women is not associated with either serum or urinary prohepcidin. 2006.
75. Tomosugi N. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood*. American Society of Hematology; 2006 Aug 15;108(4):1381–7.
76. Weizer-Stern O, Adamsky K, Margalit O, Ashur-Fabian O, Givol D, Amariglio N, et al. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53. *British Journal of Haematology*. 2007 Jul;138(2):253–62.
77. Nangaku M. Chronic Hypoxia and Tubulointerstitial Injury: A Final Common Pathway to End-Stage Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005 Nov 16;17(1):17–25.
78. Fine LG, Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2008 Jul 16;74(7):867–72.
79. Impellizzeri D, Esposito E, Attley J, Cuzzocrea S. Targeting inflammation: New therapeutic approaches in chronic kidney disease (CKD). *Pharmacol Res*. 2014 Mar;81C:91–102.
80. Nemeth E. Targeting the Hepcidin-Ferroportin Axis in the Diagnosis and Treatment of Anemias. *Advances in Hematology*. Hindawi Publishing Corporation; 2010;2010(2):1–9.
81. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hepcidin--A Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Jun 3;4(6):1051–6.
82. Kulaksiz H. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *Journal of Endocrinology*. 2005 Feb 1;184(2):361–70.

83. Malyszko J. Heparin assays: ironing out some details. 2009.
84. Chalhoub S, Langston CE, Farrelly J. The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in Anemia of Chronic Kidney Disease in Cats: 25 Cases. *J Vet Intern Med.* 2012 Feb 1;26(2):363–9.
85. Young B, Zaritsky J. Heparin for Clinicians. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2009 Aug 4;4(8):1384–7.
86. Morelle J, Labriola L, Jadoul M. Plasma heparin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* Nature Publishing Group; 2009 Nov;76(10):1116–6.
87. Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, Heimbürger O, Mallamaci F, Tripepi G, et al. Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int.* 2002 Nov 1;62(5):1791–8.
88. Chervier C, Cadoré JL, Rodriguez-Piñeiro MI, Deputte BL, Chabanne L. Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. *Journal of Small Animal Practice.* 2012 Mar 14;53(4):223–7.
89. Buttenschoen K, Buttenschoen DC, Berger D, Vasilescu C, Schafheutle S, Goeltenboth B, et al. Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *Am J Surg.* 2001 Jan;181(1):36–43.
90. Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2001.
91. Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002 Nov 1;17(suppl 11):39–43.
92. Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, et al. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998 Jul;32(1):107–14.
93. Reynolds BS, Lefebvre HP. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors -- what do we know? *Journal of Feline Medicine & Surgery.* 2013 Sep 2;15(1 Suppl):3–14.
94. Bohn AA. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2013 Nov;43(6):1319–30–vii.
95. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):7811–9.
96. Fleming RE, Sly WS. Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to

- hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jul 17;98(15):8160–2.
97. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090–3.
 98. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(7):1037–44.
 99. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hepcidin--A Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Jun 3;4(6):1051–6.
 100. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostrini N, Kemna EHJM, et al. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2706.
 101. Horl WH, Jacobs C, Macdougall IC. European Best Practice Guidelines 14-16 Inadequate response to epoetin. ... Transplantation. 2000.
 102. Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT. Ability of the canine brief pain inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc*. 2008 Oct 15;233(8):1278–83.
 103. Reynolds BS, Chetboul V, Nguyen P, Testault I, Concordet DV, Carlos Sampedrano C, et al. Effects of Dietary Salt Intake on Renal Function: A 2-Year Study in Healthy Aged Cats. *J Vet Intern Med*. 2013 Apr 3;27(3):507–15.

DISCUSSION

Les données scientifiques autour des maladies rénales chroniques ne cessent de croître, tant en médecine humaine que dans le domaine vétérinaire. La recherche d'outils thérapeutiques ainsi que de marqueurs diagnostiques et pronostiques dans les MRC chez le chat contribue à améliorer leur prise en charge en clinique. Le but de ce projet de recherche était d'évaluer la présence d'inflammation dans les maladies rénales chroniques chez le chat et d'évaluer l'impact de l'inflammation sur le métabolisme du fer, le développement d'une anémie et sur la survie globale de ces patients.

Nous avons constaté que les chats en MRC ont des concentrations significativement plus élevées de certaines protéines de la phase aiguë de l'inflammation (SAA et hepcidine), indiquant que les MRC félines sont associées à un état pro-inflammatoire, tel que décrit chez les humains. Les PPA sont produites en réponse à des conditions inflammatoires aiguës et chroniques et sont de plus en plus utilisées à visée diagnostique, pronostique et thérapeutique chez l'homme et chez les animaux.^{49,50,89} Dans notre étude, la concentration moyenne en SAA était augmentée de façon significative dans le groupe MRC. À notre connaissance, cette étude est la première qui démontre que les maladies rénales chroniques constituent une condition pro-inflammatoire chez le chat. La présence d'une corrélation positive entre les concentrations en créatinine et certaines PPA indique que les MRC plus avancées peuvent potentiellement avoir un degré d'inflammation plus élevé. L'association entre l'inflammation et les maladies rénales chroniques est bien connue en médecine humaine et gagne de plus en plus d'attention comme une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les maladies rénales terminales.⁹⁰ Cibler l'inflammation constitue donc une nouvelle approche thérapeutique lors de MRC en médecine humaine et différentes stratégies sont utilisées comme des changements nutritionnels, une supplémentation en oméga-3, l'immunomodulation non spécifique et l'utilisation d'anticytokines ciblées (comme l'IL-1Ra).⁷⁹

Chez les chiens, il a été démontré que l'utilisation des oméas-3 permet de ralentir la vitesse de diminution du DFG et réduit l'ampleur de la protéinurie, de la glomérulosclérose, et de la fibrose interstitielle chez les patients en CKD.¹⁰² Cependant, il n'y a à ce jour aucune preuve que ce type de thérapie permet d'améliorer la survie des chats en MRC.

Une autre conclusion importante de cette étude est que les MRC félines sont associées à des changements dans le statut en fer. Il est généralement accepté que les carences en fer contribuent aux anémies de MRC et la supplémentation en fer constitue l'un des traitements des anémies lors de MRC mais il y a à ce jour peu d'éléments dans la littérature traitant du statut en fer dans les MRC chez le chat.¹⁰³ Cet aspect est important car la supplémentation en fer est souvent utilisée dans le traitement des anémies de MRC et on sait que dans certaines circonstances, cette supplémentation pourrait être inefficace et pourrait même conduire à une surcharge/intoxication en fer.⁸¹ Nous avons constaté que nos chats en MRC avaient des concentrations sériques en fer et en TIBC considérablement diminuées en comparaison avec le groupe contrôle. La diminution du TIBC peut représenter une adaptation fonctionnelle à une inflammation chronique, en participant à la séquestration du fer dans le système réticulo-endothélial.⁹⁴ La diminution des concentrations sériques en fer lors de MRC peut être expliquée par des saignements gastro-intestinaux, un manque d'absorption ou représenter une déficience fonctionnelle de fer en raison de la séquestration du fer dans les lieux de stockage.^{2,94} La différenciation entre une carence en fer absolue et fonctionnelle ou relative fer peut parfois être difficile. Dans cette étude, il n'y avait pas de différence significative dans les taux de ferritine, mais la diminution significative des concentrations sériques de fer combiné à une la diminution significative du TIBC dans le groupe MRC est davantage compatible avec une carence fonctionnelle en fer. Nous avons également observé une association significative entre les

marqueurs de carence en fer et certaines PPA. L'augmentation des concentrations en haptoglobine était significativement associée à une augmentation des taux de ferritine et l'augmentation des concentrations en hepcidine avec une diminution du TIBC. Il est connu que certaines APP ont un rôle dans la séquestration du fer, par exemple l'un des effets métaboliques de l'haptoglobine dans les plaies infectées est de lier l'hémoglobine afin de limiter la disponibilité du fer de l'hémoglobine pour la croissance bactérienne.⁵⁰ En effet, certaines maladies infectieuses et inflammatoires induisent la séquestration du fer dans les macrophages pour éviter son utilisation par des bactéries et diminuent l'absorption intestinale du fer, processus aboutissant finalement à l'apparition d'une anémie d'inflammation chronique.⁷⁰ Dans cette étude, il y avait une corrélation négative entre les concentrations sériques de créatinine et le TIBC ($p = 0,0008$), indiquant que les MRC avancées sont souvent associées à une plus grande séquestration du fer. Cependant, la présence d'une carence absolue en fer reste possible chez des patients en MRC, ce qui renforce l'importance d'évaluer individuellement le statut en fer chez les chats en MRC, afin de décider de manière appropriée la nécessité ou non d'une supplémentation en fer. Chez les humains souffrant de MRC, les deux marqueurs les plus couramment utilisés du statut en fer, la saturation de la transferrine et la ferritine, manquent souvent de sensibilité et de spécificité pour prédire la réponse à une supplémentation en fer.⁸⁵ Compte tenu de ces limitations, l'hepcidine a récemment émergé comme un régulateur clé de l'homéostasie du fer, qui peut être utilisé pour mieux cibler la thérapie en fer chez les patients atteints de MRC.⁸¹ Ainsi, la poursuite des recherches autour de l'hepcidine et de ses applications en médecine vétérinaire dans le cadre des MRC peut bel et bien aboutir à des répercussions cliniques," En se basant sur les données de médecine humaine, ces répercussions pourraient potentiellement avoir un impact significatif sur la prise en charge des chats et des chiens souffrant de MRC.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux concentrations en hepcidine dans les MRC et nous avons constaté que la concentration moyenne en hepcidine dans le groupe MRC était significativement plus élevée que chez les chats en bonne santé. Dans cette étude, nous avons constaté que l'augmentation de l'hepcidine dans le groupe MRC était significativement associée avec l'augmentation des concentrations en SAA ($p = 0,02$). Des études antérieures ont révélé que l'hepcidine est bien corrélée avec la CRP chez les humains car la synthèse d'hepcidine est induite par l'inflammation, un processus qui est médié par l'IL-6.⁹⁸ Comme nous avons montré que les MRC félines constituent un état pro-inflammatoire, cette corrélation positive était attendue mais à notre connaissance, cette étude est la première à le démontrer.

En raison de son élimination rénale et de la régulation par l'inflammation, il a été proposé que l'insuffisance rénale conduise progressivement à une altération du métabolisme de l'hepcidine, affectant ainsi l'absorption entérique de fer et de la disponibilité des réserves de fer.¹⁰⁰ Dans cette étude, les chats anémiques avaient des concentrations significativement plus élevées en SAA ($p = 0,0003$), des concentrations en fer plus basses ($p = 0,04$) et un TIBC plus faible ($p = 0,01$) par rapport aux chats non anémiques et sains. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'anémie chez les patients atteints de MRC, y compris des saignements gastro-intestinaux, des changements dans le métabolisme du fer, la malnutrition et la suppression de la réactivité de la moelle osseuse et de la production d'érythropoïétine. L'inflammation chronique peut également contribuer à l'anémie chez les humains en MRC.⁸⁷ Nous avons observé une corrélation significative entre le TIBC et l'hématocrite dans le groupe MRC, et également entre le fer et l'hématocrite dans ce même groupe, ce qui indique que les chats insuffisants rénaux avec des panels en fer indiquant une diminution du fer et une élévation du TIBC sont plus à risque d'être anémiques. Certains auteurs soutiennent que l'anémie peut être l'un des nombreux liens entre les

cytokines pro-inflammatoires et la diminution du pronostic chez les patients insuffisants rénaux.⁹⁰

Il a été proposé que l'hepcidine soit l'hormone clé de la régulation du fer et que la surproduction d'hepcidine au cours des processus infectieux et inflammatoires pouvait être responsable du développement d'une anémie.⁹⁶ Il a été montré que l'hepcidine est inversement corrélée avec le GFR chez l'homme et est prédite de façon indépendante par le statut en dialyse, la ferritine et la protéine C-réactive, ce qui suggère à nouveau que l'inflammation et la diminution du taux de filtration glomérulaire peuvent induire une augmentation des niveaux d'hepcidine dans les MRC.⁸¹ Les résultats de cette étude tendent vers des conclusions similaires. Dans cette étude, en plus d'être significativement associé au SAA, l'augmentation des concentrations en hepcidine est associée avec une diminution du TIBC ($p = 0,02$) et une diminution de l'hématocrite ($p = 0,02$), indiquant que les patients avec des concentrations en hepcidine plus élevées peuvent avoir des niveaux de SAA également plus élevés et sont plus à risque d'être anémiques. Nous avons également constaté que l'augmentation des concentrations en SAA dans le groupe de MRC était significativement associée à une augmentation des concentrations en hepcidine ($p = 0,02$) et une diminution de l'hématocrite ($p = 0,0002$), indiquant que les patients avec des concentrations SAA élevées peuvent avoir des niveaux d'hepcidine également plus élevés et sont plus à risque d'être anémiques. Ainsi, il semble que l'hepcidine ait un rôle majeur dans la régulation des niveaux de fer dans l'organisme des chats atteints de MRC. Le lien entre l'hepcidine et les protéines de l'inflammation ouvre des perspectives thérapeutiques prometteuses. En effet, en diminuant l'inflammation précocement lors de MRC, il semble raisonnable de penser que cela pourrait réduire les niveaux d'hepcidine et la séquestration du fer associée. Si cette approche thérapeutique peut retarder le développement des anémies lors de MRC et éviter ou retarder l'utilisation de l'EPO dans cette affection, cela pourrait changer considérablement la façon dont on traite les

chats en MRC aujourd'hui. Davantage de recherches restent toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Peu de données sont disponibles sur les concentrations en EPO dans les MRC félines. Nous avons constaté que les chats anémiques avaient des concentrations significativement plus faibles en EPO par rapport aux chats en MRC non anémiques et aux chats sains ($p = 0,02$). Dans cette étude, la concentration en EPO n'a pas été associée de façon significative avec les APP, mais une tendance a été observée avec l'haptoglobine ($p = 0,07$). Cette tendance non significative pourrait résulter d'une erreur de type II car il y avait seulement la moitié des chats dans le groupe CKD dont les niveaux sériques en EPO ont été évalués. Le kit utilisé ayant été discontinué durant la période de l'étude, nous n'avons pas pu réaliser cette analyse sur les patients inclus dans la seconde moitié du projet. Si cette étude était à refaire, nous aurions commandé davantage de kits pour doser l'EPO en début d'étude mais cette problématique était difficile à anticiper et ne sachant pas le nombre total de patients qui seraient inclus à la fin de l'étude et ne disposant pas des budgets nécessaires à cette période, nous avons préféré faire les analyses en deux temps.

L'utilisation des molécules stimulant l'érythropoïèse a révolutionné le traitement des anémies dans les maladie rénale chronique. Cependant, il a été montré en médecine humaine que certains patients urémiques présentent une résistance à la l'EPO, probablement en raison de taux élevés de cytokines pro-inflammatoires.⁹¹ Il a été démontré que les patients ayant des concentrations plus élevées en CRP ont besoin de doses plus élevées d'EPO pour traiter leur anémie et de nombreux auteurs recommandent d'augmenter la dose d'EPO de 30 à 70% pour atteindre les mêmes objectifs cibles.¹⁰¹ On ne sait pas si les chats en MRC ayant des concentrations en EPO plus faibles dans cette étude faible auraient nécessité une supplémentation

plus importante en EPO. Ainsi, il est possible qu'à l'avenir, l'évaluation des niveaux d'hepcidine chez des chats en MRC puisse également être utile afin de mieux anticiper la réponse à une supplémentation en EPO. Nous pensons que le possible lien entre les niveaux en EPO, l'inflammation et le métabolisme en fer dans la population féline nécessite davantage d'études.

La présente étude comporte plusieurs limites. Tout d'abord, le test ELISA utilisé dans l'étude pour doser l'hepcidine est un kit humain qui n'a pas été validé chez les chats. Ceci constitue la principale limite de l'étude mais il n'existe à ce jour aucun moyen de doser l'hepcidine qui soit validé chez le chat. Malgré une homologie forte entre le peptide hepcidine-25 humain et félin (80%), nous ne pouvons conclure avec certitude que les résultats obtenus sont vraiment liés à la mesure de l'hepcidine. Toutefois, le même kit a été utilisé en duplicate dans les 2 groupes et une différence significative a été observée. Ensuite, nous avons choisi d'évaluer les niveaux en SAA et HAG dans notre population d'étude mais d'autres PPA comme l'AGP auraient également pu être choisis et auraient pu fournir des données complémentaires. Les autres limites de l'étude sont le petit nombre d'animaux inclus, en particulier dans les stades de MRC plus avancés, limitant l'analyse statistique par sous-groupes. Enfin, il est difficile de savoir dans quelle mesure les maladies concomitantes pourraient avoir influencé les résultats de cette étude. Nous avons cherché à évaluer une population de chats en MRC dans une situation clinique et comme les MRC affectent souvent les patients gériatriques, il n'est pas surprenant de constater que beaucoup de nos chats avaient des maladies concomitantes. Lors de l'analyse secondaire, nous avons essayé d'éliminer cet effet en supprimant les patients présentant des maladies concomitantes mais le nombre limité de patients dans ce sous-groupe limite également l'analyse statistique. Par ailleurs, le réel statut en fer aurait probablement été mieux déterminé en combinant nos analyses avec le dosage des réserves de fer dans la moelle osseuse mais nous

avons considéré cette procédure comme étant trop invasive dans la conception de l'étude. Enfin, l'étiologie des MRC n'a pas été déterminée avec certitude car nous n'avons pas effectué de biopsies rénales et les techniques d'imagerie utilisées n'étaient pas standardisées. En effet, la façon la plus appropriée de différencier les maladies rénales aiguës (MRA) des maladies rénales chroniques reste l'histopathologie rénale; il n'est donc pas possible de confirmer avec certitude que certains chats en MRA aient été faussement considérés comme des MRC.

CONCLUSION

Pour conclure, nous avons constaté que les maladies rénales félines constituent un état pro-inflammatoire associé à une augmentation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Nous avons montré que les MRC félines sont associées à des changements dans les réserves en fer et nous avons observé une incidence non négligeable de déficience relative en fer, résultats compatibles avec les changements observés lors de maladies inflammatoires. Nous suggérons donc que le statut en fer soit évalué individuellement afin de déterminer de manière appropriée la nécessité d'une supplémentation en fer pour chaque patient. En outre, comme l'inflammation semble jouer un rôle important dans les MRC félines, d'autres recherches centrées sur de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'inflammation semblent nécessaires. Avec la poursuite des recherches sur la validation du dosage de l'hepcidine chez le chat, ce dernier pourrait devenir un biomarqueur important du statut en fer dans les MRC félines et participer au traitement des MRC en médecine vétérinaire. Dans l'avenir, le développement d'un antagoniste de l'hepcidine pourrait être un outil thérapeutique important dans le traitement des anémies induites par les MRC.⁸⁵ Plus précisément, l'abaissement des niveaux d'hepcidine ou l'antagonisation de ses actions biologiques pourrait inverser les effets négatifs de l'inflammation sur l'érythropoïèse en permettant la mobilisation du fer stocké et l'amélioration de l'absorption intestinale du fer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lulich JP, Osborne CA, O'Brien TD, Polzin DJ. Feline renal failure: questions, answers, questions. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. 1992 Feb 1;v. 14(2) p. 127-153 (21 p. not consecutive).
2. Chalhoub S, Langston CE, Eatroff A. Anemia of renal disease. *Journal of Feline Medicine & Surgery*. 2011 Sep;13(9):629–40.
3. Cowgill LD. Pathophysiology and manageme... [Semin Vet Med Surg (Small Anim). 1992] - PubMed - NCBI. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small 1992*.
4. Elliott J, Barber PJ. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *Journal of Small Animal Practice*. 1998 Feb;39(2):78–85.
5. King JN, Tasker S, Gunn-Moore DA, Strehlau G. Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2007 Sep;21(5):906–16.
6. THORP ML, JOHNSON ES, YANG X, PETRIK AF, PLATT R, SMITH DH. Effect of anaemia on mortality, cardiovascular hospitalizations and end-stage renal disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrology*. 2009 Mar;14(2):240–6.
7. Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012 Jul;42(4):669–92–vi.
8. Brown SA. Oxidative Stress and Chronic Kidney Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2008 Jan;38(1):157–66.
9. González FF, Fuentes CV, Castro HC. Economic impact of Losartan use in type 2 diabetic patients with nephropathy]. *Revista médica de 2009*.
10. Hoerger TJ, Wittenborn JS, Segel JE, Burrows NR, Imai K, Eggers P, et al. A health policy model of CKD: 1. Model construction, assumptions, and validation of health consequences. *Am J Kidney Dis*. 2010 Mar 1;55(3):452–62.
11. Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword - Weiss - 2002 - *European Journal of Clinical Investigation - Wiley Online Library*. *European journal of clinical investigation*. 2002.
12. Caride VJV. Occult gastrointestinal bleeding. *The New England journal of medicine*. 1999 Nov 4;341(19):1477–8.
13. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2011 Jan;41(1):15–30.
14. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of Chronic Disease. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):1011–23.
15. Zaritsky J, Young B, Wang H-J, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hepcidin—A

- Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the ...* 2009.
16. Małyszko J, Małyszko JS, Hryszko T, Pawlak K, Mysliwiec M. Is hepcidin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol.* 2005 Nov;25(6):586–90.
 17. Paubelle É, Herbaux C. *John Libbey Eurotext : Éditions médicales et scientifiques France : revues, médicales, scientifiques, médecine, santé, livres. Hématologie.* 2013.
 18. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. Hepcidin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am J Hematol.* 2006;81(11):832–7.
 19. Andrews NC. Disorders of Iron Metabolism — *NEJM.* *N Engl J Med.* 1999.
 20. Alvarez-Hernández X, Licéaga J, McKay IC, Brock JH. Induction of hypoferremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest.* 1989 Sep;61(3):319–22.
 21. Andrews NC. The iron transporter DMT1. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 1999.
 22. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood.* 2003 May 15;101(10):4148–54.
 23. RT M Jr. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep.* 2003 Mar 1;2(2):116–21.
 24. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clinica Chimica Acta.* 2003.
 25. MA JZ, EBBEN J, XIA H, COLLINS AJ. Hematocrit Level and Associated Mortality in Hemodialysis Patients. *Journal of the American Society ...* 1999.
 26. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, et al. The Effects of Normal as Compared with Low Hematocrit Values in Patients with Cardiac Disease Who Are Receiving Hemodialysis and Epoetin. *N Engl J Med.* 1998 Aug 27;339(9):584–90.
 27. Teehan GS, Bahdouch D, Ruthazer R, Balakrishnan VS, Snyderman DR, Jaber BL. Iron Storage Indices: Novel Predictors of Bacteremia in Hemodialysis Patients Initiating Intravenous Iron Therapy. *Clinical infectious ...* 2004.
 28. Kletzmayer J. High dose intravenous iron: a note of caution. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002 Jun 1;17(6):962–5.
 29. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood.*

- American Society of Hematology; 2000 Aug 1;96(3):823–33.
30. IV. NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease: update 2000. *American Journal of Kidney Diseases*. 2001. pp. S182–238.
 31. Rizzo JD. Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. *Blood*. American Society of Hematology; 2002 Aug 29;100(7):2303–20.
 32. Auerbach M. Intravenous Iron Optimizes the Response to Recombinant Human Erythropoietin in Cancer Patients With Chemotherapy-Related Anemia: A Multicenter, Open-Label, Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Feb 23;22(7):1301–7.
 33. JL S. Iron and the anemia of chronic disease. *Oncology (Williston Park)*. 2002 Sep 1;16(9 Suppl 10):25–33.
 34. SULLIVAN JL. Iron therapy and cardiovascular disease. *Kidney Int*. 1999 Mar;55:S135–7.
 35. M Reyes GI. Iron loading and disease surveillance. *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention; 2001;7(1):164.
 36. Means RT. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep*. 2003 Mar;2(2):116–21.
 37. Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol*. 1995 Jan;162(1):134–8.
 38. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF, et al. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):1085–92.
 39. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res*. 1998 Aug;18(8):555–9.
 40. Means RT, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by interferons alpha and beta: differing mechanisms despite shared receptor. *Exp Hematol*. 1996 Feb;24(2):204–8.
 41. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. ... *England Journal of* 1990.
 42. Paltrinieri S. The feline acute phase reaction. *Vet J*. 2008 Jul;177(1):26–35.
 43. Kipar A, Leutenegger CM, Hetzel U, Akens MK, Mislin CN, Reinacher M, et al.

- Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001 Feb;78(3-4):305–15.
44. Kipar A, Meli ML, Failing K, Euler T. Natural feline coronavirus infection: Differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Veterinary immunology* 2006.
 45. Dean GA, LaVoy A, Yearley J, Stanton C. Cytokine Modulation of the Innate Immune Response in Feline Immunodeficiency Virus–Infected Cats. *J INFECT DIS*. 2006 Jun;193(11):1520–7.
 46. Kipar A, Baptiste K, Meli ML, Barth A, Knietsch M. Age-related dynamics of constitutive cytokine transcription levels of feline monocytes. *Experimental* 2005.
 47. Otto CM, Rawlings CA. Tumor necrosis factor production in cats in response to lipopolysaccharide: an in vivo and in vitro study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1995 Nov;49(1-2):183–8.
 48. Cecilian F, Giordano A, Spagnolo V. The Systemic Reaction During Inflammation: The Acute-Phase Proteins. *PPL*. 2002 Jun 1;9(3):211–23.
 49. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res. EDP Sciences*; 2004 Mar;35(2):163–87.
 50. Ceron JJ, Eckersall PD, Martı́nez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005 Jun;34(2):85–99.
 51. Brazzell JL, Borjesson DL. Evaluation of plasma antithrombin activity and D-dimer concentration in populations of healthy cats, clinically ill cats, and cats with cardiomyopathy. *Vet Clin Pathol*. 2007 Mar;36(1):79–84.
 52. Rossbacher J, Wagner L, Pasternack MS. Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol*. 1999 Oct;50(4):399–404.
 53. Gruys E, Toussaint MJM, Upragarin N, Van EAM, Adewuyi AA, Candiani D, et al. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005 Oct;6(10):941–7.
 54. Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary Hematology*. John Wiley & Sons; 2011. 1 p.
 55. Cerón JJ, Eckersall PD, Martı́nez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005 Jun;34(2):85–99.
 56. Eckersall PD, Duthie S, Safi S, Moffatt D, Horadagoda NU, Doyle S, et al. An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin. *Comp Haematol Int*. Springer-Verlag; 1999 Sep;9(3):117–24.

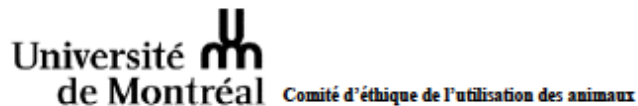
57. Bence LM, Addie DD, Eckersall PD. An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol*. 2005 Dec;34(4):335–40.
58. Hansen AE, Schaap MK, Kjelgaard-Hansen M. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidimetric immunoassay for determination of feline SAA concentration. *Vet Res Commun*. 2006 Nov;30(8):863–72.
59. Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S. Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *The Veterinary Journal*. 2004 Jan;167(1):38–44.
60. SASAKI K, MA Z, KHATLANI TS, OKUDA M, INOKUMA H, ONISHI T. Evaluation of Feline Serum Amyloid A (SAA) as an Inflammatory Marker. *J Vet Med Sci*. 2003;65(4):545–8.
61. DiBartola SP, REITER JA, CORNACOFF JB, KOCIBA GJ, BENSON MD. Serum Amyloid a Protein-Concentration Measured by Radial Immunodiffusion in Abyssinian and Non-Abyssinian Cats. *American Journal of Veterinary Research*. 1989 Aug;50(8):1414–7.
62. Logdberg L, Wester L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):284–97.
63. Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate Journal*. Kluwer Academic Publishers; 1997;14(5):569–76.
64. Correa SS, Mauldin GN, Mauldin GE, Mooney SC. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2001 Mar 1;37(2):153–8.
65. Stoddart ME, Whicher JT, Harbour DA. Cats inoculated with feline infectious peritonitis virus exhibit a biphasic acute phase plasma protein response. 1988.
66. Paltrinieri S, Metzger C, Battilani M, Pocacqua V. Serum α 1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *Journal of Feline* 2007.
67. Duthie S, Eckersall PD, Addie DD, Lawrence CE, Jarrett O. Value of 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Veterinary Record*. 1997 Sep 20;141(12):299–303.
68. S Paltrinieri FCVPAMRMEGAG. Correlation between coronaviral burden and qualitative changes of serum alpha-1-acid glycoprotein. *European colloquium of* null; 2006;51–1.
69. Schwegmann-Weßels C, Herrler G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconjugate Journal*. 2006 Feb;23(1-2):51–8.

70. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):783–8.
71. Kann RKC, Seddon JM, Henning J, Meers J. Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Res Vet Sci*. 2012 Oct;93(2):649–54.
72. Dec GW. Anemia and iron deficiency—new therapeutic targets in heart failure. *N Engl J Med*. 2009.
73. Grimes CN, Giori L, Fry MM. Role of hepcidin in iron metabolism and potential clinical applications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012 Jan;42(1):85–96.
74. Hadley KB, Johnson L, Hunt JR. Iron absorption by healthy women is not associated with either serum or urinary prohepcidin. 2006.
75. Tomosugi N. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood*. American Society of Hematology; 2006 Aug 15;108(4):1381–7.
76. Weizer-Stern O, Adamsky K, Margalit O, Ashur-Fabian O, Givol D, Amariglio N, et al. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53. *British Journal of Haematology*. 2007 Jul;138(2):253–62.
77. Nangaku M. Chronic Hypoxia and Tubulointerstitial Injury: A Final Common Pathway to End-Stage Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005 Nov 16;17(1):17–25.
78. Fine LG, Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2008 Jul 16;74(7):867–72.
79. Impellizzeri D, Esposito E, Attley J, Cuzzocrea S. Targeting inflammation: New therapeutic approaches in chronic kidney disease (CKD). *Pharmacol Res*. 2014 Mar;81C:91–102.
80. Nemeth E. Targeting the Hepcidin-Ferroportin Axis in the Diagnosis and Treatment of Anemias. *Advances in Hematology*. Hindawi Publishing Corporation; 2010;2010(2):1–9.
81. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hepcidin--A Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Jun 3;4(6):1051–6.
82. Kulaksiz H. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *Journal of Endocrinology*. 2005 Feb 1;184(2):361–70.
83. Malyszko J. Hepcidin assays: ironing out some details. 2009.

84. Chalhoub S, Langston CE, Farrelly J. The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in Anemia of Chronic Kidney Disease in Cats: 25 Cases. *J Vet Intern Med.* 2012 Feb 1;26(2):363–9.
85. Young B, Zaritsky J. Heparin for Clinicians. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2009 Aug 4;4(8):1384–7.
86. Morelle J, Labriola L, Jadoul M. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int. Nature Publishing Group;* 2009 Nov;76(10):1116–6.
87. Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, Heimbürger O, Mallamaci F, Tripepi G, et al. Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int.* 2002 Nov 1;62(5):1791–8.
88. Chervier C, Cadoré JL, Rodriguez-Piñeiro MI, Deputte BL, Chabanne L. Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. *Journal of Small Animal Practice.* 2012 Mar 14;53(4):223–7.
89. Buttenschoen K, Buttenschoen DC, Berger D, Vasilescu C, Schafheutle S, Goeltenboth B, et al. Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *Am J Surg.* 2001 Jan;181(1):36–43.
90. Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2001.
91. Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002 Nov 1;17(suppl 11):39–43.
92. Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, et al. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998 Jul;32(1):107–14.
93. Reynolds BS, Lefebvre HP. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors -- what do we know? *Journal of Feline Medicine & Surgery.* 2013 Sep 2;15(1 Suppl):3–14.
94. Bohn AA. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2013 Nov;43(6):1319–30–vii.
95. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):7811–9.
96. Fleming RE, Sly WS. Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Jul 17;98(15):8160–2.

97. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090–3.
98. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(7):1037–44.
99. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Heparin--A Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Jun 3;4(6):1051–6.
100. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostrini N, Kemna EHJM, et al. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2706.
101. Horl WH, Jacobs C, Macdougall IC. European Best Practice Guidelines 14-16 Inadequate response to epoetin. ... *Transplantation*. 2000.
102. Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT. Ability of the canine brief pain inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc*. 2008 Oct 15;233(8):1278–83.
103. Reynolds BS, Chetboul V, Nguyen P, Testault I, Concordet DV, Carlos Sampedrano C, et al. Effects of Dietary Salt Intake on Renal Function: A 2-Year Study in Healthy Aged Cats. *J Vet Intern Med*. 2013 Apr 3;27(3):507–15.

Annexe 1 : Formulaire d'approbation du comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA)



Le 16 juillet 2013

Madame Marilyn Dunn
Professeure titulaire
Faculté de médecine vétérinaire – sciences cliniques

Madame Dunn,

À la suite de l'évaluation de votre demande d'autorisation d'utiliser des animaux pour le projet :

Projet : 13-Rech-1707

Titre : Évaluation des niveaux de fer et d'hepcidine dans les anémies associées à la maladie rénale chronique chez le chat.

Date d'échéance de l'autorisation d'utiliser les animaux : le 1er juillet 2014

Le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) a reçu les deux évaluations du mérite scientifique et *approuve votre nouveau projet de recherche*. Toutefois, un commentaire a été émis par un des deux évaluateurs, à savoir que le projet est satisfaisant, mais qu'il serait bien de considérer d'augmenter le nombre de chats sains pour que le nombre soit similaire au groupe des chats avec la maladie rénale chronique. Je vous rappelle que si vous désirez appliquer cette suggestion, il faudrait tout d'abord en faire la demande au CÉUA à l'aide du formulaire CEUAF4R (demande de modification) disponible à l'adresse suivante [_____](#). Le CÉUA vous autorise à utiliser les 70 animaux demandés et ne tient pas compte de la suggestion qui ferait grimper le nombre total d'animaux à 100 animaux.

Le secrétariat du CÉUA vous enverra sous peu une fiche d'autorisation d'utiliser des animaux. L'autorisation du CÉUA est valide pour une période d'un an.

Je demeure à votre entière disposition pour toute information supplémentaire et vous prie de recevoir, Madame Dunn, mes meilleures salutations.

La présidente du CÉUA,

Sophie Cuvelliez

SC/sj

p.j. Romain Javard

Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé.

Consentement Éclairé :

Participation à l'étude des anémies associées aux maladies rénales chroniques chez le chat

Je, soussigné _____, propriétaire du chat _____ (N° Dossier _____) accepte que mon animal participe à une étude réalisée par le département de Médecine Interne du CHUV en partenariat avec le laboratoire de Pathologie Clinique du CHUV de la Faculté de Médecine Interne de Saint-Hyacinthe.

J'accepte que soit réalisé sur mon animal une prise de sang au niveau de la veine jugulaire et que cet échantillon serve dans le but unique de faire avancer la recherche en médecine vétérinaire, et plus particulièrement dans le cadre des anémies de maladie rénale chroniques.

A Saint-Hyacinthe, le ____/____/____

Signature du Propriétaire

Annexe 3 : Affiche de recrutement du projet d'étude.



Et si votre chat pouvait faire avancer la recherche en médecine vétérinaire ?...



Si vous avez un chat souffrant de maladie rénale chronique (*Créatinine* > 140 $\mu\text{mol/L}$ + *Densité urinaire* < 1.035), votre animal peut participer à un projet d'étude. Seule une simple prise de sang est requise.

Veillez contacter Dr Javard ou Dre Dunn pour davantage d'informations.

Annexe 4 : Estimation du budget nécessaire pour l'étude

- + Seringues/aiguilles/tubes secs = 100 \$
- + Dosage Serum amyloid A (2 kits de 96T) : 2x 546€ = 1332 \$
- + Haptoblobin (2 kits de 96T) : 2 x 353 € = 882 \$
- + EPO (2 kits de 96T) : 2 x 649\$ = 1298 \$
- + Iron, ferritin, TIBC : 80 x 49\$ = 3920 \$
- + Hepcidin (2 kits de 96T) : 2 x 1026,67 \$ = 2052 \$

Total = 9 584 \$