

WHO/HGN/HEMOCH/WG/98.3

Original: anglais

Distribution: générale

LA LUTTE CONTRE L'HÉMOCHROMATOSE :

Amélioration du Diagnostic

*Rapport d'une réunion conjointe de l'OMS;
de la fondation Hémochromatose; et des Associations
Hémochromatose de Canada, France et Royaume-Uni*

St. Malo, France, 18 juin 1997

Organisation mondiale de la Santé
Programme Génétique humaine
1998

* World Health Organization, 1998

This document is not a formal publication of the World Health Organization (WHO), and all rights are reserved by the Organization. The document may, however, be freely reviewed, abstracted, reproduced and translated, in part or in whole, but not for sale nor for use in conjunction with commercial purposes.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation. S'il peut être commenté, résumé, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, il ne saurait cependant l'être pour la vente ou à des fins commerciales.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

**PROGRAMME GÉNÉTIQUE HUMAINE
DIVISION DES MALADIES NON TRANSMISSIBLES**

Saint-Malo (France), 18 juin 1997

**LA LUTTE CONTRE L'HÉMOCHROMATOSE :
AMÉLIORATION DU DIAGNOSTIC**

*Rapport d'une réunion conjointe de l'OMS, de la Fondation Hémochromatose
et des Associations Hémochromatose Canada, France et Royaume-Uni*

Sommaire

	Pages
1. OBJECTIFS	2
2. OUTILS	3
Marqueurs sériques du fer	3
Marqueurs moléculaires	6
3. EXPÉRIENCE ACQUISE	8
Corrélation génotype/phénotype	8
Dépistage familial	15
4. PERSPECTIVES	17
Stratégie du dépistage de masse	17
Coût/avantages du dépistage en population de l'hémochromatose	20
Problèmes éthiques du dépistage génétique de l'hémochromatose : la situation en France	21
5. RECOMMANDATIONS FINALES	22
Recherche des mutations du gène HFE pour le diagnostic de l'hémochromatose	22
Dépistage généralisé	23
Dépistage familial	24
6. LISTE DES PARTICIPANTS	25
7. BIBLIOGRAPHIE	26
Figures 1-3	34
Tableaux 1-7	38

1. OBJECTIFS

L'hémochromatose génétique est une affection fréquente, dont la prévalence est voisine de 0,1% et atteint 0,5% dans certains pays. Après une longue phase asymptomatique, elle peut être à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité considérables à l'âge adulte. Le diagnostic met en œuvre des méthodes phénotypiques et génotypiques non invasives, simples, sensibles, et largement disponibles. Le traitement (des saignées régulières) est peu coûteux, sans danger, et efficace. Mises en place au début de l'évolution (avant le début de l'arthrite et des complications viscérales), les saignées thérapeutiques empêchent l'apparition des symptômes, permettent le retour à une qualité de vie normale et restaurent l'espérance de vie. Par conséquent, l'hémochromatose génétique pourrait utilement bénéficier du dépistage généralisé et familial.

La définition de l'hémochromatose génétique doit être précisée avant d'envisager les objectifs et la politique de dépistage. En effet, les sujets à examiner, les outils de dépistage, la prise en charge thérapeutique et le coût global diffèrent largement en fonction de la définition de la maladie.

- Il y a peu de temps encore l'hémochromatose génétique était définie comme une affection autosomique récessive, déterminée par un gène localisé sur le chromosome 6, près du gène HLA-A. Avant la découverte d'un marqueur moléculaire spécifique, le diagnostic était fait de la manière suivante :
 - cas indicateurs : i) mise en évidence d'une surcharge hépatique en fer avec un rapport charge hépatique en fer/âge (aussi appelé indice de charge hépatique en fer, le «hepatic iron index» ou «HII» des Anglo-Saxons) supérieur à 1,9 en l'absence de toute autre cause connue de surcharge martiale, et ii) si possible, observation d'un sujet HLA identique dans la fratrie ayant une surcharge en fer correspondant aux critères ci-dessus;
 - fratrie : caractéristiques HLA identiques à celles du cas indicateur, quel que soit le stock de réserves en fer de l'organisme.
- La découverte récente du gène HFE et de ses mutations (C282Y et H63D) modifie les critères diagnostiques de l'hémochromatose génétique, la plupart des patients présumés homozygotes pour l'hémochromatose génétique d'après les critères phénotypiques étant des homozygotes pour la mutation C282Y. Cependant : i) la maladie ne s'exprime pas chez certains homozygotes; ii) certains hétérozygotes ont un stock de fer augmenté, compatible avec la définition phénotypique de l'homozygotie; iii) dans certains pays, une proportion importante de patients qui avaient été considérés comme hémochromatosiques homozygotes ne présentent pas la mutation C282Y; iv) le rôle d'autres mutations, et notamment de la mutation H63D, fait encore l'objet de débats. Dans ces conditions, la définition de l'hémochromatose reste controversée et elle recouvre : i) les homozygotes C282Y, quelle que soit l'augmentation du stock de fer; ii) des sujets dont les réserves en fer de l'organisme sont augmentées, quelles que soient leurs caractéristiques génétiques; iii) les sujets homozygotes pour la mutation C282Y et ayant des réserves en fer augmentées.

L'objectif minimal du dépistage de l'hémochromatose génétique est de déceler et de traiter les homozygotes avant qu'apparaissent les symptômes fonctionnels (arthrite et impuissance) et vitaux (cirrhose hépatique, cancer primitif du foie, diabète sucré et myocardopathie).

On pourra discuter une extension de l'objectif du dépistage de l'hémochromatose, si l'on tient compte du fait que la surcharge en fer observée chez certains hétérozygotes (souvent bénigne et non évolutive) et au cours du syndrome dysmétabolique de surcharge en fer pourrait augmenter le risque de cancer et de cardiopathie ischémique, et devrait par conséquent être dépistée et traitée.

Les populations à examiner peuvent être les suivantes : i) familles des cas indicateurs uniquement (dépistage familial); ii) sujets symptomatiques (dépistage orienté), et/ou iii) population générale (dépistage généralisé ou de masse).

2. OUTILS

i) Marqueurs sériques du fer

La recherche des marqueurs sériques du fer est une étape cruciale du diagnostic de l'hémochromatose. Il importe par conséquent de discuter leur intérêt clinique respectif. Quatre paramètres sériques importants seront considérés [1,2].

Dosage du fer sérique

C'est le test le plus simple. La méthode de référence a été décrite par le Comité international de Standardisation en Hématologie (CISH) [3]. Il s'agit d'obtenir simultanément la précipitation des protéines sériques et la libération du fer cédé par la transferrine en faisant agir un agent réducteur. On fait suivre d'une centrifugation qui élimine les protéines dénaturées et permet de déceler le fer ferreux dans le surnageant au moyen d'un chromogène (Ferrozine ou Ferene, plus sensible). Diverses méthodes évitant la précipitation des protéines, tendant à minimiser les interférences avec les chromogènes, ne nécessitant que de très faibles quantités de sérum et mieux adaptées aux analyseurs automatisés ont été proposées [4,5]. Le taux de fer sérique normal est d'environ 20 $\mu\text{mol/l}$ (entre 10 et 30 $\mu\text{mol/l}$), le chiffre étant légèrement plus élevé chez l'homme que chez la femme. La sidérémie est souvent supérieure à 35 $\mu\text{mol/l}$ en cas de surcharge en fer prononcée.

L'interprétation du taux du fer sérique est délicate pour diverses raisons. Du point de vue technique, on observe des variations intra- et interlaboratoires. Du point de vue physiologique, les variations circadiennes et journalières sont importantes. Les fluctuations circadiennes sont marquées par un taux maximal le matin et minimal le soir. En outre, le fer apporté par l'alimentation augmente le taux de fer sérique postprandial. C'est en raison de ces variations que le taux de fer sérique sera déterminé le matin à jeun si possible. Diverses situations pathologiques modifient le taux de fer sérique, indépendamment de la réserve en fer. Par exemple, l'inflammation diminue le fer sérique tandis que la cytolyse hépatique (qui se manifeste par une activité accrue des transaminases sériques) l'augmente.

En général, le dosage du fer sérique fournit au patient un message facilement compréhensible, mais la variabilité des résultats et sa relative insensibilité comme indicateur d'hémochromatose limitent considérablement sa portée clinique. En fait, l'intérêt du dosage du fer sérique semble se limiter à la détermination du coefficient de saturation de la transferrine.

Saturation de la transferrine sérique

Trois méthodes permettent de mesurer la saturation de la transferrine : i) la mesure de la capacité totale de fixation du fer (connue sous le nom de TIBC = «Total Iron Binding Capacity» des Anglo-Saxons) consiste à saturer la capacité de fixation du fer de la transferrine avec un excès de fer. L'excès de fer (non fixé) est éliminé chimiquement (au moyen de carbonate de magnésium ou d'une résine) et la teneur en fer du sérum saturé est déterminée. Le coefficient de saturation de la transferrine (exprimés en %) est obtenu en divisant le taux de fer sérique par la capacité totale de fixation du fer et en multipliant par 100; ii) la détermination de la capacité latente de fixation du fer (UIBC = «Unsaturated Iron Binding Capacity» des Anglo-Saxons) consiste à incuber le sérum en présence d'une quantité connue de fer pour saturer la transferrine, et l'excès de fer non fixé est déterminé par une méthode photométrique après fixation à un chromogène; iii) le dosage direct de la transferrine par une

méthode immunologique (néphélométrie): connaissant la masse moléculaire de la transferrine et sachant que chaque molécule de transferrine peut fixer deux atomes de fer, on convertit facilement le résultat du dosage de la transferrine en TIBC. Les valeurs obtenues par les méthodes chimiques et immunologiques sont en général bien corrélées [6,7]. Du point de vue pratique, la détermination de la TIBC est longue et comporte plusieurs étapes manuelles. La détermination de l'UIBC et la méthode immunologique peuvent être entièrement automatisées. La standardisation à deux niveaux devrait permettre de limiter la variabilité interlaboratoires : i) l'élaboration d'une recommandation internationale pour l'utilisation de la méthode directe (chimique) ou indirecte (immunologique) de détermination de la TIBC; ii) l'utilisation d'une préparation internationale de référence pour le dosage des protéines du sérum humain par les laboratoires appliquant la méthode immunologique [8,9].

Le coefficient de saturation de la transferrine sérique est normalement de 20-40%. L'interprétation de ce coefficient doit tenir compte des éléments suivants : 1) Dans la mesure où le dosage du fer sérique est inclus dans la mesure du coefficient de saturation de la transferrine (ST), ce dernier montre les mêmes variations physiologiques que le fer sérique. 2) En l'absence de surcharge en fer, la saturation de la transferrine est diminuée par l'inflammation et augmentée par la cytolysse hépatique, de même que le taux de fer sérique. Toutefois, le dysfonctionnement hépatique influe encore plus sur la saturation de la transferrine, car l'insuffisance hépatocytaire qui lui est associée entraîne une diminution concomitante de la synthèse de transferrine. Le taux de fer sérique (numérateur) est alors augmenté par la cytolysse et la TIBC (dénominateur) diminuée en raison de l'insuffisance de la production de transferrine, ce qui aboutit à une augmentation considérable du coefficient de saturation de la transferrine. 3) En cas de surcharge en fer, l'interprétation dépend du type de maladie : i) Au cours de l'hémochromatose, la ST est un paramètre diagnostique capital, qui reflète l'anomalie métabolique de base et qui est le test le plus sensible pour l'identification des hémochromatosiques homozygotes. Ainsi que l'ont montré Edwards et al. [10], la ST se situe en général au-dessus de 60% chez l'homme et de 50% chez la femme. En outre, la transferrine reste fortement saturée tout au long de la journée chez la plupart des homozygotes [11]. On observe toutefois, comme l'ont signalé Bulaj et al. [12], certains recouvrements entre les formes homozygotes et hétérozygotes : en cas d'hétérozygotie, le coefficient de saturation de la transferrine était supérieur à la moyenne plus deux écarts types chez 18% des hommes et chez 11% des femmes. Quand la surcharge en fer est massive, la saturation de la transferrine (et le taux de fer sérique) peut être inférieure à la valeur attendue en raison de l'apparition d'une carence en acide ascorbique (due aux réactions d'oxydation de la vitamine C par le fer) [13,14]. ii) Au cours des autres syndromes de surcharge martiale, d'origine hématologique en particulier, la saturation de la transferrine est en général accrue. Deux nouveaux types de surcharge en fer, non liés à une augmentation de la saturation de la transferrine, seront décrits dans le chapitre suivant.

Ferritinémie

Plusieurs méthodes immunologiques de titrage (RIA, ELISA) ont été décrites pour doser la ferritine dans le sérum. L'étalon international de l'OMS pour le titrage de la ferritine sérique est le réactif 80-602 [15]. La ferritinémie normale se situe dans la fourchette 10-300 µg/l. Il y a peu de variations diurnes de la ferritinémie [16]. La valeur de la ferritinémie est plus élevée chez l'homme que chez la femme. Une étude réalisée dans dix centres aux Etats-Unis d'Amérique [17] a montré que, chez l'homme, la ferritinémie médiane augmente, partant d'une valeur de 23 µg/l à 12-16 ans pour atteindre un plateau à 120-130 µg/l après 32 ans. Chez la femme, la ferritinémie reste voisine de 30 µg/l jusqu'à la ménopause, après quoi elle atteint environ 80 µg/l.

Une hyperferritinémie s'observe à l'occasion de diverses affections n'impliquant pas de surcharge en fer : i) inflammation, plusieurs cytokines inflammatoires étant associées à une augmentation de la transcription de l'ARNm de la ferritine; ii) cytolysse (lésions hépatocytaires); iii) alcoolisme, peut-être par un effet d'induction sur la synthèse de ferritine par l'alcool [18,19];

iv) anomalies sans lien avec le stockage du fer, comme dans la maladie de Gaucher par exemple [20,21]; et v) syndrome associant cataracte congénitale à transmission autosomique dominante et hyperferritinémie. Dans cette dernière entité récemment décrite [22], l'hyperferritinémie ne s'accompagne pas d'une augmentation du fer sérique ni de la saturation de la transferrine et il n'y a pas de surcharge hépatique en fer. Elle est due à des mutations dans la protéine de régulation de la traduction des ARNm (IRE-BP = iron responsive element binding protein) des chaînes L de la ferritine [23].

L'hémochromatose s'accompagne d'un profil variable de la ferritinémie. i) Celle-ci peut être normale. Lorsque l'excès de fer est faible, il est alors essentiel en pratique clinique de ne pas exclure un diagnostic d'hémochromatose au vu d'une ferritinémie normale. En outre, il est important d'interpréter comme «peut-être élevée» une ferritinémie proche du seuil «normal» supérieur, la fourchette de valeurs normales étant large suivant les laboratoires. ii) Si la valeur est élevée, elle correspond à un excès de fer tissulaire important et la corrélation entre la valeur de l'hyperferritinémie et la surcharge en fer est forte. iii) La ferritinémie peut être inférieure à la valeur attendue comparée aux réserves tissulaires en fer, en raison d'un déficit en vitamine C [24]. iv) Lorsqu'elle est très élevée (supérieure à 1000-1500 µg/l), la ferritinémie évoque la possibilité de lésions hépatiques, et notamment de fibrose [25]. v) La ferritinémie peut être élevée chez certains hétérozygotes pour le gène de l'hémochromatose : dans les séries étudiées par Bulaj et al. [12], la ferritinémie dépassait le seuil normal supérieur chez 20% des hommes et 8% des femmes.

En cas de surcharge en fer non liée à l'hémochromatose, la ferritinémie est en général augmentée, proportionnellement à l'excès de fer. L'hyperferritinémie est alors associée à une augmentation du fer sérique et de la saturation de la transferrine, sauf dans les deux nouvelles entités se manifestant par une surcharge en fer. L'une d'elles est fréquente et peut être décrite comme une «surcharge en fer dysmétabolique» [26]. Les patients présentent des anomalies métaboliques comme une augmentation du poids corporel, une augmentation de tension artérielle, une hyperlipidémie et une intolérance au glucose. La surcharge hépatique est souvent modérée mais peut être prononcée (correspondant à un indice de charge hépatique en fer supérieur à 1,9) chez un tiers des cas. On discute l'éventualité d'une relation de ce phénomène avec des mutations du gène HFE (C282Y et/ou H63D) [27]. L'autre affection est un déficit en céruléoplasmine héréditaire et rare [28], dû à une mutation du gène de la céruléoplasmine, qui mime l'hémochromatose dans la mesure où il est familial et entraîne une surcharge en fer massive des hépatocytes et un diabète sucré. La différence est représentée par la coexistence de signes neurologiques (extrapyramidaux et cérébelleux) et de symptômes oculaires. La céruléoplasmine n'est pas décelable dans le sérum et, contrairement à la maladie de Wilson, on n'observe pas d'accumulation du cuivre.

Fer sérique non lié à la transferrine

La présence de fer sérique non lié à la transferrine a été mise en évidence dans les surcharges en fer secondaires [29] ainsi que dans l'hémochromatose génétique [30]. Ce fer est décelable même en présence d'une saturation incomplète de la transferrine [31]. Cette forme de fer sérique est potentiellement toxique en raison de sa tendance marquée à favoriser les réactions des radicaux libres [32]. En outre, le foie est une cible privilégiée en raison de la clairance hépatique élevée du fer sérique non lié à la transferrine [33], même en cas de surcharge hépatique en fer [34]. On a signalé des titres ~~parfois~~ atteignant 15-20 µmol/l au cours de l'hémochromatose génétique. Les méthodes de dosage proposées ont cependant une fiabilité douteuse [34,35] et ce test ne peut donc pas être appliqué en pratique clinique à l'heure actuelle.

En conclusion, si le but est de dépister l'hémochromatose, le meilleur test de dosage du fer sérique est la saturation de la transferrine, dont la mesure fait inévitablement appel à celle de la concentration du fer sérique. Si l'objectif est de déceler tous les types de surcharge en fer, la mesure du

fer sérique doit également comporter la détermination de la ferritinémie, des syndromes de surcharge martiale sans augmentation de la saturation de la transferrine et/ou du fer sérique ayant été décrits récemment. Quel que soit le cas, avant d'associer une augmentation du fer sérique, de la saturation de la transferrine et de la ferritinémie à un excès de fer tissulaire, il est important de doser l'activité des transaminases sériques pour exclure un dysfonctionnement hépatique. Devant une hyperferritinémie, il faut aussi exclure le rôle d'un syndrome inflammatoire par la mesure de la vitesse de sédimentation des érythrocytes et le dosage de la protéine C réactive.

ii) Marqueurs moléculaires

Découverte du gène HFE

On sait depuis 1975 que le gène dont l'altération provoque l'hémochromatose (HFE) se situe au niveau du bras court du chromosome 6, sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [36]. Localisé tout d'abord à la distance d'un centimorgan du gène HLA-A, puis à l'intérieur d'une séquence de 400 kb entre HLA-A et HLA-F [37], l'intervalle a été étendu avec l'analyse des microsatellites D6S105 [38] et D6S1260 [39], localisés respectivement à 2,5 et 3 kb en position télomérique par rapport à HLA-A. En août 1996, Feder et al. de la Société de Biotechnologie Mercator Genetics ont décrit un gène qui pourrait être celui de l'hémochromatose [27]. Sa localisation est quelque peu surprenante, à 4,5 Mb en position télomérique par rapport à HLA-A [27].

Avant qu'un gène ne soit découvert par la génétique de positionnement, il est toujours possible de recourir au conseil génétique dans les familles où un patient a été diagnostiqué et d'évaluer les marqueurs de polymorphisme associés à la maladie. Concernant l'hémochromatose, le conseil génétique s'est tout d'abord appuyé sur l'association entre l'hémochromatose et les antigènes de classe I du système HLA, puis sur l'association avec les microsatellites localisés en position télomérique par rapport à HLA-A. Toutefois, compte tenu de la distance importante qui sépare HLA-A du gène HFE, et malgré la grande stabilité de cette région, l'utilisation comme marqueurs des antigènes de classe I du système HLA risque de conduire à des erreurs. Les marqueurs HLA localisés à 4,5 mégabases en position centromérique vis-à-vis de HFE ne peuvent plus servir au conseil génétique. Quoi qu'il en soit, la décision pourrait être revue si l'on venait à découvrir un deuxième gène sur le chromosome 6.

Depuis la description du gène HFE qui est un très bon gène potentiel de l'hémochromatose, le dépistage génétique direct est possible. Il s'agit d'un gène comparable à ceux de la classe I du HLA, comportant sept exons; la protéine correspondante potentielle aurait la même organisation avec un domaine intracytoplasmique court, un domaine transmembranaire, et une partie extracellulaire comportant trois domaines, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (Fig. 1). Le domaine $\alpha 3$ pourrait interagir de manière non covalente avec la β_2 microglobuline [27,40].

Deux mutations ont été décrites chez les hémochromatosiques à l'intérieur de ce gène :

- la première a lieu dans l'exon 4 et entraîne le remplacement de la cystéine par la tyrosine en position 282 dans la protéine (mutation C282Y); cette mutation empêche l'interaction avec la β_2 microglobuline [41];
- la deuxième a lieu dans l'exon 2 et dans le domaine $\alpha 1$, entraînant le remplacement de l'histidine par l'acide aspartique et est donc appelée H63D.

La mutation principale, C282Y, s'observe avec une fréquence allélique qui oscille entre 100% et 68% suivant le pays [42-44]. La mutation H63D est présente avec une fréquence allélique voisine de 17% chez les témoins et chez les hémochromatosiques, et son implication directe dans l'hémochromatose n'est pas claire. On ignore s'il s'agit d'un polymorphisme ou d'une mutation

bénigne. Par conséquent, seule la mise en évidence de la mutation C282Y à l'état homozygote peut être considérée comme un test diagnostique sans ambiguïté.

Méthodes de détection

Il existe plusieurs méthodes pour déceler une mutation connue; concernant C282Y, elles dépendent du choix des laboratoires. Trois méthodes sont actuellement employées : PCR-restriction, test de liaison d'oligonucléotides (OLA) et dot blot inverse.

PCR-restriction (Fig. 2)

L'amplification est réalisée avec des amorces situées de part et d'autre de l'exon 4, et le produit de la PCR est digéré au moyen de la Rsa I. La digestion de ce produit de 387 pb par la Rsa I met en évidence deux fragments, de 247 pb et de 140 pb dans l'ADN normal. La mutation C282Y créant un nouveau site Rsa I, on obtient trois fragments, de 247, 111 et 29 pb, chez les patients atteints.

Cette méthode est rapide, non coûteuse (environ USD 6.- par test), mais ne peut pas être réellement automatisée. On peut néanmoins effectuer la réaction sur des plaques de 96 puits, et faire l'électrophorèse sur des gels d'agarose de grande dimension.

Test de liaison d'oligonucléotides (OLA) (Fig. 3)

Le test OLA pour rechercher la substitution d'une base consiste à construire deux oligonucléotides qui s'hybrident aux séquences adjacentes de la cible, l'articulation se situant à l'endroit de la mutation.

L'ADN ligase ne lie par covalence que deux oligonucléotides parfaitement hybridés. Le test est fait sur une séquence cible amplifiée par PCR et une seule liaison est réalisée. Un oligonucléotide est marqué par la biotine et le deuxième oligonucléotide porte une molécule signal comme la digoxigénine. Les produits de la réaction sont portés sur des plaques de microtitrage sur lesquelles se fixe la biotine. S'il y a liaison, la molécule signal est retenue à l'intérieur des puits après lavage et le signal est détecté. S'il n'y a pas eu liaison, on ne détecte aucun signal.

Le coût d'un test est sensiblement le même que pour la méthode précédente, soit environ USD 6.-; il est plus facile à automatiser que le précédent mais le matériel nécessaire est particulier et n'est pas disponible dans tous les laboratoires d'analyse.

Dot blot inverse

Dans cette méthode, des sondes synthétiques de petite taille sont fixées sur papier ou sur microplaque et s'hybrident uniquement avec les séquences qui leur correspondent parfaitement. Ce test est vendu dans le commerce par certains fabricants.

Toutes ces méthodes reposent sur la PCR, et le plus grand soin doit être pris pour éviter les contaminations et les faux positifs.

Conclusion

Considérant qu'un gène unique est impliqué dans l'hémochromatose, on peut concevoir un dépistage génotypique, car les méthodes sont peu coûteuses et relativement automatisables. Certains patients atteints d'hémochromatose sont porteurs de mutations pour lesquelles il n'existe pas encore de test génétique et le dépistage phénotypique préalable paraît donc indispensable. Le génotypage peut

être de la plus grande utilité quand le coefficient de saturation de la transferrine sérique est supérieur à 45%. Chez les homozygotes pour la mutation C282Y, on peut porter un diagnostic d'hémochromatose; dans le cas contraire, aucune conclusion n'est possible pour les sujets hétérozygotes.

3. EXPÉRIENCE ACQUISE

i) Corrélation génotype/phénotype

Introduction

L'importance de la surcharge en fer et les complications cliniques associées varient considérablement en raison des effets conjoints des facteurs environnementaux et génétiques [45]. Les symptômes et signes de maladie apparaissent habituellement plus tard chez la femme en raison des pertes sanguines menstruelles et des grossesses. Au cours de l'hémochromatose, le stock martial hépatique peut être modifié par l'âge, les habitudes alimentaires et des facteurs tels que des spoliations sanguines pathologiques ou des dons de sang. Une forte consommation d'alcool et une hépatite virale chronique facilitent l'apparition de lésions hépatiques chez les patients porteurs d'hémochromatose [46,47].

L'hypothèse selon laquelle le fer alimentaire pourrait influencer sur l'expression phénotypique de l'hémochromatose repose sur l'observation que le fer hémérique est facilement absorbé et favorise l'absorption du fer non hémérique alors que la biodisponibilité du fer non hémérique est faible et modifiée par les autres apports alimentaires. La consommation de viande jouerait un rôle important dans la forte expression de la maladie chez les patients australiens [45]. Il n'existe toutefois pas d'étude spécifiquement conçue pour évaluer le rôle du fer alimentaire dans la variabilité phénotypique de l'hémochromatose.

Si la plupart des complications cliniques s'accroissent tant avec l'âge qu'avec l'importance des réserves en fer de l'organisme, la relation entre l'âge et l'importance de la surcharge martiale n'est retrouvée que chez les jeunes patients [48], la relation étant absente dans les études plus larges comportant toutes les tranches d'âge [49]. Il semble donc que la vitesse d'accumulation du fer n'est pas constante au cours de l'évolution pathologique et qu'il existe suivant les patients une grande variabilité de ce paramètre.

La gravité de la surcharge en fer, comparable dans les fratries atteintes, a été la première indication que des facteurs génétiques influent fortement sur l'expression phénotypique de l'affection [50]. C'est l'étude des haplotypes chez des patients non apparentés qui a fourni la deuxième indication : elle a mis en évidence la présence d'un haplotype ancestral commun, lié à HLA-A3, dans 30 à 50% des chromosomes atteints chez toutes les populations étudiées. Deux études indépendantes ont montré une association entre l'haplotype ancestral et l'expression du phénotypique au cours de l'hémochromatose [51,52]. Les patients australiens porteurs de deux exemplaires de l'haplotype ancestral ont un indice de charge hépatique en fer supérieur à ceux qui possèdent un exemplaire unique de l'haplotype ou en sont dépourvus [51]. Les patients italiens porteurs de l'haplotype ancestral, même en un seul exemplaire, ont un indice de charge hépatique en fer, une quantité totale de fer soustrait par saignées thérapeutiques (FS) et un rapport FS/âge plus élevé que les patients qui ne portent pas cet haplotype [52]. L'hypothèse sous-tendue par les études est que les patients possédant le même haplotype ont la même mutation, et les résultats ont été interprétés comme les conséquences de la mutation la plus grave liée à l'haplotype ancestral.

L'isolement du gène HFE a permis d'analyser l'influence des mutations géniques sur le phénotype. Contre toute attente, il est apparu que la plupart des patients étaient porteurs de la mutation

C282Y [27,42,43]. Une deuxième mutation (H63D) était présente chez une minorité d'hémochromatosisques. Il a été suggéré que cette mutation pourrait avoir un rôle dans l'hémochromatose et que les hétérozygotes composites, porteurs de cette mutation et de la mutation C282Y, ont un risque de survenue de l'hémochromatose, avec toutefois une pénétrance faible. L'existence d'une mutation très fréquente rend difficile l'explication des variations phénotypiques d'après le génotype HFE, et contredit les résultats observés auparavant concernant l'expression phénotypique liée à l'haplotype ancestral.

Australie

L'expression de l'homozygotie et de l'hétérozygotie pour la mutation C282Y a été étudiée dans le Queensland en Australie sur une série importante de patients examinés en vue d'une évaluation de la surcharge en fer.

Méthodes

L'étude comportait 300 sujets venant de 101 familles adressés au service en vue du diagnostic et de la prise en charge d'une surcharge martiale. Chez aucun patient l'augmentation des réserves en fer n'a paru imputable à une autre cause. On a procédé à la recherche d'une mutation C282Y dans le gène HFE et parfois d'une mutation H63D. On a ensuite examiné la concordance entre le diagnostic génétique et les critères diagnostiques acceptés auparavant : présence d'au moins deux des critères suivants : i) concentration hépatique en fer $>80 \mu\text{mol/g}$; ii) indice de charge hépatique en fer >2 ; iii) visualisation par coloration de la surcharge en fer des hépatocytes (grade 3-4); iv) plus de 4 g de fer soustrait par la méthode des saignées (on quantifie la déplétion en fer sachant que 1 litre de sang soustrait correspond normalement à l'élimination de 0,5 g de fer); ou v) identité du système HLA avec un membre de la fratrie indiscutablement atteint [53,54]. L'expression clinique et le degré d'expression de la surcharge en fer ont également été évalués chez les sujets hétérozygotes pour la mutation C282Y.

Résultats

Sur les 300 sujets étudiés, 125 étaient homozygotes pour la mutation C282Y, 173 étaient hétérozygotes, et 2 sujets présumés être homozygotes en raison de l'augmentation des réserves de fer n'avaient pas de mutation (12 et 15 ans respectivement). Ces deux observations sont des exemples de l'«hémochromatose juvénile» déjà signalée qui semblerait donc être une affection différente [55]. Les paramètres de la charge en fer sont indiqués au *Tableau 1*. Vingt-deux sujets (5 hommes et 17 femmes) étaient homozygotes pour C282Y sans répondre aux critères antérieurs de l'hémochromatose génétique. L'un de ces homozygotes pour C282Y «non expressifs» était HLA identique à un membre de la fratrie nettement atteint. Parmi les 5 hommes, 3 avaient un indice de charge hépatique en fer supérieur à 1,9 sans présenter d'autre signe diagnostique. Chez 2 hommes, les réserves de fer de l'organisme étaient, d'après la ferritinémie, trop faibles pour justifier une biopsie hépatique. Manifestement, ces sujets étaient «non expressifs». Tous les hommes homozygotes avaient un coefficient de saturation de la transferrine supérieur à 40%. Parmi les 17 femmes, 12 étaient en préménopause et, chez 2 des femmes ménopausées, l'absence de surcharge en fer pouvait s'expliquer : l'une était atteinte d'une entérite diagnostiquée et l'autre était multigeste. Parmi ces 22 sujets, 14 (soit 64%) étaient porteurs de HLA-A3.

Onze patients (10 hommes et 1 femme) étaient hétérozygotes pour la mutation C282Y tout en remplissant cependant les critères de diagnostic clinique de l'hémochromatose. Le coefficient de saturation de la transferrine était supérieur à 40% et la ferritinémie comprise dans une fourchette de 202-3600 $\mu\text{g/l}$ chez tous les sujets. La concentration intra-hépatique en fer a été mesurée chez 9 de ces sujets et oscillait de 62 à 190 $\mu\text{mol/g}$. L'indice de charge hépatique en fer était de 1,1-3,7, et dépassait

1,9 chez 8 des 9 sujets examinés. Parmi ces 8 sujets, 7 étaient aussi porteurs de la mutation H63D, c'est-à-dire hétérozygotes composites. Aucun des patients hétérozygotes ne présentait donc de surcharge massive en fer ni de signe de dysfonctionnement organique. Parmi 11 sujets qui ont eu un typage HLA, 9 étaient porteurs de l'antigène HLA-A3.

Le coefficient de saturation de la transferrine n'était inférieur à 40% chez aucun des hommes et chez seulement 4 femmes homozygotes pour la mutation C282Y. Vingt pour cent des hétérozygotes avaient une saturation de la transferrine supérieure à 40%. Tous les patients ayant un indice de charge hépatique en fer $>4,0$ étaient homozygotes pour cette mutation. En revanche, 7 sujets qui étaient hétérozygotes pour la mutation C282Y avaient un indice supérieur à 2,0 (maximum 3,7).

Conclusion

En Australie, tous les adultes ayant un phénotype évocateur d'hémochromatose portaient au moins une mutation C282Y, et 90% d'entre eux étaient homozygotes. L'hémochromatose juvénile n'était cependant pas liée à la mutation C282Y. Parmi les homozygotes pour la mutation C282Y, 18% (6,8% des hommes et 32% des femmes) n'exprimaient pas de surcharge en fer conforme aux critères de diagnostic antérieurs, le plus souvent en raison d'une spoliation sanguine physiologique ou pathologique. Sept pour cent des hétérozygotes pour cette mutation avaient une surcharge martiale modeste, dans la fourchette des valeurs correspondant antérieurement à un diagnostic d'homozygotie.

France

Le spectre phénotypique des mutations HFE a été décrit chez un groupe important de malades habitant la Bretagne (partie occidentale de la France) qui étaient atteints d'une surcharge en fer, que les sujets soient ou non classés comme hémochromatosiques en fonction de leur phénotype. Le but de l'étude était : i) de mieux définir l'expression de l'homo- et de l'hétérozygotie pour C282Y; ii) de clarifier le rôle de la mutation H63D.

Méthodes

Les patients ont été sélectionnés à partir d'une base de données constituée par les cas de surcharge martiale observés dans un centre de niveau tertiaire pour le diagnostic et le traitement de l'hémochromatose. Les critères d'inclusion étaient les suivants : i) recours en vue de l'exploration d'une surcharge martiale présumée, en l'absence de cas indicateur familial connu; ii) présence d'une surcharge martiale objectivée soit par la biopsie hépatique, soit par l'augmentation de la concentration intra-hépatique en fer, soit par l'augmentation des réserves en fer mobilisable; iii) absence d'anomalie hématologique, de porphyrie cutanée tardive, d'acéculéoplasminémie et d'apport martial oral de longue durée; et iv) présence d'une dépistage génétique des mutations HFE. Un total de 444 patients ont été recrutés.

Résultats

Parmi les patients inclus, 48% étaient homozygotes pour C282Y, 7% hétérozygotes pour cette mutation, 10% hétérozygotes composites, 16% hétérozygotes pour H63D, 3% homozygotes pour cette mutation et 16% ne portaient aucune mutation HFE (*Tableau 2*). La fréquence allélique de la mutation C282Y est plus élevée chez les surchargés en fer que dans une population témoin (57% contre 3%) (*Tableau 3*). Parmi les chromosomes susceptibles de porter la mutation H63D, on observe une fréquence de celle-ci significativement plus élevée chez les surchargés en fer que chez les témoins (37% contre 17%) (*Tableau 3*).

Les homozygotes pour la mutation C282Y diffèrent considérablement de tous les autres patients, les paramètres de leur charge en fer étant considérablement plus élevés dans toutes les autres études

effectuées (Tableau 4). La saturation de la transferrine (ST) n'est normale pour aucun d'eux, alors qu'elle est normale chez 30% des autres patients. La concentration hépatique en fer et l'indice de charge hépatique en fer sont en moyenne trois fois plus élevés (Tableau 4). Lorsque le génotype n'est pas homozygote pour la mutation C282Y, les différences entre les différentes catégories sont très faibles (Tableau 4) : la sidéremie et la saturation de la transferrine moyennes sont légèrement augmentées chez les hétérozygotes pour C282Y et les hétérozygotes composites. Chez les hétérozygotes composites, on observe une légère augmentation de l'indice de charge hépatique en fer. Les différences entre hétérozygotes et homozygotes pour la mutation H63D sont peu importantes.

Conclusion

Les homozygotes C282Y sont considérablement différents des porteurs d'autres génotypes et correspondent au phénotype classique de l'hémochromatose. La caractéristique la plus visible chez ces patients est l'augmentation du coefficient de saturation de la transferrine. Certains résultats vont à l'encontre d'un rôle important de la mutation H63D dans la surcharge martiale : i) les homozygotes H63D sont beaucoup moins fréquents que les hétérozygotes H63D et ne s'en distinguent pas par les paramètres de la charge en fer, résultat inattendu pour une mutation présumée récessive; ii) les hétérozygotes H63D ne se distinguent pas non plus des patients qui n'ont pas la mutation. Ce résultat contredit cependant l'observation d'une fréquence allélique de la mutation H63D et d'une expression accrues chez les hétérozygotes composites. La mutation H63D seule ne suffit pas pour provoquer une surcharge en fer importante, mais intervient comme cofacteur de l'expression phénotypique dans d'autres situations, par exemple chez les hétérozygotes C282Y.

Italie

On a montré récemment qu'en Italie la mutation C282Y représente 69% des allèles hémochromatoses et que 64% des patients sont homozygotes pour ce variant [44]. Une étude menée en collaboration par plusieurs centres de référence italiens pour l'hémochromatose est prévue pour établir les relations entre génotype et phénotype. La relation entre, d'une part, la sévérité de la surcharge martiale liée aux mutations HFE et, d'autre part, la présence ou l'absence de l'haplotype ancestral a été évaluée. En outre, le rôle d'autres facteurs non liés à l'hémochromatose, mais susceptibles de jouer un rôle dans le métabolisme du fer, comme le trait β -thalassémique, une forte consommation d'alcool ou une hépatite virale chronique, ont été également analysés, leur prévalence étant importante en Italie.

Génotypes HFE

Même si la surcharge en fer est extrêmement variable pour un même génotype, les homozygotes pour la mutation C282Y ont des paramètres de la charge en fer significativement plus élevés que les autres groupes de patients. En outre, les allèles C282Y et les homozygotes C282Y sont significativement plus fréquents parmi les patients ayant l'expression phénotypique la plus marquée. La mutation H63D est par contre généralement associée à une expression phénotypique moins sévère.

Haplotype ancestral

Chez les hémochromatosiques homozygotes pour la mutation C282Y, la présence de l'haplotype ancestral, même en un unique exemplaire, est associée à une expression phénotypique plus marquée. L'hypothèse du rôle de l'haplotype ancestral dans la gravité de l'expression phénotypique est encore renforcée par le fait qu'on observe 100% d'homozygotes pour la mutation C282Y chez les hémochromatosiques d'Australie. Ces observations donnent à penser qu'il existe un ou plusieurs gènes liés à 6-p, capables de modifier l'expression de la maladie chez les homozygotes C282Y.

Autres facteurs non liés à l'hémochromatose

La β -thalassémie à l'état hétérozygote est significativement plus fréquente chez les hétérozygotes porteurs d'une seule mutation C282Y que chez les homozygotes C282Y. On peut donc en déduire que le trait β -thalassémique pourrait avoir un rôle dans l'expression de l'hémochromatose, favorisant sa manifestation en présence d'une mutation bénigne et facilitant le développement d'une surcharge en fer majeure en présence d'anomalies importantes. L'alcoolisation massive est fréquente dans la population italienne et près de 30% des hémochromatosiques absorbaient au moins 80 g d'alcool par jour [46]. L'hépatite B et l'hépatite C sont également très répandues en Italie, et dans certaines zones du sud de l'Italie les anticorps anti-HCV sont présents chez plus de 10% de la population générale. En Italie, la fréquence de ces deux infections est significativement plus élevée chez les hémochromatosiques que chez les témoins appartenant à la même zone géographique [47]. L'alcool et les hépatites sont deux facteurs qui augmentent le risque de mortalité et d'apparition d'un cancer du foie chez les hémochromatosiques italiens [46,47]. On a observé dans cette série qu'une forte consommation d'alcool et qu'une hépatite virale étaient présentes quel que soit le génotype, évoquant un rôle mineur de celui-ci dans l'expression de l'affection. Il est possible toutefois qu'au niveau individuel l'interaction de ces facteurs avec une mutation unique puisse conduire au phénotype hh. L'impact de ces facteurs additionnels n'est pas facile à définir. En fait, l'expression de la maladie n'était pas liée à la présence de facteurs additionnels au sein des familles comportant un grand nombre de membres de la fratrie atteints car, dans au moins 50% des cas, ils étaient discordants pour la présence de ces facteurs.

Pour évaluer le rôle respectif des facteurs génétiques et acquis chez ces patients, on a analysé en détail en les groupant des membres de la fratrie atteints non porteurs de la mutation C282Y à l'état homozygote. D'après les résultats, on est amené à penser que, même moins fréquentes, d'autres anomalies génétiques (non liées à HFE) et liées ou non au chromosome 6-p, pourraient exister en Italie. La protéine HFE ne fixe pas de fer et pourrait être impliquée dans la régulation de l'absorption de ce métal par interaction avec une ou plusieurs autres protéines inconnues. Aussi est-il probable qu'un ou plusieurs autres gènes jouent un rôle dans la régulation de l'absorption du fer, interagissant avec le fonctionnement du gène HFE ou le modulant.

Conclusion

Chez les hémochromatosiques italiens, la fréquence de l'allèle C282Y et celle des homozygotes pour C282Y est plus faible que celle qui a été signalée antérieurement dans les populations d'hémochromatosiques d'ascendance nord-européenne. Il est intéressant de noter que la fréquence de l'allèle C282Y diminue considérablement chez les patients originaires du centre et du sud de l'Italie par rapport à ceux qui viennent du nord. Concernant la mutation C282Y, il existe donc un gradient du nord au sud de l'Italie, donnant à penser que l'hétérogénéité de l'hémochromatose dans ce pays pourrait être attribuée, en partie tout au moins, à l'hétérogénéité du fond génétique des populations italiennes.

Etats-Unis d'Amérique

On a passé en revue les études de population et de génétique concernant l'hémochromatose chez les Américains blancs ainsi que le rapport entre la gravité de la surcharge martiale chez les cas indicateurs hémochromatosiques et l'expression de l'hémochromatose associée aux marqueurs génétiques. Ces mêmes données ont aussi été résumées pour les Américains d'origine africaine.

Méthodes

Définitions de l'hémochromatose et de la surcharge en fer chez les Américains d'origine africaine : L'hémochromatose typique observée chez les sujets blancs d'origine européenne est conforme à la définition antérieurement donnée [56]. Cette affection est provoquée par une ou des

mutations autosomiques récessives, présentes à l'état homozygote en Ch6p, liées au locus HLA-A3, au microsatellite marqueur D6S105 [38], et à une ou plusieurs mutations du gène HFE [27,56,57]. La surcharge en fer chez les Américains d'origine africaine résulte d'une hyperabsorption du fer alimentaire et touche parfois plusieurs individus dans la même parenté. Les caractéristiques de l'affection ont été décrites à partir de quelques séries de cas et d'observations de cas individuels [58,59]. Il existe des relations phénotypiques et génétiques entre la surcharge en fer chez les Américains d'origine africaine et la surcharge en fer chez les Africains et les hémochromatosiques blancs [58,59].

Etudes de population aux Etats-Unis d'Amérique : On a procédé à une recherche manuelle et informatique dans la littérature médicale pour identifier les études de population concernant les domaines suivants : hémochromatose, marqueurs génétiques associés à l'hémochromatose et anomalies des paramètres de la charge en fer chez les groupes de population blancs, américains d'origine africaine et autres. La fréquence de l'hémochromatose homozygote et hétérozygote, celle des mutations C282Y et H63D, ainsi que celle des paramètres anormalement élevés du métabolisme du fer ont été résumées à l'aide de tableaux.

Résultats

a) Américains blancs

Hémochromatose clinique et homozygotie C282Y : La fréquence de l'hémochromatose a été estimée à 0,0003-0,0066 lorsque l'homozygotie est confirmée en prenant comme critère diagnostique un seuil élevé de saturation de la transferrine. La fréquence du gène de l'hémochromatose a été estimée à 0,01-0,08 (Tableau 5) [60-64]. L'examen des homozygotes C282Y met en évidence une fréquence observée et estimée qui fluctue de 0,001 à 0,007; la fréquence génique estimée de la mutation C282Y se situe entre 0,03 et 0,07 (Tableau 6) [41,65-67]. D'après ces données, la fréquence de l'hémochromatose s'exprimant cliniquement est légèrement inférieure à celle de l'homozygotie C282Y, en particulier chez la femme.

Gravité de la surcharge en fer et marqueurs génétiques : Parmi les cas indicateurs, la gravité de la surcharge en fer est significativement plus grande chez les homozygotes HLA-A3 que chez les hétérozygotes HLA-A3 ou les sujets HLA-A3 négatifs [57]. La ferritinémie et les complications de la surcharge en fer sont généralement plus importantes ou plus fréquentes chez les homozygotes HLA-A3, mais les différences ne sont pas statistiquement significatives (ce qui pourrait s'expliquer par le nombre relativement faible de sujets dans les sous-groupes) [57]. En outre, la gravité de la surcharge en fer est nettement plus importante chez les cas indicateurs homozygotes pour D6S105 que chez les hétérozygotes ou les sujets D6S105 négatifs [57]. De même, la ferritinémie et les complications de la surcharge en fer sont en général plus importantes ou plus fréquentes chez les homozygotes pour D6S105 [57].

Dans trois études, les hémochromatosiques ont été recrutés en raison de leur surcharge importante en fer [41,65,67]. Parmi ces patients, la fréquence de l'homozygotie pour C282Y était respectivement de 83,1, 82,3 et 81,8% [41,65,67]. Cependant, si le diagnostic des cas indicateurs hémochromatosiques est porté en prenant comme critère un coefficient élevé de saturation de la transferrine, seuls 59,4% sont homozygotes pour C282Y [67]. D'autres génotypes ont été observés chez ces cas indicateurs : hétérozygotes C282Y, hétérozygotes composites C282/H63D, homozygotes H63D, hétérozygotes H63D et absence de mutation démontrable [41,65,67]. En moyenne, ces sujets avaient une surcharge en fer et des complications moins importantes que les homozygotes C282Y [67]. Certains patients dépourvus de mutation C282Y ou H63D avaient toutefois des surcharges en fer massives [41,65,67].

Phénotype clinique, génotype et sexe : L'hémochromatose s'exprimant cliniquement apparaît classiquement plus souvent chez l'homme que chez la femme (*Tableau 5*) [61,63]. Les études de l'expression des marqueurs génétiques chez les hémochromatosiques mettent aussi en évidence une prédominance des hommes, qui se maintient lorsque les patients sont regroupés en fonction de l'expression de HLA-A3, D6S105 ou C282Y [67]. Comparés aux cas indicateurs féminins qui expriment les mêmes marqueurs génétiques, les hommes ont en moyenne un stock de fer environ deux fois plus important [57,67,68].

Hétérozygotie hémochromatosique et hétérozygotie C282Y : Un petit nombre d'hémochromatosiques hétérozygotes obligatoires confirmés par l'analyse de l'haplotype HLA ont des paramètres sériques de la charge en fer élevés, mais sont rarement atteints des complications de la surcharge en fer [12]. On a fait des observations correspondantes chez les hétérozygotes C282Y qui ont un haplotype commun avec les homozygotes C282Y indicateurs [67]. Les hétérozygotes C282Y confirmés comme cas indicateurs hémochromatosiques avaient toutefois un coefficient de saturation de la transferrine et une ferritinémie significativement supérieure, évoquant la présence possible chez ces cas indicateurs d'un gène additionnel augmentant l'absorption du fer.

b) Américains d'origine africaine

Surcharge en fer et marqueurs génétiques associés à l'hémochromatose : La charge hépatique en fer était augmentée chez 1,5% des sujets autopsiés dans une série hospitalière et chez 17,5% des patients ayant eu une ponction pour biopsie hépatique (*Tableau 7*) [58,69]. Ces données laissent présumer que la surcharge martiale serait relativement fréquente chez les Américains d'origine africaine et elles concordent avec les observations selon lesquelles l'hyperferritinémie est fréquente chez ces mêmes personnes (*Tableau 7*) [70]. L'élévation du coefficient de saturation de la transferrine n'est cependant pas signalée dans les études de population [60,64] et elle est rare dans les séries de cas concernant les Américains d'origine africaine surchargés en fer [58,59]. L'examen de la ferritinémie à partir des données recueillies dans la population et des séries de cas de surcharge en fer chez les Américains d'origine africaine évoque une prédominance des hommes [12,59,70]. L'homozygotie pour C282Y n'a pas été observée chez les cas indicateurs surchargés en fer américains d'origine africaine ni chez les membres atteints de leur famille [71]. On estime que la mutation C282Y est associée à 5% des surcharges en fer chez les Américains d'origine africaine; cette mutation (la mutation H63D également) est probablement acquise par les Américains d'origine africaine à la suite de l'apport de gènes venant de populations blanches [71]. L'expression de HLA-A3 et de D6S105 n'est le plus souvent pas associée à une surcharge en fer, et s'observe moins souvent chez les surchargés en fer et les témoins normaux américains d'origine africaine que chez les témoins blancs appropriés [59,72].

Conclusion

Chez les Américains blancs, la fréquence de l'homozygotie C282Y est probablement plus grande que celle de l'hémochromatose clinique, notamment si les comparaisons des fréquences respectives s'appuient sur des pourcentages comparables d'hommes et de femmes. Les cas indicateurs homozygotes pour C282Y, HLA-A3 et D6S105 ont classiquement une surcharge en fer plus forte que les autres cas indicateurs [57,67]. Cependant, 80,3-83,1% seulement des cas indicateurs hémochromatosiques ayant une surcharge en fer massive sont homozygotes pour la mutation C282Y [41,65,67]. Certains cas indicateurs, négatifs pour les mutations C282Y et H63D, semblent toutefois avoir une hémochromatose liée au HLA, suggérant que les mutations multiples en Ch6p (et/ou d'autres chromosomes) augmentent l'absorption du fer [67]. De telles observations impliquent : 1) que, chez certains sujets homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations associées à l'hémochromatose, la surcharge en fer n'apparaît pas, chez les femmes en particulier; 2) qu'il existe une hétérogénéité génétique chez les personnes chez lesquelles une surcharge en fer se manifeste

cliniquement. Aucune enquête de population n'a étudié la fréquence du phénotype clinique et de l'expression simultanée de C282Y, H63D, HLA-A3, D6S105 [38] et d'autres marqueurs génétiques. Même si elle n'est pas prouvée, il est probable qu'il existe une hétérogénéité géographique de la répartition de l'hémochromatose aux Etats-Unis d'Amérique.

Chez les Américains d'origine africaine, il est nécessaire de procéder à des études de population en utilisant la ferritinémie comme critère de dépistage pour estimer la fréquence de la surcharge en fer. Les bases génétiques de la surcharge en fer chez les Américains d'origine africaine (ou les Africains) sont mal définies et ne peuvent donc pas servir comme critère de confirmation, tant aux fins du dépistage que de l'évaluation des cas individuels ou des fratries. L'apport des populations blanches parmi les Américains d'origine africaine varie considérablement avec la géographie [71,73], ce qui pourrait modifier l'expression phénotypique des gènes responsables de la surcharge martiale venant des populations blanches et africaines. Les troubles de la charge en fer chez les Américains qui ne sont ni d'origine blanche ni d'origine africaine n'ont pas encore été étudiés.

ii) Dépistage familial

On trouvera décrits ci-dessous la méthodologie et les résultats du dépistage familial réalisé dans un centre de dépistage de l'hémochromatose situé en France.

Méthodologie

Avant la description du gène HFE, la méthodologie employée au centre pour le dépistage familial de l'hémochromatose (Rennes, France) était la suivante. La décision de procéder au dépistage familial était prise lorsqu'un diagnostic présumé d'hémochromatose génétique était porté chez un cas indicateur. Le diagnostic présumé d'hémochromatose chez un sujet isolé - c'est-à-dire en dehors des enquêtes familiales - reposait sur des critères phénotypiques et sur la mise en évidence d'une surcharge en fer des tissus parenchymateux [25,74] en l'absence de toute autre cause connue de surcharge martiale. Les étiologies suivantes étaient exclues : pathologie hématologique, transfusions massives ou apport martial oral au long cours. L'alcoolisme n'était pas considéré comme une cause présumée de surcharge en fer importante. La confirmation d'une homozygotie présumée s'appuyait sur l'observation d'un rapport concentration hépatique en fer/âge (ou indice de charge hépatique en fer, le HII des Anglo-Saxons) supérieur à 1,9 $\mu\text{mol/g/année}$ d'âge [54,75] ou à un rapport grade histologique du fer total /âge supérieur à 0,19 (classification semi-quantitative en cinq grades de la charge en fer), ou encore une déplétion totale en fer supérieure à 5 g chez l'homme et à 3 g chez la femme sous saignées thérapeutiques. Le dépistage était proposé à tous les parents au premier et au deuxième degré du cas indicateur. Les antécédents cliniques ont été recueillis et un examen physique pratiqué, en général par le médecin de famille, pour rechercher des causes de perte en fer (grossesses, stérilet, donneur de sang) ou d'excès sidérique (transfusions, apport martial oral), ou d'une consommation importante d'alcool ou de médicaments. Le bilan sanguin biologique comportait un dosage du fer sérique, une détermination de la saturation de la transferrine, la ferritinémie, les enzymes hépatiques, la vitesse de sédimentation des globules rouges et le typage HLA-A et B. Dans chaque famille, l'état homozygote (HH) a été attribué au cas indicateur et chacun des deux haplotypes HLA identifiés chez ces sujets était présumé lié à un allèle hémochromatose. Tous les membres de la famille pouvaient être classés en fonction du typage HLA : homozygotes présumés (p-HH) possédant deux haplotypes liés à la maladie, hétérozygotes présumés (p-Hh) possédant un haplotype lié à la maladie, ou présumés homozygotes normaux (p-hh) dépourvus d'haplotype lié à la maladie. Le diagnostic des p-HH pouvait également s'appuyer sur les caractéristiques cliniques et biologiques en cas de surcharge en fer inexplicée, quel que soit le typage HLA. Le diagnostic de certitude de l'homozygotie (démontrée) (d-HH) s'appuyait sur la mise en évidence d'une surcharge en fer, soit par ponction biopsie de foie, soit par la méthode des saignées hebdomadaires. En fin de parcours diagnostique, l'ensemble de l'arbre généalogique était révisé.

Résultats

Les résultats du dépistage familial conduit de 1990 à 1996 sont indiqués ci-dessous. Un génotype a pu être attribué à 1298 membres des familles correspondant à 475 cas indicateurs. Le nombre de pères examinés et diagnostiqués comme p-Hh s'élève à 80. Le nombre de mères examinées s'élève à 120 et, pour 5 d'entre elles (soit 4%), on a conclu à un génotype présumé p-HH. Chez 246 frères, on a porté un diagnostic p-HH dans 53 cas (soit 22%), p-Hh dans 122 cas (soit 50%) et p-hh dans 68 cas (soit 28%). Le diagnostic porté chez 369 sœurs était p-HH dans 79 cas (soit 21%), p-Hh dans 204 cas (soit 56%) et p-hh dans 83 cas (soit 23%). Le diagnostic était p-HH chez 18 fils sur 245 (soit 7%) et chez 15 filles sur 238 (soit 6%). On a donc porté 171 diagnostics p-HH chez 1298 membres des familles (soit 13%), dont 36 (soit 21%) n'exprimaient pas la maladie : soit 7 frères (13%), 23 sœurs (29%) et 6 enfants (18%). Un diagnostic de certitude de l'homozygotie basé sur la mise en évidence des mêmes critères phénotypiques que chez le cas indicateur a été porté chez 68 patients.

Intérêt du dépistage génétique

L'intérêt éventuel du dépistage des mutations du gène HFE a été évalué rétrospectivement. La mutation C282Y a été recherchée sur des prélèvements congelés. Les résultats ont ensuite été comparés au résultat du dépistage. Les conclusions sont les suivantes : i) L'examen du gène HFE permet de conclure immédiatement pour chacun des membres de la parenté. ii) L'examen du gène HFE permet de corriger des conclusions erronées (membres de la famille diagnostiqués p-HH et qui ne sont pas homozygotes pour la mutation C282Y) portées dans 9 cas sur 47 (soit 19%), à savoir chez 6 membres de la fratrie sur 36 et 3 enfants sur 11. On notera qu'aucune anomalie des paramètres de la charge en fer ne s'exprimait chez les membres de ces familles. iii) L'étude du gène HFE permet d'éviter un dépistage familial inutile, tous les frères et sœurs p-HH (n = 3) des cas indicateurs non homozygotes pour C282Y n'exprimant pas de surcharge en fer.

Propositions préliminaires

On retiendra les propositions préliminaires suivantes visant à définir une nouvelle stratégie de dépistage. i) Le dépistage familial ne sera réalisé que lorsque les cas indicateurs sont homozygotes pour la mutation C282Y. ii) La stratégie de dépistage chez les parents pourrait se faire en deux étapes : tout d'abord, une mesure des paramètres sériques du fer, puis une recherche de la mutation C282Y, seulement lorsque les paramètres sériques indiquent une augmentation de la charge. iii) L'examen dans la fratrie consistera à déterminer le coefficient de saturation de la transferrine et à rechercher la mutation C282Y. iv) L'investigation chez les enfants peut être faite comme chez les frères et sœurs, mais on peut aussi, en vue du rapport coût-efficacité favorable de la stratégie, rechercher une mutation C282Y chez le conjoint du cas indicateur et n'examiner les enfants que si celui-ci est hétérozygote ou homozygote pour C282Y.

Deux questions n'ont pas reçu de solution : i) quelle doit être l'attitude dans une famille où un hétérozygote C282Y est diagnostiqué par dépistage familial ? ii) quelle doit être l'attitude devant un homozygote C282Y qui n'exprime pas la maladie ?

Conclusion

Le dépistage familial permet de diagnostiquer l'hémochromatose chez les membres de la famille. Le dépistage génétique devrait permettre d'obtenir un diagnostic beaucoup plus précis et d'offrir un conseil génétique.

4. PERSPECTIVES

i) Stratégie du dépistage de masse

Evaluation du dépistage de masse avant la découverte du gène HFE

En France, le Ministère français de la Santé a demandé en 1994 à l'Agence nationale pour le Développement de l'Evaluation médicale (ANDEM) d'examiner l'intérêt du dépistage de masse de l'hémochromatose.

Pourquoi un dépistage de masse ?

L'hémochromatose pourrait être l'une des maladies génétiques les plus fréquentes. On a estimé que sa prévalence se situe dans la fourchette 1,5-3 cas pour 1000 [76-79].

Lorsque la mutation du gène s'exprime, la maladie est potentiellement grave. Le temps qui s'écoule avant l'apparition des premiers symptômes (45 ans en moyenne [46,80-82]) est dû à l'augmentation progressive de la surcharge en fer qui caractérise cette pathologie. On peut alors observer des lésions et des dysfonctionnements organiques du foie, du cœur, du pancréas et de divers autres organes. Une des causes les plus fréquentes du décès est la cirrhose hépatique. L'expression biologique de la maladie peut être repérée avant son expression clinique : deux examens sanguins suffisent à mettre la surcharge en fer en évidence, la saturation de la transferrine et la ferritinémie.

Il existe un traitement : les saignées thérapeutiques. On a pu montrer [46,80,83] que, si le traitement est mis en route avant l'apparition des lésions organiques, l'espérance de vie des patients est comparable à celle de la population générale.

Du fait que la maladie peut être décelée au stade asymptomatique et qu'il existe un traitement efficace, la question de savoir s'il faut ou non dépister l'hémochromatose est pertinente.

Méthodes

Pour évaluer l'intérêt d'un programme de dépistage de masse, trois points importants doivent être considérés : i) son efficacité du point de vue de la santé publique; ii) son coût; iii) sa faisabilité. Ces trois points ont été examinés sur le plan scientifique en se référant à une lecture critique de la littérature et à l'avis d'un groupe d'experts français.

Efficacité d'un programme de dépistage de masse : le dépistage chez des *sujets asymptomatiques* au moyen des tests doit conduire à l'identification des *sujets surchargés au stade préclinique* et les saignées thérapeutiques doivent permettre une *issue favorable en termes d'espérance de vie*.

Pour procéder à une telle évaluation, l'idéal serait de conduire un essai randomisé comparant l'issue clinique dans une population qui a été dépistée (et si nécessaire traitée) à ce qui se passe dans

une population non dépistée. Si ce type d'étude n'existe pas, on peut toutefois évaluer les valeurs prédictives des tests diagnostiques. On peut ensuite apprécier l'efficacité du traitement.

Evaluation économique d'un programme de dépistage de masse : il faut procéder à une analyse coût/efficacité dans laquelle le critère de résultat est le nombre d'années de vie gagnées. Ces études doivent tenir compte de tous les coûts : coûts directs et indirects du dépistage, mais aussi coûts organisationnels.

Faisabilité et acceptabilité d'un programme de dépistage de masse : on doit tenir compte du pourcentage attendu de la population cible qui participera réellement au programme de dépistage. Il faut tenir compte également de l'adhésion des participants à l'ensemble de la démarche diagnostique et de l'observance du traitement, à vie dans le cas de l'hémochromatose.

Résultats

Les résultats sont basés sur les données scientifiques réexaminées jusqu'en 1995. A cette date, les tests de dépistage étaient de nature biologique. La détermination de la saturation de la transferrine et de la ferritinémie avait des valeurs prédictives satisfaisantes pour l'hémochromatose. Cependant, la reproductibilité des tests était mauvaise et il était nécessaire de définir des valeurs seuils appropriées à la population générale. En outre, la ponction biopsie hépatique était nécessaire pour confirmer le diagnostic. Le taux de mortalité de la ponction biopsie se situe entre 0,5-3/1000 [84-86].

Concernant l'efficacité du traitement, il a été montré que si les saignées sont mises en œuvre précocement on peut obtenir une réduction de la mortalité et de la morbidité.

Concernant l'évaluation économique, il n'existe aucune donnée publiée ayant pris en compte l'ensemble des coûts impliqués pour pouvoir analyser correctement le coût/efficacité d'un tel dépistage de masse.

Concernant la faisabilité, c'est un fait que l'hémochromatose est restée méconnue des médecins et de la population générale. On pouvait donc s'attendre à ce qu'un petit pourcentage seulement de la population générale participe au programme de dépistage. Cette hypothèse s'appuie sur les observations faites en France à propos du dépistage du cancer du sein, pour lequel la proportion n'est que de 40-50%, le cancer du sein étant de plus, et sans nul doute, une maladie mieux connue que l'hémochromatose.

En outre, deux études ont montré qu'un pourcentage de patients allant jusqu'à 55% refusent la ponction biopsie du foie et abandonnent le programme de dépistage. On peut aussi se poser la question de savoir ce que deviendra l'observance du traitement par saignées thérapeutiques sur le long terme.

Conclusion

Vu la faiblesse de la faisabilité et de l'acceptabilité, l'ANDEM n'a pas recommandé au Ministère de la Santé en octobre 1995 la mise en œuvre en France d'un programme de dépistage de masse de l'hémochromatose. A la place, il a été proposé de développer le dépistage individuel de façon à permettre un diagnostic et un traitement plus précoces de l'hémochromatose. Cette conclusion pourrait être réexaminée à la lumière des dernières avancées du test génétique.

Propositions en vue de la mise en place d'un système de dépistage limité basé sur les structures existantes des services de santé français

Un système utilisant les structures existant en France pour développer le dépistage généralisé de l'hémochromatose a été proposé par l'Association Hémochromatose France.

Arguments en faveur de la proposition

Deux éléments fondamentaux doivent être pris en compte pour planifier un tel programme :

- L'hémochromatose apparaît jusqu'ici comme la plus fréquente des maladies génétiques potentiellement fatales là où le dépistage généralisé des populations a été mis en place. Même si elle peut être traitée avec succès quand elle est décelée au début, il est souhaitable, et plus rentable, de la repérer avant l'apparition des symptômes. Aucune mesure efficace n'a été encore prise dans ce sens par les pouvoirs publics français. Il semble cependant que la découverte récente du gène HFE pourrait entraîner un réexamen des positions, car il est maintenant plus évident que les mesures de prévention seront moins coûteuses que le traitement au long cours nécessaire à la prise en charge des patients, que le diagnostic ait été fait ou non.
- On attachera beaucoup d'intérêt à la décision récente des Centers for Disease Control (CDC) d'Atlanta (Etats-Unis d'Amérique) de recommander à l'échelle nationale la mesure du niveau de fer dans l'organisme, ce qui, entre autres, devrait permettre de déceler l'hémochromatose; le dépistage commencera à partir de 18 ans et s'appuiera sur un seul test, le plus fiable pour le diagnostic de l'hémochromatose, à savoir la mesure du coefficient de saturation de la transferrine à jeun, en prenant un seuil de 50% de façon à pouvoir inclure les femmes. Les études réalisées aux Etats-Unis d'Amérique ont montré la bonne rentabilité du dépistage à l'échelle nationale.

Méthodologie proposée

Pour ce qui est de la France, les impératifs de rentabilité devraient plutôt mener à un dépistage utilisant uniquement les structures de santé existantes comme on l'a mentionné plus haut. On serait ainsi amené à utiliser les centres d'examen de santé, qui existent dans la presque totalité des 95 départements français, en ajoutant seulement la mesure de la saturation de la transferrine à la liste des épreuves biologiques réalisées en routine dans ces centres. Ce test doit aussi être inclus systématiquement dans la batterie de tests dans tous les endroits où l'on pratique des examens de médecine préventive: universités, armée, usines et administrations, cabinets médicaux privés, services qui réalisent les examens pré-nuptiaux, etc. Le coût serait faible si l'on considère que ce test, lorsque le résultat est normal, n'a besoin d'être fait qu'une fois au cours de la vie, deux tout au plus par mesure de sécurité.

La confirmation du diagnostic chez les quelques cas suspectés après dépistage sérologique sera notablement simplifiée grâce à la découverte récente du gène HFE, de même que le dépistage familial.

Conclusion

Un programme limité de dépistage de l'hémochromatose avant l'apparition des symptômes est maintenant faisable en France si l'on adopte la stratégie suivante :

- a) ajouter la saturation de la transferrine à la liste des examens biologiques réalisés en routine partout où sont effectués des examens de santé à visée préventive;
- b) procéder à un examen complémentaire du gène HFE chez les cas suspectés, suivi d'un dépistage familial des mutations du gène HFE pour tous les cas confirmés.

Un tel programme doit bien sûr intégrer des actions adaptées d'information et d'éducation en direction des praticiens et du public; la mise en évidence de nouveaux cas décelés lors du dépistage aura d'ailleurs automatiquement un effet éducatif.

ii) Coût/avantages du dépistage en population de l'hémochromatose

Introduction

On préférera s'attacher à identifier les personnes à risque pour la survenue des séquelles de l'hémochromatose. Le protocole consiste à examiner une population de sujets asymptomatiques, sans antécédents personnels ou familiaux laissant présumer un risque plus élevé de cette maladie que dans le reste de la population. L'objectif est de déceler la maladie chez des sujets présymptomatiques de façon à administrer un traitement qui sera plus efficace dans les premiers stades de l'évolution [10,87]. Les programmes de dépistage étant à leurs débuts associés à une augmentation des coûts pour les services de santé, il est impératif que la planification des protocoles de dépistage tienne compte de l'ensemble des risques et des avantages, et de bien étudier avant de la mettre en œuvre la stratégie diagnostique appliquée à la maladie. Le dépistage en population de l'hémochromatose remplit l'ensemble des critères fixés par l'Organisation mondiale de la Santé pour le dépistage d'une maladie.

Dépistage phénotypique en population de l'hémochromatose

Diverses études par dépistage ont été menées sporadiquement pour définir l'intérêt des divers tests et la prévalence de l'hémochromatose. Parmi les populations cibles, on trouvait des donneurs de sang [61,76,78,88], des hospitalisés [62,89], des patients ambulatoires [60], des employés de banque [90], des diabétiques [91] et des recrues de l'armée [92]. Le test initial et les seuils employés étaient différents suivant les études, et parmi eux on citera la sidérémie, la capacité latente de fixation du fer, la saturation de la transferrine, la ferritinémie et des associations de ces différents tests. Toutes ces études ont fait appel au dépistage phénotypique plutôt qu'au dépistage génotypique. Elles ont toutes débouché sur la découverte d'homozygotes méconnus, et le dépistage en population a été recommandé.

Dépistage génétique en population de l'hémochromatose

Une étude de grande ampleur a été réalisée chez 2375 nouveau-nés australiens. Elle a mis en évidence une prévalence de 1 homozygote pour la mutation C282Y pour 150 nouveau-nés [93]. Une étude en population réalisée dans l'ouest de l'Australie a montré une fréquence chez l'adulte de 1 pour 200 [94]. Dans la mesure où un grand nombre de patients sont maintenant décrits comme homozygotes pour la mutation C282Y sans toutefois exprimer de surcharge en fer [95, 96], la place du test génétique en tant que test de dépistage de première intention dépend en grande partie de la prévalence des homozygotes «non expressifs» dans la population générale.

Coût du dépistage de l'hémochromatose : études antérieures

Plusieurs études se sont servies de l'analyse décisionnelle pour prévoir le rapport coût/efficacité du dépistage de l'hémochromatose. Deux études utilisant des cohortes hypothétiques et les estimations de la littérature ont conclu que le dépistage de l'hémochromatose devait conduire à faire des économies [97,98]. Phatak et al. ont conclu que le dépistage de l'hémochromatose dans une population masculine blanche se solde par un rapport coût/efficacité favorable en tenant compte d'une grande variété hypothèses, et que le dépistage devait être rapidement testé en appliquant des stratégies prospectives de grande envergure [98]. Adams et al. ont mis au point un modèle d'analyse décisionnelle s'appuyant sur 30 années d'expérience clinique avec les hémochromatosiques. Le coût du dépistage de l'hémochromatose au stade présymptomatique a été comparé au coût du traitement des complications une fois survenues [99]. La conclusion de leur étude est qu'il est indispensable que le test de dépistage phénotypique initial soit bon marché (moins de USD 8.-) si le programme de dépistage est censé déboucher sur des économies (stratégie dominante). Dans la plupart des études, la détermination de la saturation de la transferrine revient approximativement à USD 22.- et, ne répondant pas au critère financier, ne peut donc être considérée comme un test de dépistage idéal. La

détermination de la capacité latente de fixation du fer (USD 5.-) a été étudiée en tant que test phénotypique bon marché, avec confirmation du diagnostic par le géotypage [88]. D'après l'analyse décisionnelle, le coût du test génétique doit être inférieur à USD 20.- pour que le programme engendre des économies [100].

Populations cibles du dépistage de l'hémochromatose

Il n'est pas raisonnable d'attendre l'apparition des symptômes pour diagnostiquer l'hémochromatose. Un grand nombre de symptômes passent inaperçus et les lésions organiques sont en général déjà présentes à l'apparition des manifestations cliniques [80]. Parmi les cas indicateurs masculins, 43% étaient atteints de cirrhose du foie (complication irréversible) au moment du diagnostic. La cirrhose n'était par contre présente que chez 6% des membres de la fratrie asymptomatiques qui ont été examinés [80]. On a observé aux Etats-Unis d'Amérique dans une série de 37 patients hémochromatosiques ayant nécessité une greffe du foie que le diagnostic d'hémochromatose était méconnu chez 13 d'entre eux au moment de la greffe (soit 35%) [101].

Les études par dépistage ont pour la plupart été réalisées chez des donneurs de sang. L'avantage principal de ce groupe est la disponibilité de sujets pour les tests sanguins au moment du don de sang. Les donneurs de sang sont en général jeunes, par ailleurs en bonne santé, et, en cas de pathologie, susceptibles d'être dans la phase présymptomatique de la maladie. L'inconvénient est que ce groupe de population ne représente qu'une petite partie de la population générale et que les dons de sang réguliers diminuent le stock de fer, de sorte que le nombre d'homozygotes découverts par le dépistage phénotypique est sous-estimé.

Le dépistage phénotypique au cabinet du médecin de famille a plusieurs inconvénients : a) un problème logistique nouveau apparaît avec la collecte et le transport des prélèvements de sang; b) la probabilité d'avoir des faux positifs est plus grande chez les patients présentant une pathologie, en raison des effets de l'inflammation sur la saturation de la transferrine et sur la ferritine; c) la répartition par âge donne plus d'importance aux tranches âgées, ces personnes risquant d'avoir déjà des lésions organiques au moment du diagnostic.

Dans un grand nombre de systèmes de soins, l'examen de santé périodique chez des sujets asymptomatiques n'est pas recommandé.

Le dépistage dans les services recevant des diabétiques et des arthritiques a également été étudié [91,102,103]. Lorsque le diabète est présent, les lésions organiques le sont aussi clairement et l'arthrite est une cause fréquente d'élévation de la ferritinémie, ce qui augmente le nombre de faux positifs chez lesquels seront pratiqués ensuite des examens invasifs. Le dépistage génétique dans le cadre d'un service destiné aux arthritiques devrait permettre d'améliorer l'algorithme de dépistage.

Conclusion

A l'heure actuelle, il apparaît que les études par dépistage en population continueront d'associer les dépistages phénotypique et géotypique. Les problèmes qui se poseront à l'avenir seront de concevoir une méthode optimale de sondage de la population et d'obtenir le soutien financier des systèmes de soins.

iii) Problèmes éthiques du dépistage génétique de l'hémochromatose : la situation en France [104-108]

Introduction

Des recommandations concernant l'utilisation d'un test prédictif applicable au dépistage de nombreuses maladies héréditaires ont été formulées par des comités formels ou informels. En France, les tests prédictifs ou le diagnostic moléculaire d'une affection génétique sont en partie réglementés par la loi. Les tests prédictifs peuvent être proposés aux membres de la famille des sujets atteints ou à la population générale (dépistage en population).

La mise en œuvre et l'interprétation des tests sont parfois compliqués, et les implications sociales, psychologiques et éthiques du dépistage sont nombreuses; il faut donc les repérer et en tenir compte à l'avance.

Aspects pratiques

Trois situations doivent être envisagées :

a) Un test moléculaire est nécessaire pour confirmer le diagnostic d'une maladie héréditaire

Il est nécessaire de recueillir le consentement éclairé du patient (si possible). Les éléments fondamentaux du consentement éclairé sont : i) une information sur le test à réaliser; ii) les implications du résultat, positif ou négatif, le test peut ne pas être informatif; iii) risques pour la famille, en particulier pour la fratrie, en cas de résultat positif.

Deux questions devront être posées : i) le patient a-t-il l'obligation de porter à la connaissance des membres de sa famille également à risque une information génétique ? ii) un médecin a-t-il le droit (ou l'obligation) d'avertir la famille d'un patient du risque génétique possible ? En France, la réponse aux deux questions est non. Le patient peut communiquer l'information, mais il n'en a pas l'obligation.

b) Dépistage génétique d'une maladie héréditaire (hémochromatose) dans la fratrie (ou chez les parents au premier degré) des sujets atteints

Le conseil génétique individualisé doit précéder le dépistage génétique. Il est demandé aux personnes qui décident de procéder au test de lire le formulaire de consentement qui a été décrit au cours du conseil. Le formulaire de consentement ne concerne pas que les informations sur le test, mais également les différentes solutions médicales applicables à la surveillance.

c) Dépistage en population

Le dépistage en population touche essentiellement le nouveau-né (phénylcétonurie, par exemple) ou la femme enceinte (trisomie 21, par exemple). Certains arguments sont en faveur du dépistage en population de l'hémochromatose chez le jeune adulte. D'autres recherches sont nécessaires avant de pouvoir proposer un dépistage de masse. Les recherches devront porter : i) sur la détermination des risques (pénétrance) associés aux différentes mutations du gène HFE; ii) sur la recherche d'autres locus impliqués dans l'hémochromatose génétique; iii) sur l'identification des mesures de prévention et de surveillance optimales. Des études pilotes sont nécessaires dans ce domaine. Il est en outre nécessaire de disposer de «directives internationales» applicables aux tests prédictifs utilisant la génétique moléculaire. Ces directives traiteront du conseil génétique, du consentement éclairé et des stratégies de prévention.

5. RECOMMANDATIONS FINALES

i) Recherche des mutations du gène HFE pour le diagnostic de l'hémochromatose

La plupart des patients de race blanche porteurs du phénotype classique de l'hémochromatose sont homozygotes pour la mutation C282Y du gène HFE. Par conséquent, devant une surcharge en fer inexplicée, on estime que la recherche d'une homozygotie pour la mutation C282Y est la meilleure approche diagnostique de l'hémochromatose d'origine génétique, c'est-à-dire liée au CMH. L'homozygotie pour la mutation C282Y se caractérise par une augmentation de la saturation de la transferrine quand il y a surcharge en fer. Cependant, une proportion encore indéterminée d'homozygotes C282Y ne manifestent pas d'anomalies du métabolisme du fer, ce qui s'observe chez environ 6% des hommes et 32% des femmes en Australie.

D'autres génotypes HFE (hétérozygotes pour la mutation C282Y, hétérozygotes et homozygotes pour la mutation H63D, patients sans mutation connue) ne sont généralement pas associés à une surcharge en fer importante. Les hétérozygotes composites ont un risque d'avoir un phénotype d'hémochromatose, mais ne présentent en général pas de surcharge en fer importante. On note cependant qu'un petit nombre de patients porteurs du phénotype classique d'hémochromatose ne sont pas homozygotes pour la mutation C282Y. On peut donc présumer que d'autres facteurs inconnus, génétiques ou environnementaux, pourraient être impliqués dans l'hémochromatose génétique; il est donc souhaitable de réaliser d'autres recherches dans les régions où l'incidence de ces cas est maximale.

Recommandations

- La recherche de la mutation C282Y sera la première étape du diagnostic devant des signes de surcharge en fer, c'est-à-dire lorsque la saturation de la transferrine est augmentée.
- La recherche de la mutation C282Y n'est pas indiquée quand la saturation de la transferrine est normale.
- La recherche de la mutation H63D n'est généralement pas conseillée en pratique clinique. Elle peut toutefois être envisagée devant certains cas, lorsque la mutation C282Y s'exprime chez des hétérozygotes par exemple.
- Une importante action d'information doit être conduite pour éduquer les professionnels de la santé.

ii) Dépistage généralisé

Il est souhaitable que le dépistage de l'hémochromatose génétique soit réalisé par tous les cliniciens avant la survenue de la phase symptomatique. Le dépistage doit permettre de repérer au moins les homozygotes C282Y. Cependant, en raison de son coût élevé et de l'absence d'expression des homozygotes C282Y parfois observée, le dépistage génotypique en première intention n'est pas considéré comme la meilleure stratégie. Celle-ci consiste donc à utiliser le dépistage phénotypique de première intention en mesurant la saturation de la transferrine, le matin à jeun, et, si elle est augmentée, en recherchant ensuite la mutation C282Y. Les seuils appropriés ne sont toutefois pas clairement définis, mais doivent se situer dans la fourchette 40-50% chez les deux sexes. La détermination de la capacité latente de fixation du fer est un test de première intention moins coûteux et est en cours d'évaluation. Le diagnostic doit déboucher sur un traitement par saignées thérapeutiques en cas de surcharge en fer.

Le dépistage systématique soulève des problèmes médicaux, financiers et éthiques.

- Au plan médical : avec la méthode de dépistage proposée, on ignore la proportion attendue de patients non homozygotes pour la mutation C282Y ayant une augmentation inexplicée de la saturation de la transferrine; on ignore aussi la prise en charge qu'il convient de leur proposer.

- Au plan financier : on évalue difficilement la rentabilité éventuelle d'un dépistage généralisé.
- Au plan éthique : il convient de peser les avantages et les inconvénients respectifs du diagnostic d'homozygotie chez un sujet asymptomatique d'une part et du diagnostic tardif avec les conséquences qui l'accompagnent d'autre part.

Recommandations

Le dépistage généralisé implique un dépistage phénotypique de première intention suivi d'un dépistage génotypique chez une faible proportion de cas suspectés, et sa désignation correcte doit donc être "dépistage de masse des niveaux de fer". Il peut occasionnellement conduire à la détection d'autres maladies, un argument en faveur de son acceptabilité et de sa faisabilité.

La faisabilité d'un tel dépistage de masse devra être évaluée d'urgence au moyen d'études en population réalisées dans divers pays.

- Les organismes sanitaires et les compagnies d'assurance seront informés au sujet de la maladie, de façon à éviter une pénalisation injustifiée des homozygotes C282Y asymptomatiques.

iii) Dépistage familial

Le dépistage parmi les proches des homozygotes pour la mutation C282Y est efficace et fortement recommandé.

Recommandations

- Patients et corps médical seront sensibilisés aux avantages et aux inconvénients du dépistage familial, en fonction de la législation en vigueur dans chaque pays.
- Les proches doivent recevoir une information sur les différentes options médicales (dépistage phénotypique, test génétique ou surveillance) et sur leurs conséquences.
- Le consentement éclairé sera recueilli auprès des proches qui procèdent au test génétique.

6. LISTE DES PARTICIPANTS

Dr Paul Adams, Liver Disease - Gastroenterology, University Hospital, 399 Windermere Road,
P.O. Box 5339, London, Ontario, Canada N6A 515

Dr James Barton, Southern Iron Disorders Center, 2022 Brookwood Medical Center Drive,
Suite G-105 ACC, Birmingham, Alabama 35209, Etats-Unis d'Amérique (empêché, mais d'accord
avec le texte après examen)

Dr Pierre Brissot, Clinique des Maladies du Foie, INSERM U-49, CHU Pontchaillou,
35033 Rennes CEDEX, France

Mme Roberta Crawford, Chairperson, Iron Overload Diseases (IOD), 433 Westwind Drive, North
Palm Beach, FL 33408-5123, Etats-Unis d'Amérique

Dr Véronique David, Laboratoire de Génétique moléculaire, CHU Pontchaillou,
35033 Rennes CEDEX, France

Dr Yves Deugnier, Clinique des Maladies du Foie, INSERM U-49, CHU Pontchaillou,
35033 Rennes CEDEX, France (Coprésident)

Dr Josué Feingold, Université Paris VII, Unité 155, Tour 16 - 3^e étage, Case 7041, 2 place Jussieu,
75005 Paris, France

Dr Frédéric Fleurette, ANDEM, 159 rue Nationale, 75640 Paris CEDEX 13, France

Dr Romain Moirand, Clinique des Maladies du Foie, INSERM U-49, CHU Pontchaillou,
35033 Rennes CEDEX, France (Rapporteur)

Dr Alberto Piperno, Ospedale S. Gerardo Divisione di Medicina Generale I, Monza, Italie

Dr Lawrie W. Powell, Queensland Institute of Medical Research, Royal Brisbane Hospital, The
Bancroft Centre, 300 Herston Road, Herston, Queensland 4006, Australie, et Représentant de
l'Haemochromatosis Society Australia Inc. (Coprésident)

SECRETARIAT DE LA FONDATION HÉMOCHROMATOSE

Dr Margit A. Krikker, President, 164 Colonial Avenue, P.O. Box 8569, Albany, NY 12208-0569,
Etats-Unis d'Amérique

SECRETARIAT DE L'ASSOCIATION HÉMOCHROMATOSE CANADA

Mme Charm Cottingham, Présidente, #272, 7000 Minoru Blvd., Richmond, B.C., Canada V6Y 3Z5

SECRETARIAT DE L'ASSOCIATION HÉMOCHROMATOSE FRANCE

M. Pierre-Marie Morel, Président, BP 7777, F-30912 Nîmes CEDEX, France
Dr P. Delon, Consultant OMS de l'Association Hémochromatose France, 1 avenue de Lattre
de Tassigny, F-30600 Vauvert, France

SECRETARIAT DE L'ASSOCIATION HÉMOCHROMATOSE ROYAUME-UNI

Mme Janet Fernau, Hollybush House, Hadley Green Road, GB-Barnet, Herts, EN5 5PF, Royaume-Uni

Professeur Martin J. Pippard, Professor of Haematology, University of Dundee, Ninewells Medical School, GB-Dundee DD1 9SY, Royaume-Uni

Dr Mark Worwood, Reader in Haematology, University of Wales College of Medicine, Heath Park, GB-Cardiff CF4 4XN, Royaume-Uni

OBSERVATEUR

Dr Jacqueline Yaoanq, Epidémiologie et Hygiène hospitalière, CHU Pontchaillou, Rennes, France

SECRETARIAT OMS

Dr Victor Boulyjenkov, Génétique humaine, Division des Maladies non transmissibles, OMS, CH-1211 Genève 27, Suisse (Secrétaire)

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Worwood M. The laboratory assessment of iron status - an update. *Clin. chim. Acta*, 1997, **259**: 3-23
2. Witte D, Crosby W, Edwards C et al. Hereditary Hemochromatosis. Practice Guideline Development Task Force of the College of American Pathologists. *Clin. chim. Acta*, 1996, **245**: 139-200
3. Iron Panel of the International Committee for Standardization in Haematology. Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood. *Brit. J. Haemat.*, 1990, **75**: 615-616
4. Fujita T, Hamasaki H, Furukata C et al. New enzymatic assay of iron in serum. *Clin. Chem.*, 1994, **40/5**: 763-767
5. Yamada M, Tanioka K, Kishi K et al. An automated method for measurement of serum iron and unsaturated iron binding capacity using nitroso-PSAP. *Jpn J. Lab. Auto*, 1988, **13**: 659-663
6. Markowitz H, Fairbanks VF. Transferrin assay and total iron-binding capacity. *Mayo Clin. Proc.*, 1983, **58**: 827-828
7. Huebers HA, Eng MJ, Josephson BM et al. Plasma iron and transferrin iron-binding capacity evaluated by colorimetric and immunoprecipitation methods. *Clin. Chem.*, 1987, (**33**): 273-277
8. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin. Chem.*, 1994, **40/6**: 934-938
9. Vernet M, Poggi B, Biennu F et al. Incidence de la standardisation du dosage de la transferrine sérique par le CRM 470 sur le coefficient de saturation en fer de la transferrine. *Ann. Biol. clin.*, 1996, **54** : 171-175

10. Edwards CQ, Kushner JP. Screening for hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**(22): 1616-1620
11. Edwards CQ, Griffen LM, Kaplan J et al. Twenty-four hour variation of transferrin saturation in treated and untreated haemochromatosis homozygotes. *J. intern. Med.*, 1989, **226**(5): 373-379
12. Bulaj Z, Griffen L, Jorde L et al. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**: 1799-1805
13. Brissot P, Deugnier Y, Le Treut A, Regnouard F, Simon M, Bourel M. Ascorbic acid status in idiopathic hemochromatosis. *Digestion*, 1978, **17**(6): 479-487
14. Wapnick AA, Lynch SR, Krawitz P et al. Effects of iron overload on ascorbic acid metabolism. *Br. Med. J.*, 1968, **3**(620): 704-707
15. Thorpe SJ et al. International collaborative study to evaluate a recombinant L ferritin preparation as an International Standard. *Clinical Chemistry*, 1997, **43**(9): 1582-1587
16. Dawkins SJ, Cavill I, Ricketts C et al. Variability of serum ferritin concentration in normal subjects. *Clin. Lab. Haematol.*, 1979, **1**: 41-46
17. Custer EM, Finch CA, Sobel RE et al. Population norms for serum ferritin. *J. Lab. clin. Med.*, 1995, **126**: 88-94
18. Moirand R, Lescoat G, Delamaire D et al. Increase of glycosylated and non glycosylated serum ferritin in chronic alcoholism and evolution during alcohol withdrawal. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1991, **15**: 963-969
19. Moirand R, Kerdavid F, Loreal O et al. Regulation of ferritin expression by alcohol in a human hepatoblastoma cell line and in rat hepatocyte cultures. *J. Hepatol.*, 1995, **23**: 431-439
20. Lainé F, Guyader D, Turlin B et al. Hyperferritinémie et maladie de Gaucher. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1996, **20** : 512-513
21. Beutler E. Gaucher Disease. *Blood Rev.*, 1988, **2**: 59-70
22. Girelli D, Olivieri O, De Franceschi L et al. A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract. *Br. J. Haematol.*, 1995, **90**(4): 931-934
23. Beaumont C, Leneuve P, Devaux I et al. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nature Genet.*, 1995, **11**: 444-446
24. Roeser HP. The role of ascorbic acid in the turnover of storage iron. *Semin. Hematol.*, 1983, **20**: 91-100
25. Deugnier YM, Loréal O, Turlin B et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. *Gastroenterology*, 1992, **102**(6): 2050-2059

26. Moirand R, Abdel Majid M, Paillard F et al. Liver iron overload with normal transferrin saturation: a new syndrome. *Lancet*, 1997, **349**: 95-97
27. Feder J, Gnirke A, Thomas W et al. A novel MHC class-I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.*, 1996, **13**: 399-408
28. Yoshida K, Furihata K, Takeda S et al. A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nature Genetics*, 1995, **9**: 267-272
29. Hershko C, Graham G, Bates GW et al. Non-specific serum iron in thalassaemia. An abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br. J. Haematol.*, 1978, **40**: 255-263
30. Batey RG, Lai-Chung-Fong P, Shamir S et al. A non-transferrin-bound serum iron in idiopathic hemochromatosis. *Dig. Dis. Sci.*, 1980, **25**(5): 340-346
31. Aruoma OI, Bomford A, Polson RJ et al. Non-transferrin-bound iron in plasma from hemochromatosis patients: Effect of phlebotomy therapy. *Blood*, 1988, **72**: 1416-1419
32. Gutteridge JM, Rowley DA, Griffiths E et al. Low-molecular-weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin. Sci.*, 1985, **68**(4): 463-467
33. Brissot P, Wright T, Ma W et al. Efficient clearance of non-transferrin-bound iron in rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states. *J. Clin. Invest.*, 1985, **76**: 1463-1470
34. Wright TL, Brissot P, Ma WL et al. Characterization of non-transferrin-bound iron clearance by rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**: 2997-3004
35. Singh S, Hider RC, Porter JB. A direct method for quantification of non-transferrin-bound iron (NTBI). *Anal. Biochem.*, 1991, **186**: C323
36. Simon M, Bourel M, Fauchet R et al. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut*, 1976, **17**(5): 332-334
37. Yaouanq J, Perichon M, Chorney M et al. Anonymous marker loci within 400 kb of HLA-A generate haplotypes in linkage disequilibrium with the hemochromatosis gene (HFE). *Amer. J. hum. Genet.*, 1994, **54**(2): 252-263
38. Jazwinska EC, Lee SC, Webb SI et al. Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Amer. J. hum. Genet.*, 1993, **53**(2): 347-352
39. Raha-Chowdhury R, Bowen D, Stone C et al. New polymorphic microsatellite markers place the hemochromatosis gene telomeric to D6S105. *Hum. Mol. Genet.*, 1995, **4**: 1869-1874
40. Rothenberg B, Voland J. b2 knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1993, 1529-1534
41. Feder J, Tsuchihashi Z, Irrinki A et al. The founder mutation in HLA-H disrupts b2 microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**: 14025-14028

42. Jazwinska E, Cullen L, Busfield F et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet.*, 1996, 14: 249-251
43. Jouanolle A, Gandon G, Jézéquel P et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet.*, 1996, 14: 251-252
44. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A et al. Mutation Analysis of the HLA-H Gene in Italian Hemochromatosis Patients. *Amer. J. hum. Genet.*, 1997, 60: 828-832
45. Powell L, Jazwinska E, Halliday J. Primary iron overload. Dans: Brock J, Halliday J, Pippard M, Powell L. Iron metabolism in health and disease. Londres: Saunders, 1994; 227-270
46. Fargion S, Mandelli C, Piperno A et al. Survival and prognostic factors in 212 Italian patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*, 1992, 15(4): 655-659
47. Piperno A, Fargion S, D'Alba R et al. Liver damage in Italian patients with hereditary hemochromatosis is highly influenced by hepatitis B and C virus infection. *J. Hepatol.*, 1992, 16(3): 364-368
48. Loréal O, Deugnier Y, Moirand R et al. Liver fibrosis in genetic hemochromatosis. Respective roles of iron and non-iron-related factors in 127 homozygous patients. *J. Hepatol.*, 1992, 16(1-2): 122-127
49. Adams P, Deugnier Y, Moirand R, Brissot P. The relationship between iron overload, clinical symptoms and age in 410 patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*, 1997, 25: 162-166
50. Crawford DH, Halliday JW, Summers KM. Concordance of iron storage in siblings with genetic hemochromatosis: evidence for a predominantly genetic effect on iron storage. *Hepatology*, 1993, 17(5): 833-837
51. Crawford DH, Powell LW, Leggett BA et al. Evidence that the ancestral haplotype in Australian hemochromatosis patients may be associated with a common mutation in the gene. *Amer. J. hum. Genet.*, 1995, 57(2): 362-367
52. Piperno A, Arosio A, Fargion S et al. The ancestral hemochromatosis haplotype is associated with severe phenotype expression in Italian patients. *Hepatology*, 1996, 24: 43-46
53. Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. HLA typing in idiopathic hemochromatosis: distinction between homozygotes and heterozygotes with biochemical expression. *Hepatology*, 1981, 1(2): 120-126
54. Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology*, 1986, 6(1): 24-29
55. Perkins K, McInnes I, Blackburn C et al. Idiopathic hemochromatosis in children. Report of a family. *Amer. J. Med.*, 1965, 39: 118-126
56. Witte D, Crosby W, Edwards C et al. Practice parameter for hereditary hemochromatosis. *Clin. chim. Acta*, 1996, 245: 139-200

57. Barton J, Harmon L, Rivers C et al. Hemochromatosis: association of severity of iron overload with genetic markers. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1996, **22**: 195-204
58. Wurapa R, Gordeuk V, Brittenham G et al. Primary iron overload in African-Americans. *Amer. J. Med.*, 1996, **101**: 9-18
59. Barton J, Edwards C, Bertoli L et al. Iron overload in African Americans. *Amer. J. Med.*, 1995, **99**: 616-623
60. Baer DM, Simons JL, Staples RL et al. Hemochromatosis screening in asymptomatic ambulatory men 30 years of age and older. *Amer. J. Med.*, 1995, **98**(5): 464-468
61. Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D et al. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N. Engl. J. Med.*, 1988, **318**: 1355-1362
62. Balan V, Baldus W, Fairbanks V et al. Screening for hemochromatosis: a cost-effectiveness study based on 12,258 patients. *Gastroenterology*, 1994, **107**(2): 453-459
63. McLaren CE, Gordeuk VR, Looker AC et al. Prevalence of heterozygotes for hemochromatosis in the white population of the United States. *Blood*, 1995, **86**(5): 2021-2027
64. Phatak P, Sham R, Dunigan K et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in primary care. *Blood*, 1996, **88**: 490a
65. Beutler E, Gelbart T, West C et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1996, **22**: 187-194
66. DeLoughery T, Wisner T, Evans A et al. Molecular detection and gene frequency in control populations of the common Cys282Tyr mutation implicated in hereditary hemochromatosis. *Blood*, 1996, **88**: 490a
67. Barton J, Shih W, Sawada-Hirai R et al. Genetic and clinical description of hemochromatosis probands and heterozygotes: evidence that multiple genes linked to the major histocompatibility complex are responsible for hemochromatosis. *Blood Cell. Mol. Dis.*, 1997, **23**(8): 135-145
68. Edwards CQ, Dadone MM, Skolnick MH, Kushner JP. Hereditary haemochromatosis. *Clin. Haematol.*, 1982, **11**(2): 411-435
69. Barton J, Alford T, Bertoli L et al. Histochemically demonstrable hepatic iron excess in African Americans. *Blood*, 1995, **86**: 128a
70. Assessment of the iron nutritional status of the U.S. population based on data collected in the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976. 1980. Dans: Pilch S, Senti F. Bethesda: Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology, 1984, A-49
71. Barton J, Shih W, Sawada-Hirai R et al. Caucasian hemochromatosis mutation Cys282Tyr in African American iron overload. Iron Overload, Public Health and Genetics. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, 1997

72. Barton J, Rivers C, Harmon L et al. D6S105 allele 8 (D6S105[38]) frequencies in African American iron overload (AAIO) probands, Caucasian hemochromatosis (H) probands, and normal control subjects from Alabama. *Blood*, 1996, **88**: 490a
73. Acton R, Harmon L, Go R et al. Comparison of HLA phenotypes among African Americans from Alabama, Maryland and North Carolina. *Transplant Proc.*, 1993, **25**: 2404-2407
74. Brissot P, Deugnier Y. Genetic Haemochromatosis. Dans: McIntyre N, Benhamou J, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J. Oxford Textbook of Clinical Hepatology. Oxford University Press, 1991: 948-958, Vol. 2
75. Summers KM, Halliday JW, Powell LW. Identification of homozygous hemochromatosis subjects by measurement of hepatic iron index. *Hepatology*, 1990, **12**(1): 20-25
76. Velati C, Piperno A, Fargion S et al. Prevalence of idiopathic hemochromatosis in Italy: study of 1301 blood donors. *Haematologica*, 1990, **75**(4): 309-312
77. Jonsson JJ, Johannesson GM, Sigfusson N et al. Prevalence of iron deficiency and iron overload in the adult Icelandic population. *J. clin. Epidemiol.*, 1991, **44**(12): 1289-1297
78. Wiggers P, Dalhoj J, Kiaer H et al. Screening for haemochromatosis: prevalence among Danish blood donors. *J. intern. Med.*, 1991, **230**(3): 265-270
79. Yaouanq J. Hémochromatose génétique. Etude de prévalence en Bretagne, marqueurs moléculaires associés au gène et leurs applications au conseil génétique [Thèse de Doctorat en Sciences biologiques]. Rennes, Université de Rennes-I, 1993, 151 pages
80. Adams PC, Kertesz AE, Valberg LS. Clinical presentation of hemochromatosis: a changing scene. *Amer. J. Med.*, 1991, **90**(4): 445-449
81. Edwards CQ, Cartwright GE, Skolnick MH et al. Homozygosity for hemochromatosis: clinical manifestations. *Ann. intern. Med.*, 1980, **93**(4): 519-525
82. Aellen P, Guerne PA, Zenagui D, Vischer TL. L'arthropathie de l'hémochromatose : manifestation souvent inaugurale de la maladie. *Schweiz med. Wschr.*, 1992, **122**(22): 842-849
83. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A et al. Survival and causes of death in cirrhotic and in non cirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.*, 1985, **313**(20): 1256-1262
84. Chuah S, Woody G, Wicks A et al. A nationwide survey of liver biopsy. Is there a need to increase resources, manpower and training? *Hepatogastroenterology*, 1994, **41**: 4-8
85. Froehlich F, Lamy O, Fried M et al. Practice and complications of liver biopsy - results of a nationwide survey in Switzerland. *Dig. Dis. Sci.*, 1993, **38**(8): 1480-1484
86. McGill D, Makela J, Zinsmeister A et al. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology*, 1990, **99**: 1396-1400
87. Powell L. Hemochromatosis: the impact of early diagnosis and therapy. *Gastroenterology*, 1996, **110**: 1304-1307

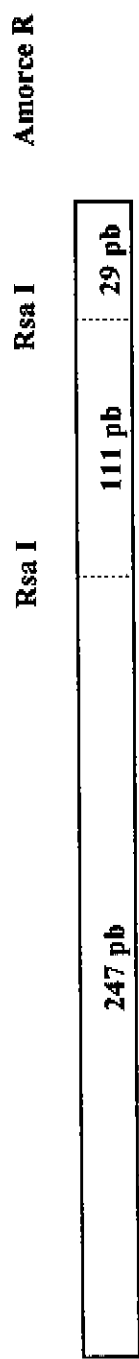
88. Adams P, Kertesz A, Barr R et al. Population screening for hemochromatosis with the unbound iron binding capacity [Abstract]. *Gastroenterology*, 1998 (sous presse)
89. Hallberg L, Bjorn-Rasmussen E, Jungner I. Prevalence of hereditary haemochromatosis in two Swedish urban areas. *J. intern. Med.*, 1989, **225**(4): 249-255
90. Leggett BA, Halliday JW, Brown NN et al. Prevalence of haemochromatosis amongst asymptomatic Australians. *Br. J. Haematol.*, 1990, **74**(4): 525-530
91. O'Brien T, Barrett B, Murray DM et al. Usefulness of biochemical screening of diabetic patients for hemochromatosis. *Diabetes Care*, 1990, **13**(5): 532-534
92. Olsson KS, Marsell R, Ritter B et al. Iron deficiency and iron overload in Swedish male adolescents. *J. intern. Med.*, 1995, **237**(2): 187-194
93. Cullen L, Sommerville L, Crawford D et al. The haemochromatosis defect in Australia: population frequency indicates level of expression and positive selection for the defect [Abstract]. *Blood*, 1998 (sous presse)
94. Olynyk J, Marshall H, Crostella L et al. Population screening for the hemochromatosis mutation and biochemical expression [Abstract]. *Hepatology*, 1997, **26**: 199A
95. Adams P, Campion M, Gandon G et al. Clinical and family studies in genetic hemochromatosis: microsatellite and HFE studies in five atypical families. *Hepatology*, 1997, **26**: 986-990
96. Adams P, Chakrabarti S. Genotypic/phenotypic correlations in genetic hemochromatosis: evolution of diagnostic criteria. *Gastroenterology*, 1998, **114**: 319-323
97. Buffone GJ, Beck JR. Cost-effectiveness analysis for evaluation of screening programs: hereditary hemochromatosis. *Clin. Chem.*, 1994, **40**(8): 1631-1636
98. Phatak PD, Guzman G, Woll JE et al. Cost-effectiveness of screening for hereditary hemochromatosis. *Arch. intern. Med.*, 1994, **154**(7): 769-776
99. Adams PC, Gregor JC, Kertesz AE et al. Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model based on a 30-year database. *Gastroenterology*, 1995, **109**(1): 177-188
100. Adams P, Valberg L. Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model comparing genotyping to phenotyping [Abstract]. *Gastroenterology*, 1997, **112**: A1207
101. Kowdley K, Kaur S, Hassanien T. Primary liver cancer and survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation for hemochromatosis. *J. Liver Trans. Surg.*, 1995, **1**: 237-241
102. Porter D, Sturrock R, Capell H. The use of serum ferritin estimation in the investigation of anaemia in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. exp. Rheumatol.*, 1994, **12**: 179-182
103. Kaye T, Guay A. Increased Serum Ferritin Levels in Patients with Diabetes Mellitus. *Mayo Clin. Proc.*, 1994, **69**: 498-499
104. Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *J. clin. Oncol.*, 1996, **14**: 1730-1736

105. Guidelines for the molecular predictive test in Huntington's disease. *J. med. Genet.*, 1994, **31**: 555-559
106. Statement of the American Society of Human Genetics and Genetic Testing for Breast and Ovarian Cancer Predisposition. *Amer. J. hum. Genet.*, 1994, **55**: i-iv
107. Fryns J. Screening for the fragile X syndrome: The necessity of international guidelines for molecular genetics predictive testing in general. *Genetic Counselling*, 1995, **6**: 293-296
108. Reilly P, Boschar M, Holtzman S. Ethical issues in genetic research: disclosure and informed consent. *Nat. Genet.*, 1997, **15**: 16-20

Figure 2

RECHERCHE DE LA MUTATION C282Y PAR PCR-RESTRICTION

- Amplification de l'exon 4 : 387 pb
- Digestion par la Rsa I
 - site constant : 2 fragments de 247 + 140 pb
 - la mutation entraîne la création d'un site nouveau : 247 + 111 + 29 pb



Amorce F

Amorce F : 5' TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3'

Amorce R : 5' CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3'

Figure 3

TEST DE LIAISON D'OLIGONUCLÉOTIDES

Composants de la réaction	Réaction avec cible normale	Réaction avec cible mutée
Nucléotides normaux 5' T 3' 3' A 5'	B T R A	B T R G
Nucléotides mutés 5' C 3' 3' G 5'	B T R A	B T R G
Séquence cible amplifiée par PCR		
Oligonucléotide marqué par la biotine en 5' (l'extrémité 3' s'accorde à une séquence normale)	B T 3'	B T 3'
Oligonucléotide portant un groupe signal en 3'	5' R 3'	5' R 3'
Fixation sur la paroi des puits sensibilisés par la streptavidine Dénaturation, lavage		
	B	B
Recherche du signal		
	Signal	Pas de signal

Tableau 1 : Paramètres de la charge en fer chez les homozygotes et les hétérozygotes pour la mutation C282Y

	Effectif	Age (années)	ST (%)	Fn ($\mu\text{g/l}$)	CHF ($\mu\text{mol/g}$)	IHF
Homozygotes	125	40 \pm 13	74,4 \pm 18,6	737 (20-6 000)	211,6 \pm 143,8	5,6 \pm 3,7
- Hommes	74	39,7 \pm 12,6	78,6 \pm 15,9	1 320 (49-6 000)*	228,6 \pm 155,4	6,1 \pm 3,8
- Femmes	51	40,6 \pm 13,8	68,2 \pm 20,6	370 (20-5 340)	184,9 \pm 121	4,7 \pm 3,2+
Hétérozygotes	173	45,9 \pm 19,1	34,8 \pm 19,5	120 (6-3 600)	71,8 \pm 41,8 ϕ	1,7 \pm 1,1 ϕ
- Hommes	92	43,8 \pm 18,8	38,9 \pm 20,8	203,5 (21-1 155)		
- Femmes	81	48,5 \pm 20,5	30,2 \pm 17,00**	370 (20-5 340)***		

* $p < 0,0001$.+ $p < 0,10$.** $p < 0,003$.*** $p < 0,05$. ϕ 12 sujets seulement.CHF = Concentration hépatique en fer ($\mu\text{mol/g}$).Fn = Ferritinémie ($\mu\text{g/l}$).

IHF = Indice de charge hépatique en fer (CHF/âge).

ST = Coefficient de saturation de la transferrine (%).

Tableau 2 : Comparaison des données démographiques et du génotype

	Homozygote C282Y	Hétérozygote C282Y	Hétérozygote composite	Hétérozygote H63D	Homozygote H63D	Pas de mutation
Effectif (%)	215(48)	33(7)	43(10)	73(16)	14(3)	66(15)
Proportion d'hommes	69	88	88	82	100	91
Age (années)	47±13	55±11*#	47±13	51±12*	53±11*	55±9*#

Les chiffres correspondent à l'effectif (pourcentage indiqué entre parenthèses) ou à la moyenne ± l'écart type.

* : La différence est significative par rapport aux homozygotes C282Y.

: La différence est significative par rapport aux hétérozygotes composites.

⌘ : La distribution est significativement différente suivant le génotype (test du chi-2).

Tableau 3 : Fréquence allélique (%) comparée en cas de surcharge en fer et chez les témoins.
Les distributions sont statistiquement différentes (test du chi-2)

	Chromosomes porteurs de C282Y inclus		Chromosomes porteurs de C282Y exclus	
	Surcharge en fer	Témoins	Surcharge en fer	Témoins
C282Y	57	3	-	-
H63D	16	16	37	17
Pas de mutation	27	81	63	83

Tableau 4 : Paramètres de la charge en fer en fonction du génotype en cas de surcharge en fer

	Homozygote C282Y	Hétérozygote C282Y	Hétérozygote composite	Hétérozygote H63D	Homozygote H63D	Pas de mutation
Sidérémie (µmol/l)	38±6 (199)	30±10* (33)	28±7* (43)	25±8*# (73)	28±9* (14)	23±8*\$\$# (64)
Saturation de la transferrine (%)	79±12 (196)	49±18* (32)	48±16* (43)	41±16*\$\$# (73)	50±22* (14)	40±18*\$\$# (64)
Ferritinémie (µg/l)	1 895±1 741 (200)	973±811* (33)	620±419* (43)	685±510* (70)	852±743* (14)	872±593* (65)
Concentration hépatique en fer (µmol/g)	334±162 (177)	107±52* (26)	119±54* (35)	96±49*# (54)	103±40* (12)	102±59* (53)
Indice de charge hépatique en fer (µmol/g/âge en années)	7,5±3,8 (177)	2,0±0,9*# (26)	2,5±1,0* (35)	1,9±0,9*# (54)	1,9±0,7* (12)	1,9±1,1*# (53)
Déplétion en fer (g)	7,7±5,2 (99)	2,9±1,1* (7)	3,3±1,4* (18)	3,3±2,2* (16)	2,5±1,0* (4)	2,9±2,0* (16)

Les chiffres correspondent à la moyenne ± l'écart type (le nombre de patients examinés entre parenthèses).

* : La différence est significative par rapport aux homozygotes C282Y.

\$: La différence est significative par rapport aux hétérozygotes C282Y.

: La différence est significative par rapport aux hétérozygotes composites.

Tableau 5 : Hémochromatose cliniquement exprimée chez les Américains blancs

Auteur (date)	Lieu; population étudiée	Critères diagnostiques	Effectif	Fréquence des homozygotes	Fréquence des hétérozygotes	Fréquence du gène anormal
Edwards (1988)	Salt Lake City (UT); hommes donneurs de sang volontaires et normaux	ST = 62	5 840 (hommes) 5 225 (femmes)	0,005 (hommes) 0,003 (femmes)	0,13 (hommes) 0,06 (femmes)	0,07 (hommes) 0,03 (femmes)
Balan (1994)	Rochester (MN); population de la Mayo Clinic†	ST = 62 et Fn = 400	12 258 (hommes/ femmes ~ 1:1)	0,0003	0,0363	0,0182
Baer (1995)	Hommes asymptomatiques, 30 ans, *bilan de santé systématique*‡	ST = 62 et Fn = 500	1 974 (hommes)	0,0035	0,1183	0,0592
McLaren/NHANES II (1995)	Population blanche, Etats-Unis d'Amérique	Multicritères	1 325 (hommes) 1 547 (femmes)	0,0066 (hommes) 0,0048 (femmes)	0,162 (hommes) 0,140 (femmes)	0,081 (hommes) 0,070 (femmes)
Phatak (1996)	Rochester (NY); patients des services de soins de santé primaires	ST = 45; puis ST = 55 et Fn = 200	12 190§	0,0056	0,1497	0,0748

ST = Coefficient de saturation de la transferrine (%); Fn = ferritinémie ($\mu\text{g/l}$). Les fréquences des hétérozygotes et du gène anormal ont été calculées au moyen de la loi Hardy-Weinberg.

† : « ... la plupart d'entre eux descendent d'Européens; parmi eux très peu sont d'origine afro-américaine, asiatique, moyen-orientale ou hispanique» [Balán, 1994 #3613].

‡ : La totalité des sujets étaient des hommes désignés comme «blancs» [Baer, 1995 #4020].

§ : On observe une prédominance des hommes, mais le pourcentage d'hommes blancs ne peut pas être garanti à partir des données publiées [Phatak, 1996 #4258].

Tableau 6 : Mutation du gène C282Y chez les Américains blancs

Auteur (date)	Population	Effectif	Fréquence des homozygotes	Fréquence des hétérozygotes	Fréquence du gène anormal
Feder (1996)	Prélèvements recueillis pour le CEPH et sujets pris au hasard	155	0,0010	0,0645	0,0322
Beutler (1996)	Non indiqué	193	0,0056	0,1501	0,0750
DeLoughery (1996)	Portland (OR); donneurs de sang, autres†	150	0,0017	0,0830	0,0415
Barton (1997)	Birmingham (AL); population générale	142	0,0070	0,1408	0,0704

Certaines fréquences des homozygotes et du gène anormal ont été calculées au moyen de la loi de Hardy-Weinberg.

† : « ... essentiellement une population blanche de 150 témoins et donneurs de sang » [DeLoughery, 1996 #4620].

Tableau 7 : Fréquence de la surcharge en fer chez les Américains d'origine africaine

Auteur (date)	Lieu; population étudiée	Critères diagnostiques	Effectif	Sujets positifs
NHLANES II (1984)	Etats-Unis d'Amérique; population noire	Hommes, 45-64 ans Femmes 45-64 ans	37 32	Fn = 213±179 (écart type); 75 ^e percentile : 301 ng/ml 145±160 (écart type); 75 ^e percentile : 159 ng/ml
Wurapa (1993)	Cleveland (OH); séries hospitalières : autopsies	Indice de charge hépatique en fer : 2,0	326	1,5%
Barton (1995)	Birmingham (AL); séries hospitalières : biopsie de foie	Charge en fer grade 2 des hépatocytes et/ou des cellules de Kupffer	114	17,5%
Baer (1995)	Oakland (CA); hommes asymptomatiques, 30 ans, «bilan de santé systématique»	ST = 62 et Fn = 500	1 148	0
Phatak (1996)	Rochester (NY); patients des services de soins de santé primaires	ST = 45; puis ST = 55 et Fn = 200	2 197	0

ST = Coefficient de saturation de la transferrine (%); Fn = ferritinémie (µg/l).