



HAL
open science

Corrélations phénotype/génotype dans la xérocytose héréditaire : étude d'une série de patients présentant une mutation au codon 598

Lydiane Mordier

► **To cite this version:**

Lydiane Mordier. Corrélations phénotype/génotype dans la xérocytose héréditaire : étude d'une série de patients présentant une mutation au codon 598. Hématologie. 2022. dumas-04106140

HAL Id: dumas-04106140

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04106140>

Submitted on 25 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



THESE D'EXERCICE

Pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité : Hématologie clinique

**CORRELATIONS PHENOTYPE/GENOTYPE DANS LA XEROCYTOSE
HEREDITAIRE :**
Etude d'une série de patients présentant une mutation au codon 598

Par

MORDIER Lydiane née le 04/06/1993 à CRETEIL

Présentée et soutenue publiquement le 25/10/2022

à

La faculté de médecine d'Amiens - Université de Picardie Jules Verne

Président du jury : **Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU**
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier (Hématologie, transfusion)
Chef du service d'hématologie clinique et de thérapie cellulaire
Chef du Pôle « Oncopôle »

Membres du jury : **Madame le Professeur Catherine BADENS**
Professeur des Universités-Praticien hospitalier
Chef de service du laboratoire de biochimie
Monsieur le Professeur Loïc GARCON
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier (Hématologie – Transfusion)
Chef du service d'Hématologie Biologique
Chef du service de Génétique Constitutionnelle
Madame le Docteur Véronique PICARD
Maître de Conférences des Universités -Praticien Hospitalier
Madame le Docteur Corinne GUITTON
Praticien Hospitalier

Directeur de thèse : Monsieur le **Professeur Loïc GARCON**

THESE DE MEDECINE

**CORRELATIONS PHENOTYPE/GENOTYPE
DANS LA XEROCYTOSE HEREDITAIRE :
Etude d'une série de patients présentant une
mutation au codon 598**

Présentée publiquement le 25/10/22

Par

MORDIER Lydiane née le 04/06/1993

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU,

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Hématologie, transfusion), Chef du service d'hématologie clinique et de thérapie cellulaire, Chef du Pôle « Oncopôle ».

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements ainsi que de mon respect pour votre investissement et pour l'humanité dont vous faites preuve dans la formation de vos internes et dans notre accompagnement tout au long de ce cursus.

Madame le Professeur Catherine BADENS

Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Chef de service du laboratoire de biochimie du
CHU La Timone AP-HM

Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de thèse. Vous me faites l'honneur de
juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements ainsi que de
mon respect pour votre investissement dans la formation de tous les étudiants.

Monsieur le Professeur Loïc GARCON

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier (Hématologie – Transfusion), Chef du service d'Hématologie Biologique, Chef du service de Génétique Constitutionnelle.

Merci pour votre encadrement en tant que directeur de thèse, votre dévouement et votre soutien tout au long du processus d'élaboration de cette thèse. Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Veuillez recevoir la marque de mes remerciements ainsi que de mon respect pour votre investissement dans la formation des étudiants en médecine.

Madame le Docteur Véronique PICARD,

Maître de Conférences des Universités -Praticien Hospitalier du service d' Hématologie
biologique –Génétique moléculaire du CHU Bicêtre, AP-HP.

Merci pour votre encadrement, votre dévouement et votre soutien tout au long du processus
d'élaboration de cette thèse. Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Veuillez recevoir
la marque de mes remerciements ainsi que de mon respect pour votre investissement dans la
formation des étudiants en médecine.

Madame le Docteur Corinne GUITTON,

Praticien-Hospitalier du service de Pédiatrie – Hématologie au CHU Bicêtre AP-HP,

Merci pour l'intérêt avez porté à mon travail de thèse. Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements ainsi que de mon respect pour votre investissement dans la formation de tous les étudiants en médecine.

Merci à ma mère, mon frère, mon beau-père et à ma famille pour leur présence et le soutien indéfectible dont ils ont toujours fait preuve et qui m'a permis de continuer à avancer malgré les épreuves de la vie.

J'adresse mes remerciements à feu mon père dont le manque fait terriblement écho en moi depuis un an et encore davantage en ce jour. Tu m'as transmis la valeur du travail et la persévérance qui m'ont porté toutes ces années.

Je remercie tous mes amis et mes co-internes pour leur soutien pendant toutes ces années.

Table des matières

GLOSSAIRE	10
1 INTRODUCTION	11
2 MATERIEL et METHODES	18
2.1 Recueil des données	18
2.2 Méthodes diagnostiques	19
2.2.1 Etude phénotypique des globules rouges	19
2.2.2 Analyses génétiques	20
2.3 Critères d'éligibilité et objectifs	21
2.4 Analyses statistiques :	22
3 RESULTATS	23
3.1 Description de la cohorte V598	24
3.1.1 Famille n°1 :	24
3.1.2 Famille n°2 :	27
3.1.3 Famille n°3 :	28
3.1.4 Famille n°4 :	29
3.1.5 Famille 5 :	29
3.2 Analyses des données	29
3.2.1 Sur le plan des Œdèmes périnataux	29
3.2.2 Impact des mutations au codon 598 et Mode de transmission :	30
3.2.3 Caractérisation de l'anémie et de l'hémolyse :	32
3.2.4 Etude de la surcharge en fer :	35
3.2.5 Etude de la pseudohyperkaliémie :	36
4 DISCUSSION	37
5 CONCLUSION	41
6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	42
RESUME	46

GLOSSAIRE

ATP : Adénosine Triphosphate

ATPase : Adénosine Triphosphatase

AUC : Aire sous la courbe

2-3 BPG : 2-3 Biphosphoglycerate

CGR : Culot Globulaire Rouge

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

DRCI : Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation

EPO : Erythropoïétine

GPA : Glycophorine A

GR : Globule Rouge

NGS : Next Generation Sequencing

OP : Œdème périnatal/Œdèmes périnataux

XH : Xérocytose héréditaire

1 INTRODUCTION

La Xérocitose héréditaire (XH) est une pathologie génétique du globule rouge (GR) de transmission autosomique dominante qui s'accompagne d'un tableau d'hémolyse chronique pouvant être associé à une surcharge en fer, une pseudohyperkaliémie ainsi qu'à des manifestations cliniques telles que des œdèmes périnataux. Il s'agit d'une maladie rare concernant environ une naissance sur 50000 (1). Les symptômes sont très hétérogènes d'un individu à un autre et évolutifs avec l'âge. Ils peuvent mettre en jeu le pronostic vital (2). Des études (3,4,5) ont permis de démontrer l'implication des gènes codant pour PIEZO1 et GARDOS dans la survenue de cette pathologie. Elle est due à une mutation gain de fonction de PIEZO1 dans 90% des cas et de KCNN4 codant le canal GARDOS dans les 10% restant (6,7). Cette mutation est à l'origine d'une membranopathie qui induit une déshydratation du GR qui entraîne son hémolyse.

PIEZO 1 est un canal cationique mécanotransducteur présent à la surface des GR (8). Il s'agit d'une protéine de haut poids moléculaire constituée d'un homotrimère de forme hélicoïdale composée de 3 pales avec en leur centre un pore (**Figure 1**). Chaque monomère comporte 2521 acides aminés et 38 domaines transmembranaires. Son expression est codée par le gène FAM38A(<https://gtexportal.org/home/gene/PIEZO1>).

Dans un contexte physiologique, son activation survient en présence d'un stimulus mécanique appliqué à la membrane et entraîne l'entrée rapide de cations de manière non sélective dans le GR. Cela provoque un influx d'ions calciques qui vont secondairement activer le canal GARDOS, canal potassique calcique dépendant. Ceci entraîne un efflux de potassium et d'eau de la cellule. Dans les suites de son activation, le canal est rapidement inactivé par l'action de son domaine C-terminal extramembranaire et de son pore.

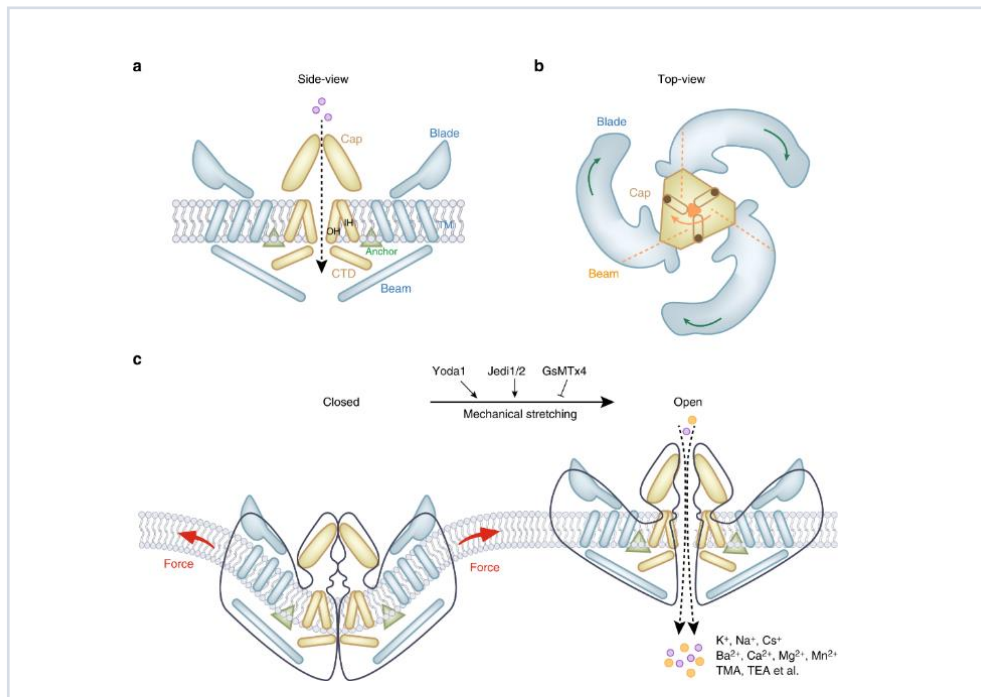


Figure 1. PIEZO1, molécule hélicoïdale dans sa conformation fermée et ouverte d'après Lei Qin et al (Bone Research (2021) 9:44)

Le canal GARDOS est quant à lui un canal potassique calcique dépendant codé par le gène KCNN4. Il est composé d'un homotétramère dont chaque chaîne est faite de 6 domaines transmembranaires composant le pore du canal, la partie C terminale du canal GARDOS est liée à la calmoduline qui est responsable de la liaison au calcium (**Figure 2**). Il est exprimé à la surface du GR, l'augmentation des taux de calcium entraîne une sortie de potassium et d'eau de la cellule.

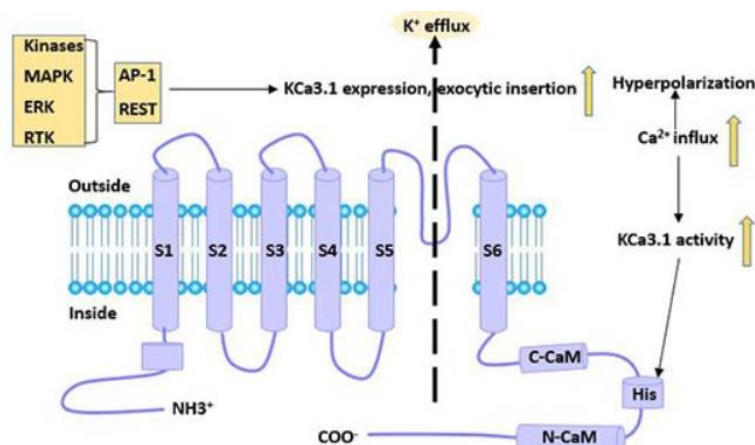


Figure 2. Régulation du canal GARDOS, canal potassique calcium-dépendant.
L'activation par le calcium du canal GARDOS lié à la calmoduline entraîne un efflux de potassium.

Le rôle de PIEZO 1 commence dès les stades précoces de l'érythropoïèse. Sa présence a été identifiée à la surface des progéniteurs de la lignée érythrocytaire (Burst Forming Unit et Colony Forming Unit) par Alexis Caulier et al (9). Cette étude met en lumière un allongement du temps de différenciation des progéniteurs et une diminution de leur prolifération lors de l'activation de PIEZO 1 par YODA1 (activateur sélectif de PIEZO1) ou en cas de mutation gain de fonction de PIEZO1 (Figure 3). En effet, l'entrée de calcium induite par l'activation de PIEZO1 entraîne l'activation des voies de signalisation calciques dépendantes telles que la voie NFAT qui intervient dans la différenciation érythrocytaire ainsi qu'une activation des voies ERK1/2 et STAT5 qui intervient dans la cascade de signalisation de l'EPO. Les analyses fonctionnelles réalisées sont en faveur d'une action synergique de l'EPO et de PIEZO1 avec un rôle modulateur de PIEZO1 dans la cascade de signalisation. Ces phénomènes sont à l'origine d'une modification de l'équilibre transcriptionnel en faveur des gènes de l'érythropoïèse précoce avec une augmentation du rapport GATA2/GATA1 (rôle majeur de GATA1 dans l'érythropoïèse terminale), la diminution de l'expression de la Glycophorine A (**Figure 3**) présente au stade de différenciation terminale ainsi que d'une diminution de l'expression de l' α -globine et de la β -globine. Ils s'accompagnent également d'une diminution de la prolifération des érythroblastes par un blocage des cellules au stade G0/G1 du cycle cellulaire. Ceci est corrélé à une diminution de l'expression de PIEZO1 au fur à mesure de la différenciation cellulaire. Ces phénomènes sont réversibles en cas d'inhibition de PIEZO1 ou d'une chélation calcique. GARDOS n'est pas impliqué dans ce phénomène puisque son inhibition par SENICAPOC n'inhibe pas l'action de YODA1 et on continue d'observer une entrée massive de calcium et un retard de différenciation des proérythroblastes.

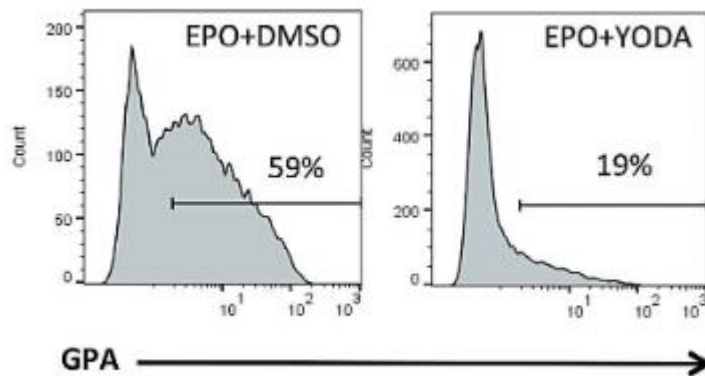


Figure 3 : L'activation de PIEZO1 par YODA entraîne une diminution de l'expression de la Glycophorine A dans les érythroblastes d'après Alexis Caulier et al (Haematologica 2020 Volume 105(3):610-622).

L'action de PIEZO1 se poursuit au stade tardif de l'érythropoïèse lors de la maturation du réticulocyte en globule rouge se faisant physiologiquement par vacuolisation et autophagie des mitochondries et des organelles se traduisant par la disparition de la protéine CD71 exprimée à la surface des réticulocytes et une diminution de la surface membranaire au stade de GR. En effet, L. Moura et al., dans une étude publiée dans Hematologica, s'intéressent à la réticulocytose chez les patients présentant une XH avec mutation de PIEZO 1 et mettent en évidence un retard de maturation des réticulocytes s'exprimant par des index de déformation augmentés, la persistance de vésicules dans le GR et une proportion augmentée de cellules CD71 + chez les patients, témoin d'un défaut de maturation des réticulocytes (10).

Enfin, PIEZO 1 joue un rôle majeur dans l'homéostasie du GR, stade terminal de l'érythropoïèse. Dans la XH, une mutation autosomique dominante gain de fonction de PIEZO 1 entraîne une modification de la perméabilité membranaire du GR par augmentation de la durée d'activation du canal par défaillance de son mécanisme d'inactivation. Il y a donc une entrée excessive de cations dont le calcium. Ceci induit une suractivation secondaire du canal GARDOS (canal potassique calcique dépendant) et entraîne une majoration de la fuite d'eau et de potassium. Ces mécanismes ont pour conséquence l'apparition d'une déshydratation du GR avec une modification de son volume et de sa résistance à l'origine d'une hémolyse chronique (11,12).

Des études fonctionnelles viennent appuyer ces données, notamment l'étude publiée par R. Rapetti-Mauss et al. Celle-ci ci s'intéresse au rôle de GARDOS dans la XH due à une mutation de PIEZO 1 (13). Elle étudie en particulier les interactions fonctionnelles entre GARDOS et PIEZO1 en testant l'efficacité du SENICAPOC. Elle met en évidence une

augmentation du courant ionique chez les patients PIEZO1 mutés et chez le cas contrôle en présence de Yoda1 (activateur de PIEZO1) témoin de l'augmentation de l'entrée de cations induite par PIEZO1. Cette augmentation de courant ionique est réversible chez les patients PIEZO1 mutés en cas d'ajout de SENICAPOC (inhibiteur de GARDOS). Aussi, la mesure de la résistance osmotique des GR dans un milieu contenant du calcium montre une augmentation de la résistance chez les patients PIEZO1 mutés par rapport au cas contrôle avec une déviation de la courbe vers la gauche variable selon la mutation. En cas d'ajout de SENICAPOC, on observe une diminution de la résistance osmotique des GR mutés XH qui se rapproche du contrôle (**Figure 4**). La mesure du potassium intracellulaire témoigne d'une diminution de la sortie de potassium en présence d'inhibiteurs de GARDOS chez les patients mutés associée à une diminution significative de la perte d'eau permettant une meilleure hydratation du GR (**Figure 5**).

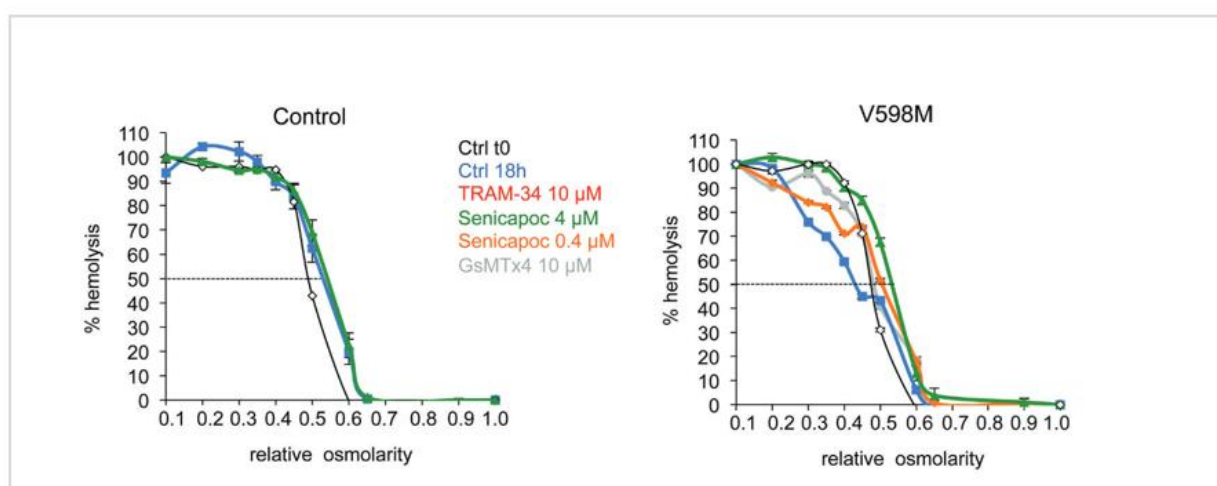


Figure 4 : Etude la résistance osmotique des GR en cas de XH puis en présence d'inhibiteurs de GARDOS. La Déviation de la courbe vers la gauche (courbe bleue) signe une augmentation de la résistance osmotique en cas de mutation gain de fonction de PIEZO1 V598M. On observe une normalisation de la courbe caractérisée par sa déviation vers la droite en présence d'inhibiteurs de GARDOS : TRAM34 ou Senicapoc 4 μ M et 0.4 μ M. Le Senicapoc 4 μ M (courbe verte) permet la normalisation de courbe de résistance d'après Rapetti-Mauss et al (doi: 10.3324/haematol.2017.171389)

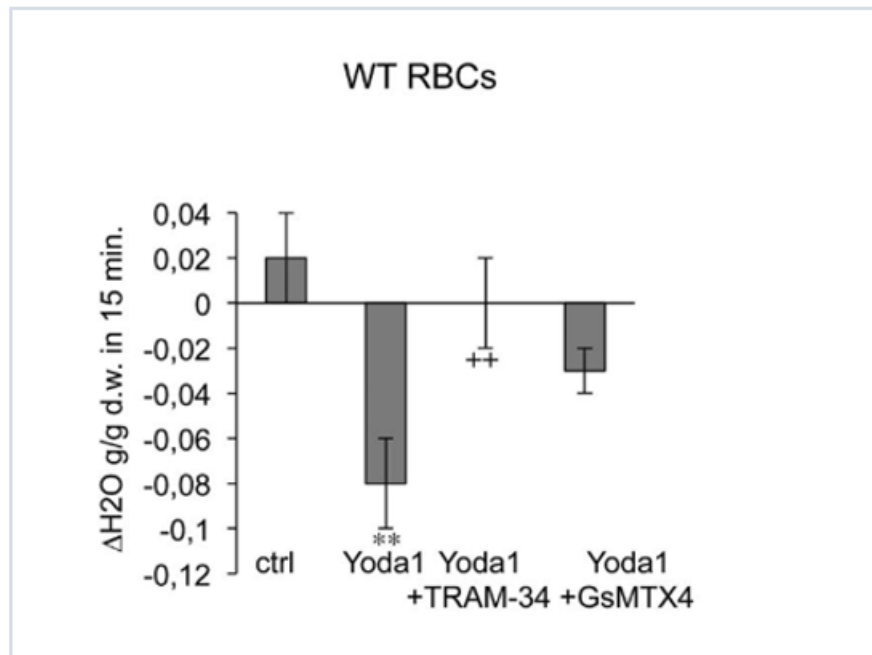


Figure 5. Variation du flux hydrique après activation de PIEZO1 associée ou non à une inhibition de GARDOS- En présence de Yoda 1, activateur de PIEZO1, on observe un flux hydrique négatif entraînant une déshydratation du GR. L'addition de TRAM-34 inhibiteur de GARDOS et GsMTX4 inhibiteur de PIEZO1, toujours en présence de YODA1, annule ou diminue cette perte hydrique d'après Rapetti-Mauss et al (doi:10.3324/haematol.2017.171389).

Ces anomalies de l'érythropoïèse sont associées à une hémolyse compensée chez la majorité des patients atteints de XH (2/3) voire dans certains cas à une polyglobulie. Cette singularité a conduit à l'analyse du métabolome des GR de patients atteints de XH dans une étude menée par L. Kiger et al. (15) On met ainsi en évidence chez les patients PIEZO 1 mutés, une altération de l'équilibre de la glycolyse, seule source énergétique du GR avec une diminution significative de ses métabolites intermédiaires par surconsommation d'énergie (15). La glycolyse permet la production d'Adénosine Triphosphate (ATP) nécessaire au fonctionnement des pompes membranaires dont la Na/K ATPase qui joue un rôle important dans l'homéostasie du GR. En cas de mutation de PIEZO1, survient une augmentation des besoins en ATP afin de compenser le déséquilibre ionique et maintenir l'homéostasie du GR. De plus, le flux calcique joue un rôle dans l'activation de la phosphofructokinase, enzyme de la glycolyse calcique dépendante. Cette augmentation de glycolyse engendre, chez ces patients, une diminution significative du 2-3 Biphosphoglycerate (2-3 BPG), régulateur de la libération d'oxygène par le GR, et par conséquent une augmentation de l'affinité de l'Hémoglobine pour l'oxygène. Les patients présentent une diminution modérée de la p50. Cette diminution

d'oxygène disponible pour les tissus mime une hypoxie, ce qui peut participer à l'activation de l'érythropoïèse se traduisant par une réticulocytose voire une polyglobulie dans de plus rares cas de XH liée à PIEZO 1.

En pratique, le diagnostic de XH est effectué lors de l'exploration de manifestations cliniques ou biologiques telles que : une hémolyse ou une anémie hémolytique, une surcharge martiale, des OP, un ictère néonatal ou dans certains cas lors d'une enquête familiale. Selon les recommandations du PNDS de 2021(1), il passe par la réalisation d'une éktacytométrie (16,17) qui est l'examen de référence et la réalisation d'un séquençage par NGS afin de caractériser précisément les mutations impliquées. Dans l'étude rétrospective d'une cohorte de 126 patients français atteints de XH inclus dans la cohorte CohSto (CHU Bicêtre, CHU partenaire, cohorte déclarée à la CNIL) PICARD et al rapportent 10% des cas liés à une mutation du gène KCNN4 et 90% de cas liés à une mutation du gène PIEZO1(6). Il existe quelques mutations récurrentes comme les substitutions p. Arg352His de KCNN4 et p.Arg2456His de PIEZO1 et la duplication p.Leu2495_Glu2496dup de PIEZO1. Il s'agit à l'heure actuelle de la plus grande cohorte de patients atteints de XH (6). Chez les patients GARDOS mutés, on note des formes plus sévères d'anémies hémolytiques et de surcharge en fer sans signes francs de déshydratation selon les constantes érythrocytaires et l'éktacytométrie. Chez les patients PIEZO1 mutés, on retrouve majoritairement un tableau d'hémolyse compensée associée à la présence d'œdèmes périnataux de sévérité variable dans environ 20% des familles avec une fréquence élevée de thromboses post splénectomie. Ces patients présentent des manifestations cliniques et biologiques assez hétérogènes, il n'y a pas actuellement de relation génotype/phénotype clairement établie permettant une adaptation de la prise en charge.

L'étude de nouveaux patients de cette cohorte, associée aux données de la littérature, nous ont permis de mettre en évidence que des variants d'un codon de PIEZO1 étaient associées à la présence d'œdèmes périnataux avec une pénétrance de 100%, il s'agit du codonVal598. L'origine des œdèmes périnataux n'est pas clairement établie dans la XH. Cependant, PIEZO1 est impliqué dans le fonctionnement du système lymphatique et dans des tableaux de dysplasie lymphatique généralisée (18,19) se manifestant par des œdèmes généralisés (anasarque périnataux, hydrops fœtal, lymphœdèmes, épanchements pleuraux chyleux et péricardiques, ascite) en présence de mutations perte de fonction de PIEZO1. On peut retrouver des symptômes similaires chez des patients présentant une mutation gain de fonction autosomique dominante de PIEZO 1 signant la présence d'un syndrome de chevauchement (overlapping

syndrome) (20,21). La différenciation de ses 2 entités s'avère difficile sans étude génétique même s'il existe des différences dans leurs manifestations cliniques.

Nous avons donc réalisé une étude rétrospective non interventionnelle dans le but de décrire 8 patients de 5 familles distinctes présentant une mutation au codon 598 de Piezo, afin de préciser la relation phénotype/génotype et d'adapter la prise en charge des patients. Nous étudierons dans cette population, l'incidence des différentes manifestations cliniques et biologiques (œdèmes périnataux : objectif principal, hyperferritinémie, anémie hémolytique, pseudohyperkaliémie : objectifs secondaires) selon le génotype ainsi que le mode de transmission.

2 MATERIEL et METHODES

2.1 Recueil des données

Il s'agit d'une étude rétrospective multicentrique française prenant en compte des patients suivis au CHU Bicêtre, Necker et au CHU Amiens, ayant eu un diagnostic de Xérocytose Héritaire entre 1993 et 2022, certains faisant partie de la cohorte CohSto déclarée à la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL). A partir des dossiers médicaux des patients nous avons extrait des données cliniques, biologiques, génétiques, ainsi que des résultats d'imagerie afin de documenter les œdèmes périnataux, l'hémolyse chronique, la surcharge en fer, la pseudohyperkaliémie et le mode de transmission de la XH. Ces données nous ont permis de dresser le profil des patients mutés V598 et dans un second temps les comparer aux caractéristiques des patients atteints de XH porteurs d'autres mutations de PIEZO1, répertoriées dans la cohorte (4).

Cette étude a été conduite dans le respect des règles imputables aux études rétrospectives non interventionnelles et a été validée par la Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI).

2.2 Méthodes diagnostiques

2.2.1 Etude phénotypique des globules rouges

Tous les patients ont bénéficié d'une étude phénotypique des GR. Les analyses de routine concernant les paramètres des globules rouges ont été réalisées dans un même centre en utilisant un automate ADVIA 2120 (Siemens ®). Les frottis sanguins ont été lus après une coloration de type May Grünwal Giemsa (MGG) (Figure 6).

Les patients ont bénéficié d'une analyse fonctionnelle des globules rouges par **ektacytométrie**. Cette technologie n'existant que dans quelques laboratoires nationaux permet une mesure par laser de la déformabilité membranaire des GR en flux constant en fonction d'un gradient osmolaire. Elle permet de déterminer un Index **d'Elongation maximal** et minimal (**EImax** et EI min) et par correspondance l'Osmolalité à EI min (**Ohypo**) et EI max (**Figure 6**). Il en ressort également un Index d'Elongation Hyper qui correspond à 50% de l'EImax et l'osmolalité correspondante (**Ohyper** à 50% de l'EImax) ainsi qu'une aire sous la courbe (AUC).

Cette méthode a été validée par plusieurs essais et présente une spécificité de 92% (Omin).

Dans le cadre d'une XH due à une mutation de PIEZO1, on observe une déviation de la courbe vers la gauche, ce qui correspond à une augmentation de la résistance osmotique et à une déshydratation du GR sans diminution de la déformabilité maximale (**Figure 6**).

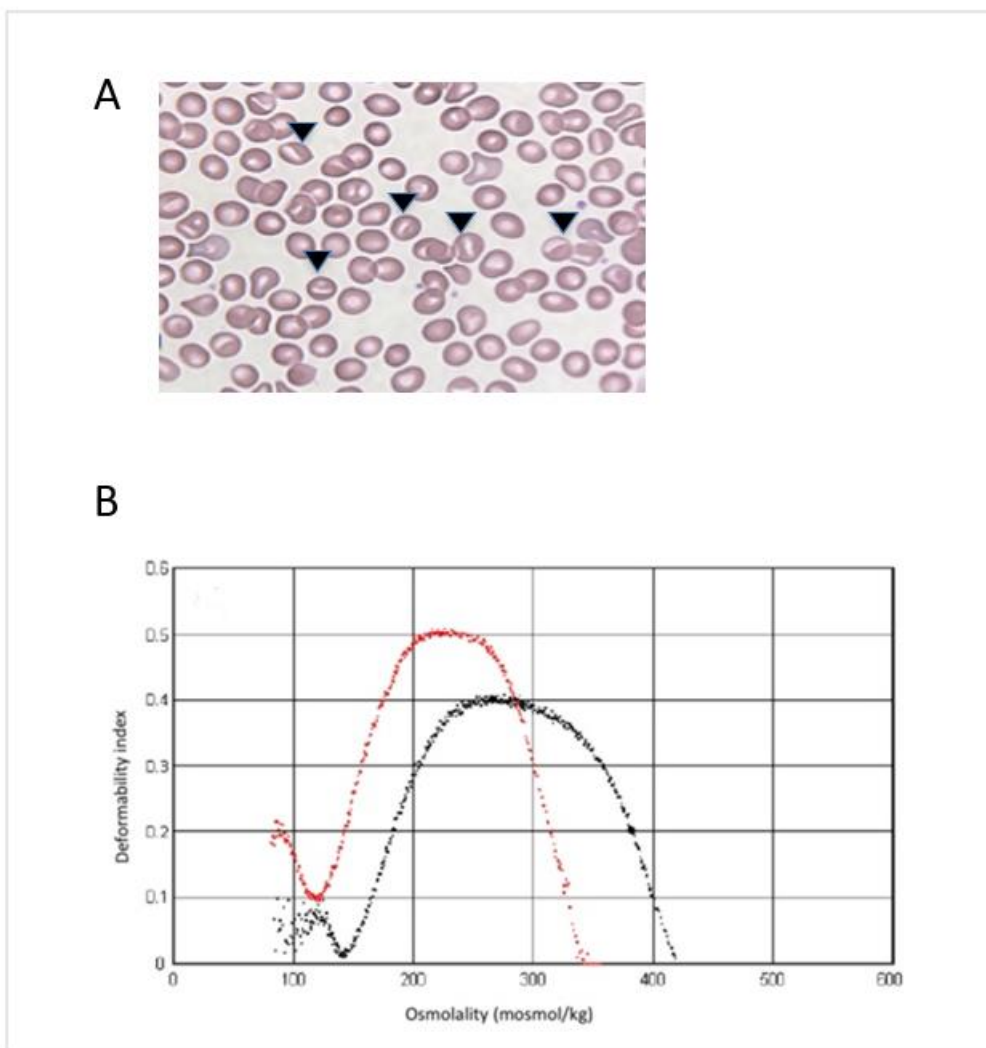


Figure 6 : **A.** Le frottis sanguin d'un patient montre la morphologie typique de stomatocytose déshydratée : certaines cellules appelées stomatocytes possèdent un centre clair en forme de bouche (flèches) ($\times 500$). **B.** Son profil d'ektactométrie par gradient osmolaire (courbe rouge) comparé à un contrôle (courbe noire) a montré une déviation complète de la courbe vers la gauche, indiquant des globules rouges déshydratés et un index de déformabilité normal.

2.2.2 Analyses génétiques

Les analyses génétiques ont été réalisées après recueil du consentement éclairé des patients en accord avec les accords d'Helsinki. L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'échantillons sanguins collectés dans des tubes EDTA en utilisant le QIAamp ou le QIASymphony DSP Midi blood DNA extraction kit (Quiagen®). Le séquençage NGS a été réalisé sur un équipement MySeq Illumina® au sein de la plateforme de génétique constitutionnelle de l'hôpital Bicêtre (Pr Mantel). L'intégralité des séquences codantes plus 50 bases encadrantes d'un panel de 27 gènes impliqués dans les hémolyses constitutionnelles a été analysée. Les gènes testés sont les suivants : ABCG5, ABCG8, AK1, ALAS2, ANK1, BPGM, CDAN1, EPB41, EPB42, EPB72,

G6PD, GATA1, GPI, HK1, KCNN4, KLF1, NT5C, NT5C3A, PGK1, PIEZO1, PKLR, RHAG, SEC23B, CLC2A1, SPTA1, SPTB, TPI1. Ce panel a été conçu grâce à l'application SureDesign Agilent®. Les adaptateurs Illumina et les oligonucléotides sont fournis par Eurofins Biomnis. L'ADN génomique purifié est soniqué sur un appareil M220 (Covaris®). Les librairies génome entier Illumina sont préparées grâce à un kit NEB Next DNA Library Master Prepmix set pour Illumina (NEB) sur une station Biomek span 8 Beckman®. L'enrichissement est réalisé grâce à un kit Sure Select XT (Agilent) sur une station Biomek 4000. L'analyse bioinformatique est réalisée sur une plateforme locale Galaxy, qui permet d'identifier les SNV et les courtes délétions/insertions (sensibilité > 99%) ainsi que les variations de nombre de copies. La description des variants utilise GATK 3.4-46, Annovar 2015 et Snpeff4.0. Le calcul du score de pathogénicité utilise les algorithmes SIFT 6.2.0, Mutation Taster 2013 et Polyphen-22.2.6.

2.3 Critères d'éligibilité et objectifs

Nous avons **inclus** dans l'étude tous les patients présentant un diagnostic établi de XH sans limite d'âge ayant donné leur accord ou dont les représentants légaux ont donné leur accord pour l'utilisation des données de leurs dossiers médicaux à des fins de recherche clinique.

Nous avons **exclu** de l'étude, les patients présentant d'autres pathologies pouvant être responsables d'un état d'anasarque, d'une hémolyse chronique, d'une surcharge en fer et d'une hyperkaliémie chronique. Sont également exclus les patients ayant refusé l'utilisation de leurs données médicales à des fins de recherche.

L'**objectif principal** de l'étude consiste à étudier la corrélation génotype phénotype dans la Xérocytose héréditaire quant au risque d'œdème périnatal (OP). Pour se faire nous ferons une comparaison de l'incidence des OP selon la mutation PIEZO1.

Les **objectifs secondaires** consistent à établir :

- Une corrélation entre hyperferritinémie et génotype avec la comparaison des valeurs de ferritine en fonction du génotype.
- Une corrélation entre anémie hémolytique et génotype en comparant les valeurs de l'hémogramme et des réticulocytes en fonction des génotypes.

- Une corrélation entre la pseudohyperkaliémie et génotype en comparant les valeurs des ionogrammes selon le génotype.
- Une corrélation entre le mode de transmission et génotype en évaluant les antécédents familiaux et/ou les enquêtes familiales à notre disposition en fonction du génotype.

2.4 Analyses statistiques :

Nous avons utilisé des tests non paramétriques de type Mann-Whitney compte tenu de l'effectif limité de notre cohorte avec une distribution bilatérale non gaussienne. Le seuil de significativité α est de 0,05.

3 RESULTATS

Nous avons étudié 8 patients atteints de XH appartenant à 5 familles différentes, porteurs d'une mutation au codon 598 de PIEZO1 (**Tableau 1.1 et 1.2**).

	<i>Famille n°1</i>				<i>Famille n°2</i>	<i>Famille n°3</i>	<i>Famille n°4</i>	<i>Famille n°5</i>
Patients	A	B	C	D	A	A	A	A
Sexe	H	F	F	F	F	H	H	H
Index/Enquête	I	E	E	E	I	E	I	I
Lien familial		Mère	Fille	Fille		Père		
Age au diagnostic	0	34 ans	0	0	17mois	36 ans	0	6
Terme à la naissance	31+4	X	38+4	38+1	41	X	34	X
Œdèmes prénataux O/N	Oui Anasarque	X	Oui Anasarque	Oui Anasarque	Oui Anasarque	X	Oui Anasarque	X
Œdèmes Périnataux O/N	Oui Anasarque	Oui Ascite chyleuse	Oui Anasarque	Oui Anasarque	Oui Anasarque	Oui	Oui Anasarque	Oui Ascite chyleuse
Hémoglobine au diagnostic (g/dl)	14.5	14.2	16.6	19.5	7.9	14.4	7.1	7.7 (Parvovirus B19)
Réticulocytes au diagnostic	423.19	441	171	399	124	404	X	148
Ictère néonatal (O/N)	Oui	X	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Splénomégalie	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	X
Ferritine au diagnostic (µg/l)	X	X	X	X	X	828	306	X
Surcharge en fer	X	X	X	X	X	Oui	Oui	X
IRM hépatique	X	X	X	X	X	190	X	X

Tableau 1.1 : Caractéristiques des patients mutés V598 au diagnostic de XH

Patients	Famille n°1				Famille n°2	Famille n°3	Famille n°4	Famille n°5
	A	B	C	D	A	A	A	A
Age (année)	34	52	9	8	13.5	44	0	6
Œdèmes	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Hémoglobine du suivi (g/dl)	16.4	13.7	15	14.1	11.8	10.4	7.1	7.7
Réticulocytes	260	175	153	159	81	287	X	X
Ferritine	671	613	129	95	313	209	306	X
Bilirubine	47	3	X	19	12	48.3	208	X
Kaliémie	5.3	5.1	4.8	5.3	5.1	5.7	X	X
Splénomégalie	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	X
IRM hépatique	40	95	X	X	X	190 (36)	X	X
Surcharge en fer	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui (chélation)	Oui	X

Tableau 1.2 : Caractéristiques des patients mutés V598 lors du dernier suivi.

3.1 Description de la cohorte V598

3.1.1 Famille n°1 :

Patient A :

Il s'agit du cas index de la famille n°1. Le diagnostic de XH a été posé à la naissance (terme :31+4 SA). Il a en effet présenté au début de sa vie, un tableau d'anasarque sévère prénatal, persistant à la naissance ayant nécessité d'avoir recours à une suppléance respiratoire par ventilation mécanique ainsi que la réalisation de ponctions évacuatrices néonatales et post-natales. Il a également présenté un ictère néonatal sévère avec une bilirubinémie maximale mesurée à 356µmol/l associée à une anémie avec un taux d'hémoglobine observé au plus bas à 9g/dl et une splénomégalie. Il a donc bénéficié d'un traitement par photothérapie, d'une exsanguino-transfusion et de transfusions (6 dans les 6 premiers mois) de CGR à répétition qui ont permis une évolution favorable. Les OP évoluent favorablement dans un premier temps, avec une disparition complète observée à l'âge de 8 mois. Dans un deuxième temps on note la réapparition d'œdèmes

au niveau des membres inférieurs (pieds, chevilles, mollets) présents de manière intermittente pendant les périodes estivales à l'adolescence (13-14ans). Ils deviennent permanents à l'âge de 32ans. Le séquençage génétique n'a pas mis en évidence de mutations pourvoyeuses de lymphœdèmes primitifs. La persistance d'œdèmes a pu être documentée par la réalisation d'une lymphoscintigraphie et d'une lymphographie par résonance magnétique mettant en évidence un reflux lymphatique. **(Figure 6)**. Il s'agit du seul cas de persistance d'œdème à l'âge adulte rapporté dans la XH.

Sur le plan de l'anémie, on note à l'âge de 13 ans une évolution vers une hémolyse compensée avec une hémoglobine à 14.5g/dl et des réticulocytes à 423 G/l.

A l'âge adulte (34ans), persiste une hémolyse compensée avec lors du dernier rendez-vous de suivi, un taux d'hémoglobine à 16,4g/dl, des réticulocytes à 260G/l et une bilirubinémie augmentée à 47mg/l sans lithiases vésiculaires, toujours associée à une splénomégalie asymptomatique qui est mesurée à 15 cm.

De plus, on constate l'apparition d'une surcharge en fer avec une hyperferritinémie à 671µg/l compliquée d'une hépatomégalie mesurée à 19cm associée à une hépatosidérose débutante. L'IRM de surcharge hépatique réalisée retrouve une charge hépatique de 40µg/g (N<40). On ne note pas d'altération de la fonction cardiaque. On observe une pseudohyperkaliémie à 5.3mmol/l.

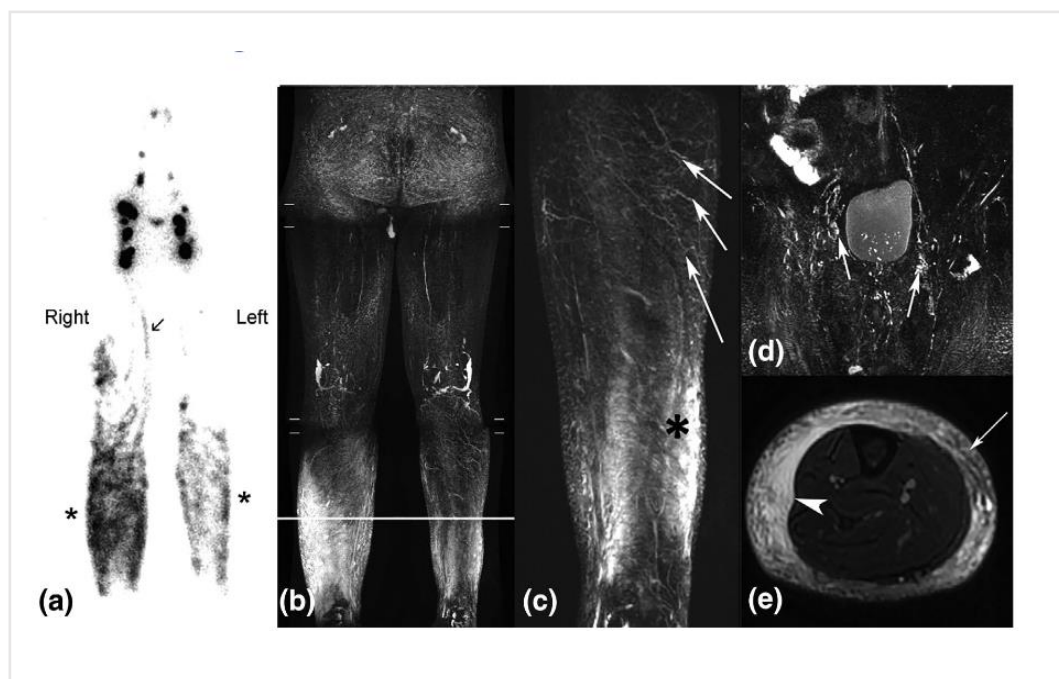


Figure 7. Persistance d'un lymphœdème à l'âge adulte chez un patient souffrant d'une XH.
a) Lymphoscintigraphie. *b,c,d,e)* Angiographie par résonance magnétique d'après Vignes et al.(Am J Med Genet A. 2022 Jan;188(1):243-248)

Patient B :

Il s'agit de la mère du cas index. Le diagnostic est posé à l'âge de 34 ans dans le cadre d'une enquête familiale après la naissance du cas index. Sa naissance avait aussi été marquée par un tableau d'OP d'intensité sévère avec notamment, la présence d'une ascite chyleuse ayant nécessité la réalisation de ponctions évacuatrices après la naissance. Ce tableau s'est accompagné d'une anémie ayant nécessité une transfusion de CGR. L'évolution des OP a été favorable avec une disparition totale sans récurrence à l'âge adulte.

Au diagnostic, une hémolyse compensée avec une hémoglobine à 14.2g/dl et des réticulocytes à 441G/l.

L'évolution de la maladie est marquée à 52 ans, par la mise en évidence d'une surcharge en fer sérique et hépatique avec une hyperferritinémie à 613µg/l étayée par une IRM hépatique retrouvant une surcharge en fer estimée à 95µg/g, associée une hépatomégalie mesurée à 15.5cm. Il n'y a pas d'altération de la fonction cardiaque mais on note une PAP augmentée à 28mmHg. Il persiste au cours du suivi, une hémolyse compensée caractérisée par une hémoglobine à 13.7g/dl et des réticulocytes à 175G/l sans hyperbilirunémie (bilirubinémie à 3mg/l), sans franche splénomégalie (rate mesurée à 12.5cm). On note l'apparition de lithiases vésiculaires.

Il est à noter qu'avant la naissance du cas index, dans un contexte de grossesse gémellaire bichoriale, la patiente B a été confrontée à la mort des 2 fœtus à 27 semaines d'aménorrhée. L'un par mort fœtale in utero à 27SA dans un contexte d'anasarque sévère et l'autre décédé à la naissance, également à 27SA. Les tests génétiques n'ont pas pu être réalisés.

Patient C :

Il s'agit du premier enfant du cas index. Le diagnostic a été établi dès la naissance (terme 38+6). Les périodes prénatale et néonatale ont été marquées par la présence d'un état d'anasarque d'intensité modérée (ascite, épanchement pleural, œdème sous-cutané) n'ayant pas nécessité la réalisation de ponctions évacuatrices. Cet état s'est accompagné d'une anémie avec un taux d'hémoglobine minimum rapporté à 9g/dl n'ayant pas nécessité de transfusion, associée à un ictère sévère corroboré par une

hyperbilirubinémie libre maximale à 228mg/l ayant nécessité la réalisation d'une photothérapie.

Au moment du diagnostic on note une compensation de l'anémie hémolytique hémoglobine à 16.6g/dl normale pour l'âge et des réticulocytes à 171G/l.

On observe une disparition complète des OP au bout de 45 jours.

L'évolution est cependant marquée à l'âge de 8mois, par la mise en évidence de lithiases vésiculaires motivant la réalisation d'une cholécystectomie à l'âge de 3 ans.

Les derniers éléments de suivi, à l'âge de 9 ans, font toujours état d'une hémolyse compensée avec une hémoglobine élevée pour l'âge à 15g/dl et des réticulocytes à 153G/l, associés à une splénomégalie mesurée à 9x6,4x8 cm asymptomatique. On note une ferritine dans la norme à 129µg/l sans hépatomégalie. Il n'y avait pas de pseudo hyperkaliémie. La kaliémie était à 4.9mmol/l.

Patient D :

Il s'agit du 2^{ème} enfant du cas index dont le diagnostic a également été établi à la naissance (terme :38+1) devant un tableau d'anasarque sévère prénatal et post natal (ascite) ayant nécessité une évacuation par ponctions in-utero et d'une assistance respiratoire non invasive à la naissance. On remarque une absence d'anémie, d'ictère néonatale et de splénomégalie objectivés.

Au diagnostic, on note une hémoglobine à 19.5g/dl, normale pour l'âge avec des réticulocytes à 399G/l.

Les OP ont complètement disparu 60 jours après la naissance.

A l'âge de 7 ans on note l'apparition d'une splénomégalie mesurée à 9x6x7cm associée à une hémolyse compensée se traduisant par une hémoglobine à 14.1g/dl des réticulocytes à 159G/l et une bilirubine normale à 19mg/l. Il n'y a pas de surcharge en fer avec une ferritinémie à 95µg/l. On note une pseudohyperkaliémie à 5.3mmol/l.

3.1.2 Famille n°2 :

Patient A :

Il s'agit du cas index diagnostiqué à 17 mois qui avait présenté une anasarque in utero sans nécessité d'évacuation par ponctions. Il ne présentait plus d'œdèmes à la naissance (terme : 41SA). Il a présenté une anémie néonatale à 7.1g/dl sans ictère ni splénomégalie

associée, ayant nécessité la transfusion de CGR à 2 reprises à 1 mois et 2 mois de vie. Il n'y avait pas de surcharge en fer sérique.

Au diagnostic on notait une la persistance d'une anémie peu régénérative avec une hémoglobine à 7.9g/dl avec des réticulocytes à 124G/l.

Les dernières données collectées à l'âge de 14 ans font état de la persistance d'une anémie modérée, non régénérative avec une hémoglobine à 11.8g/dl et des réticulocytes à 81G/l sans splénomégalie et sans hyperbilirubinémie (12mg/l). On rapporte une hyperferritinémie à 313µg/l et une kaliémie à la limite supérieure de la normale à 5.1mmol/l.

3.1.3 Famille n°3 :

Patient A :

Chez ce patient, le diagnostic est posé à l'âge de 36 ans, dans le cadre d'une enquête familiale réalisée dans les suites d'une IMG (cas index) pour état d'anasarque sévère avec ascite, épanchement pleuropéricardique et infiltration sous cutanée à 28SA. Il avait présenté à sa naissance des OP modérés associés à un ictère néonatal et une splénomégalie.

Il présente à 36 ans une surcharge hépatique en fer. Au diagnostic la ferritine est à 828µg/l et l'IRM hépatique fait état d'une surcharge à 190µg/g. Un traitement chélateur du fer en association à des saignées est initié. Au diagnostic on note une hémolyse compensée avec un taux d'hémoglobine à 14.4g/dl avec des réticulocytes à 404G/l.

L'évolution montre à l'âge de 44ans, la présence d'une anémie hémolytique non compensée avec une hémoglobine à 10.4g/dl des réticulocytes à 287G/l avec une splénomégalie à 21cm et une hyperbilirunémie à 48.3 mg/l. La surcharge en fer est corrigée avec une ferritine à 209µg/l. On note la présence d'une hépatomégalie associée mesurée à 15cm. Il est à noter que ce patient présente aussi une double hétérozygotie HFE (H63D et C282Y) qui bien que non pourvoyeuse à elle seule d'un tableau d'hémochromatose, est connue pour majorer la surcharge en cas d'existence d'une autre pathologie du métabolisme du fer.

A l'âge de 45ans, une lésion hépatique maligne non métastatique a été diagnostiquée, l'analyse histologique est en faveur d'un adénocarcinome moyennement à peu différencié évoquant une lésion biliopancréatique primitive.

Il n'y a pas d'altération de la fonction cardiaque et on note une pseudohyperkaliémie à 5.7mmol/l.

3.1.4 Famille n°4 :

Chez ce patient né cette année, le diagnostic a été posé à la naissance (terme 34 SA) dans un contexte d'anasarque sévère prénatale et néonatale comprenant une ascite chyleuse et des épanchements pleuropéricardiques ayant nécessité la réalisation de ponctions évacuatrices in utero et post natales.

Il a présenté une anémie néonatale avec une hémoglobine minimale à 7,1g/dl, associée à un ictère sévère et une hyperbilirubinémie maximale à 208mg/l sans splénomégalie. Il a dû bénéficier de transfusions de CGR. On note une hyperferritinémie à 306µg/l.

Les OP sont résolutifs au bout de quelques mois.

3.1.5 Famille 5 :

Chez ce patient, le diagnostic est posé à l'âge de 6 ans lors de l'exploration d'une anémie hémolytique, avec une hémoglobine à 7.7g/dl et des réticulocytes à 148G/l. Il a présenté à la naissance une ascite chyleuse et un ictère néonatal. Il a été transfusé dans ce contexte d'anémie secondaire à une infection à parvovirus B19.

3.2 Analyses des données

3.2.1 Sur le plan des Œdèmes périnataux

Tous les sujets porteurs de mutation V598 dans notre cohorte (n=8/8) ont présenté des OP. Les OP occupent une place prédominante dans le diagnostic. En effet, ils sont à l'origine du diagnostic pour 4 des 5 cas index. En outre, dans 2 familles, 2 grossesses ont été marquées par une évolution défavorable. Dans la famille 1, une grossesse gémellaire s'est compliquée d'une anasarque entraînant une mort foétale in utero à 27SA tandis que le deuxième enfant est décédé à la naissance à 27SA. Dans la famille 3, une grossesse a été marquée par une Interruption Médicale Volontaire dans un contexte d'anasarque sévère. Ces trois fœtus n'ont pu être testés. En l'absence d'autre cause retrouvée, il est fortement suspecté que ces anasarques soient liés à la transmission d'un variant Piezo1 V598.

Dans notre cohorte, les œdèmes sont d'intensité variable. En effet, 6 patients sur 8 ont présenté des OP sévères nécessitant une prise en charge en réanimation, avec ventilation mécanique pour

l'un d'entre eux. Deux patients sur 8 ont présenté des OP d'intensité moyenne. Chez 4 patients, des ponctions évacuatrices ont été réalisées, 2 avant la naissance et 3 après leur naissance. Dans tous les cas décrits, l'évolution des OP a été favorable dans les jours ou mois suivant la naissance, et totalement résolutive sans récurrence sauf pour le cas index de la famille 1. Chez ce patient, on constate une réapparition d'œdèmes au niveau des pieds, des chevilles et des mollets à l'âge de 14 ans de manière intermittente et saisonnière en période chaude initialement. Ces œdèmes deviennent permanents à l'âge adulte (Figure 2).

Nous avons comparé cette fréquence élevée d'OP (100%) dans la cohorte V598 à celle de la population de sujets XH présentant une mutation PIEZO1 non V598. La prévalence des OP est de 13%, avec 13 cas d'OP d'intensité variable pour 99 patients PIEZO1 mutés non V598.

3.2.2 Impact des mutations au codon 598 et Mode de transmission :

Le codon V598 est situé dans l'exon 14 du gène **PIEZO1**. Deux variants faux sens sont retrouvés, causés par la variation d'un seul nucléotide de la séquence d'ADN génomique (Single Nucléotide Variant), il s'agit des variants p.Val598Leu, c.1792G>C identifié dans 2 familles et p.Val598Met, c.1792G>A, identifié dans 3 familles (**Figure 7**). On peut noter qu'il s'agit dans les 2 cas de la mutation du G d'un dimère CpG, connu pour avoir un taux de mutation élevé. Selon les algorithmes permettant de prédire le pouvoir pathogène des mutations, la mutation p.Val598Met est prédite comme délétère et la mutation p.Val598Leu comme probablement délétère (**Table 2**).

Dans la famille n°1, 4 cas sur 3 générations sont tous porteurs de la mutation p.Val598Leu, non décrite dans les bases de données, associée, en cis à 2 mutations de l'exon 18, p.Gly782Ser et p.Arg808Gln. Il s'agit donc d'un même allèle porteur des 3 SNV. Les deux variants associés sont prédits pathogènes par les algorithmes, néanmoins, leur fréquence décrite dans ExAc est supérieure à 0.5%. D'après ces éléments et les données locales, il est peu probable que ces 2 mutations soient réellement délétères, mais on ne peut exclure qu'elles aient un rôle majorant l'effet de la mutation princeps p.Val598Leu.

Dans le cas de la famille n°2, on note la présence de la mutation p.Val598Leu associée à un second SNV p.Pro2510Leu. L'étude familiale a permis de retrouver la mutation p.Pro2510Leu de PIEZO1 chez le père, normal, mais aucun des parents n'était porteur de p.Val598Leu. Les études de ségrégation ont confirmé que la mutation p.Val598Leu était

apparu de novo chez le cas index. Là encore, bien que prédite délétère par plusieurs algorithmes, la mutation p.Pro2510Leu de Piezo1 a une fréquence de 1,6% dans la base de données ExAc, peu compatible avec un rôle délétère, mais on ne peut exclure qu'elle ait un rôle majorant l'effet de la mutation princeps p.Val598Leu. Dans les familles n°3, 4 et 5, on retrouve le même variant, p.Val598Met, isolé, ce variant n'est pas décrit dans les bases de données, il est prédit délétère par plusieurs algorithmes. Concernant la famille 3, aucun membre de la famille à part le sujet A n'était accessible à l'étude génétique ou phénotypique, on peut noter néanmoins que l'interrogatoire du sujet A ne retrouve aucun antécédent familial évocateur de XH. Dans les familles 4 et 5, la mutation p.Val598Met n'est identifiée chez aucun des deux parents, asymptomatiques. Après vérification de la ségrégation, on conclut donc à une mutation *de novo* pour les 2 cas index des familles 4 et 5.

Ainsi, à partir de 4 familles informatives, le variant au codon 598 est apparu *de novo* dans 3 familles. Ensuite, la transmission est autosomique dominante.

	Référence Du variant (SNV) <u>dbSNP</u>	Mutations	Exon	Acides aminés	Type de mutation	Prédiction du Pouvoir Pathogène	Mode de transmission
Famille n°1	Aucune	c.1792G>C	14	p.Val598Leu	Faux sens	Probablement	Autosomique dominant
	rs200970763	c.2344G>A	18	p.Gly782Ser	Faux sens	Pathogène	
	rs202103485	c.2423G>A	18	p.Arg808Gln	Faux sens	Pathogène	
Famille n°2	Aucune	c.1792G>C	14	p.Val598Leu	Faux sens	Probablement	De novo
	rs61745086	c.7529C>T	51	p.Pro2150Leu	Faux sens	Signification clinique incertaine	
Famille n°3	Aucune	c.1792G>A	14	p.Val598Met	Faux sens	Pathogène	ND
Famille n°4	Aucune	c.1792G>A	14	p.Val598Met	Faux sens	Pathogène	De novo
Famille n°5	Aucune	c.1792G>A	14	p.Val598Met	Faux sens	Pathogène	De novo

Tableau 2:Etude des mutations et de leurs modes transmission chez les patients de notre cohorte 598 mutés.

ND pour Non déterminé.

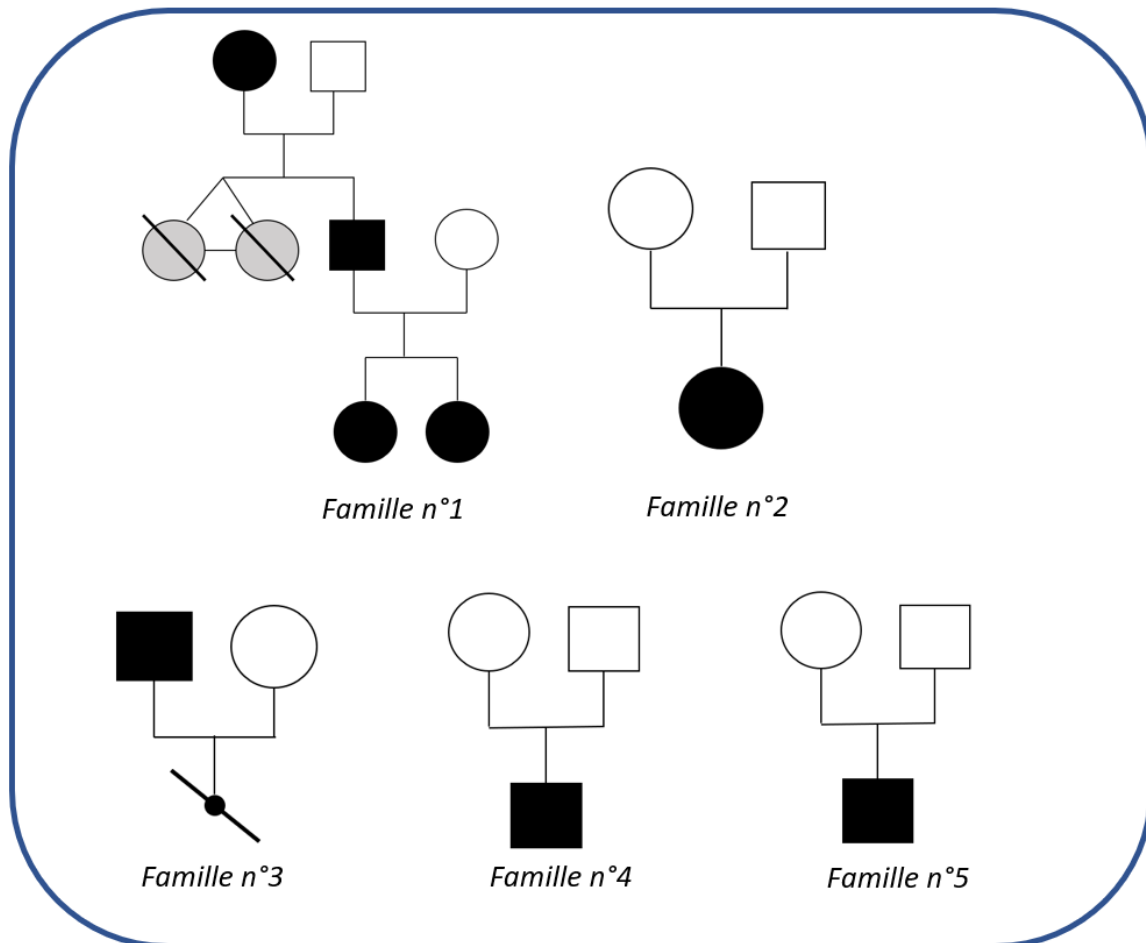


Figure 7. Arbres généalogiques des familles atteintes de XH par mutation du codon 598

3.2.3 Caractérisation de l'anémie et de l'hémolyse :

A partir des données recueillies nous avons mis en évidence la présence d'une anémie à la naissance chez 5/8 sujets, ayant nécessité une transfusion de CGR pendant la période néonatale chez 4 d'entre eux avec un taux d'hémoglobine variant de 7.1 à 9 g/dl. Il y avait 3 cas d'ictères néonataux sur les 8 patients avec nécessité d'une prise en charge par photothérapie. Un des patients a également bénéficié d'un échange transfusionnel. Au diagnostic, on note une hémoglobine moyenne à 12.7 g/dl (médiane 14.3 g/dl) dans notre cohorte (n=8). On note une moyenne à 11.7 g/dl chez les enfants (n=5) et de 14.4 g/dl chez les adultes (n=3).

Par comparaison à la période néonatale, l'évolution des patients à l'âge adulte est marquée par une évolution vers un profil d'hémolyse compensée avec une hémoglobine moyenne à 12 g/dl (médiane de 12.8 g/dl), des signes de régénération avec des réticulocytes en moyenne à 185 G/L (médiane à 167 G/l) associée à une hyperbilirubinémie totale moyenne à 26 mg/l (médiane de 19 mg/l).

Dans la population des patients ayant une XH PIEZO 1 sans être porteurs de la mutation V598 (n= 99), on retrouve au diagnostic une hémoglobine moyenne à 13.3 g/dl et une médiane à 13.5 g/dl. On observe également un phénomène d'hémolyse chronique compensée persistant avec lors des derniers suivis des patients, une hémoglobine moyenne de 12.9 g/dl avec une médiane de 12.7g/dl, des réticulocytes en moyenne à 284 G/l avec une médiane de 273 G/l et une bilirubine moyenne à 71.5 mg/l avec une médiane de 49 mg/l.

On note un cas de splénomégalie néonatale rapportée qui persiste à l'âge adulte (44 ans) avec une mesure échographique de la rate à 15 cm. Au cours de l'évolution des patients on rapporte 4 cas supplémentaires de splénomégalie, 2 décrites à l'âge adulte (33 et 35ans) et 2 dans l'enfance (7 et 8 ans).

Ainsi, l'hémolyse semble plus prononcée chez les patients non V598 mutés. Après analyse statistique, on ne note pas de différence significative au diagnostic en ce qui concerne l'hémoglobine avec une p-value à 0.96 et en ce qui concerne les réticulocytes avec une p value à 0.84 (**Figure 8**).

L'analyse des dernières données de suivi ne retrouve pas de différence significative entre la médiane d'hémoglobine de la population V598 et de la population V598 non mutée avec une p-value à 0.678 de même en ce qui concerne la bilirubine avec une p-value à 0.693.

Cependant, on retrouve une régénération significativement plus importante des patients non V598 mutés avec une p-value à 0.03 (**Figure 9**).

Au total, l'hémolyse apparaît donc moins marquée chez les patients Piezo1 V598M que chez les patients non V598, cette différence est modérée.

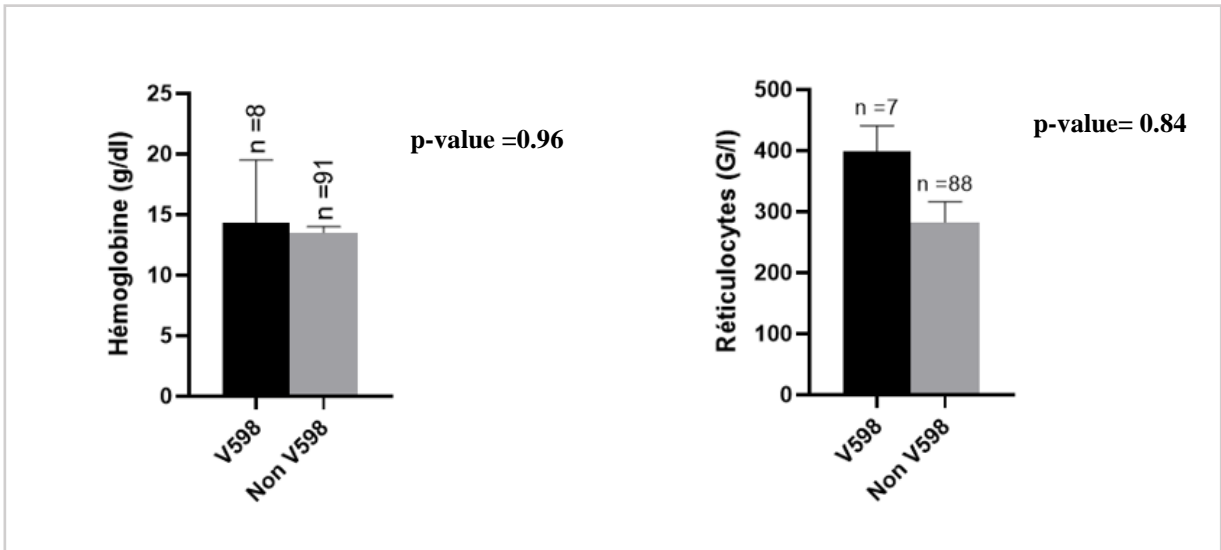


Figure 8. Evaluation de l'anémie hémolytique au diagnostic. *Il n'y a pas de différence significative entre l'hémoglobinémie des patients atteints de XH porteurs de la mutation V598 et les autres au diagnostic. Le constat est le même en ce qui concerne les réticulocytes.*

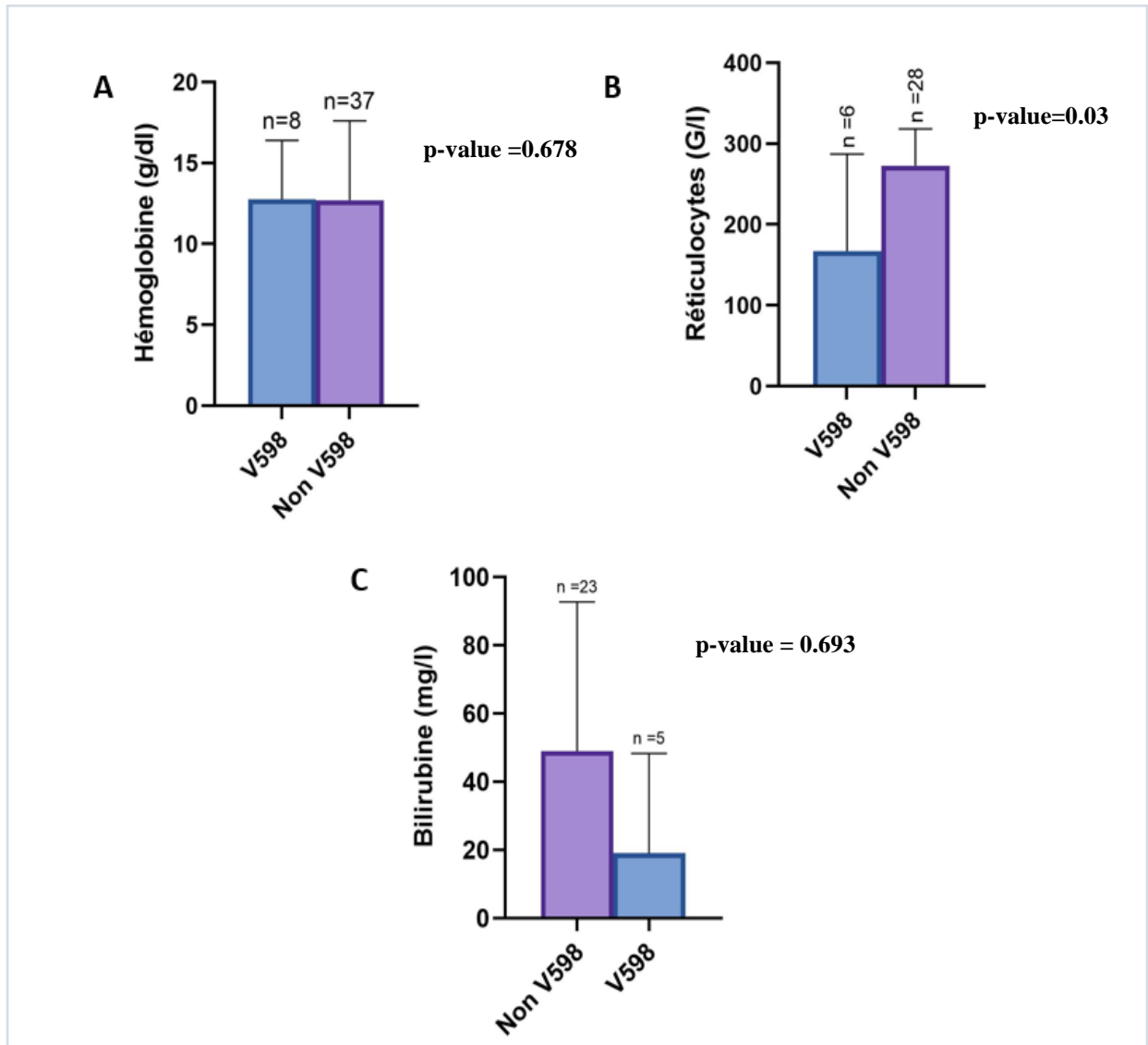


Figure 9. Evaluation de l'hémolyse chez les patients atteints de XH V598 mutés et les non mutés V598 au cours du suivi. *Figure A.* Absence de différence significative entre les deux populations en ce qui concerne l'hémoglobinémie. *Figure B.* Réticulocytose significativement plus élevée chez les patients non V598 avec $p=0.03$. *Figure C.* Absence de différence significative sur la bilirubinémie entre les deux groupes.

3.2.4 Etude de la surcharge en fer :

Les patients de notre cohorte présentent une tendance à la surcharge du fer documentée par une ferritinémie moyenne de 332 $\mu\text{g/l}$ avec une médiane de 306 $\mu\text{g/l}$. On note une hyperferritinémie chez un nouveau-né avec à 306 $\mu\text{g/l}$, chez 1 patient dans l'adolescence (14 ans) et chez 3 adultes (34, 54 ans et 45 ans). Nous ne possédons pas la valeur de ferritine d'un des patients de la cohorte.

On rapporte une hépatomégalie à l'âge adulte chez 3 patients de notre série mesurée entre 15 et 19 cm. Ces patients présentant une surcharge sérique en fer, ont bénéficié d'une IRM

hépatique montrant une surcharge ferrique estimée à 40, 95 et 190 μ g/g. Les 2 derniers patients bénéficient d'une chélation médicamenteuse du fer associée à des phlébotomies pour l'un d'entre eux. Il s'agit du patient qui a présenté une surcharge martiale importante dont l'origine est probablement mixte puisque qu'il présente aussi 2 mutations hétérozygotes du gène HFE. Il a par ailleurs récemment été diagnostiqué d'un adénocarcinome non métastatique des voies biliaires.

On note une hyperferritinémie en moyenne de 319 mg/l avec une médiane de 198mg/l chez les non mutés V598.

Il semble y avoir une tendance plus élevée à la surcharge en fer chez les patients V598 mutés. Les analyses statistiques réalisées ne permettent cependant pas la mise en évidence d'une différence significative entre l'hyperferritinémie des 2 populations de patient (V598 mutés et non V598 muté) avec une p-value à 0.4 (**Figure 10**).

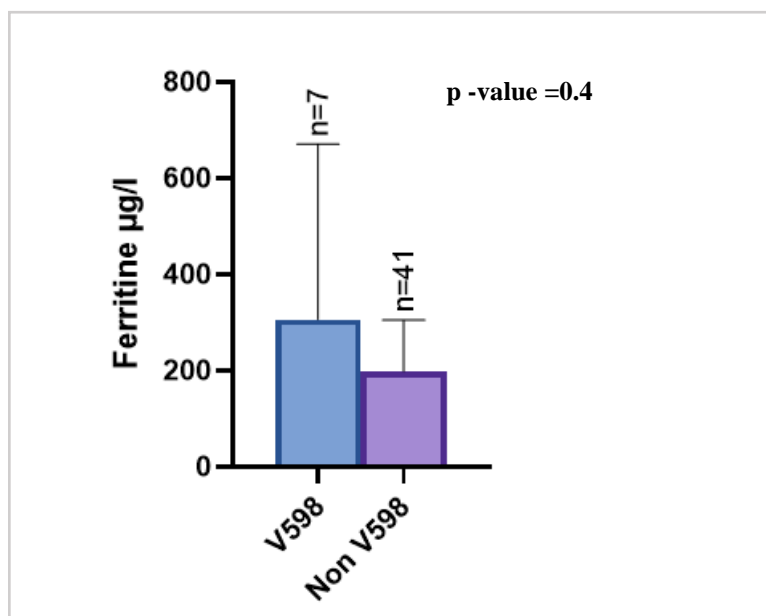


Figure 10. Evaluation de la surcharge en fer au cours du suivi.
Absence de différence significative.

3.2.5 Etude de la pseudohyperkaliémie :

On note une hyperkaliémie chez 5 patients sur les 6 pour lesquelles une kaliémie est disponible dans la cohorte V598 avec une moyenne de 5.2 mmol/l (médiane de 5.2mmol/l).

Cette moyenne est de 4,94 dans la cohorte PIEZO 1 mutée hors mutation V598 avec une médiane de 4.4 mmol/l.

Après comparaison des médianes de ces 2 populations, il n'y a pas de différence significative avec une p-value de 0.06 (**Figure 11**).

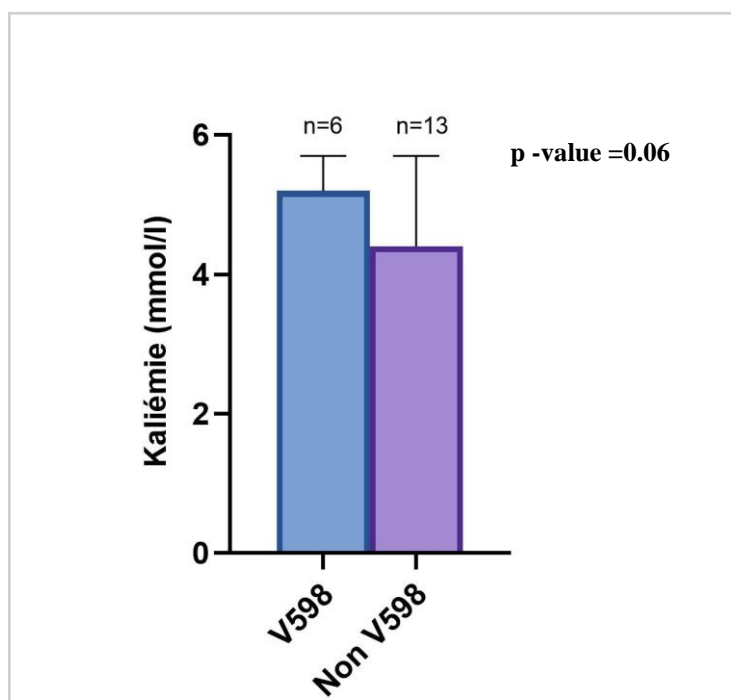


Figure 11. Comparaison de la Kaliémie selon la mutation. Il n'y a pas de différence significative entre les kaliémies des patients atteints de XH porteurs d'une mutation du codon 598 et les autres

4 DISCUSSION

Dans cette étude rétrospective, nous avons décrit les caractéristiques d'une sous-population de patients atteints de Xérocytose Hériditaire. Ceci nous a ainsi permis de mettre en évidence, pour la première fois, une relation phénotype/génotype dans cette pathologie connue pour des manifestations cliniques et biologiques très hétérogènes.

En effet, les patients porteurs d'une mutation de PIEZO1 au codon V598 présentent tous des œdèmes périnataux, souvent à l'origine du diagnostic. Ces œdèmes sont de sévérité variable pouvant mettre en jeu le pronostic vital et nécessiter la réalisation d'une intervention médicale prénatale et néonatale. L'intérêt de porter ce diagnostic est aussi pronostique, en effet, si ils nécessitent souvent une prise en charge adaptée, les œdèmes

disparaissent ensuite dans les jours ou les mois suivant la naissance. Pour un seul patient de cette cohorte, (cas index, famille 1), des œdèmes sont réapparus à l'adolescence, documentés par lymphoscintigraphie et angio-IRM.

L'analyse des autres paramètres de ce petit effectif de patients a également permis de mettre en évidence une réticulocytose significativement plus faible chez les mutés V598, de manière modérée. Elle n'a cependant pas permis de mettre en évidence d'autres différences significatives entre les patients porteurs d'une mutation V598 et les autres. En effet, la majorité des patients V598 mutés présente comme les patients non V598 mutés, une hémolyse à l'origine dans certains cas d'une anémie néonatale qui évolue vers une hémolyse chronique compensée associée à une réticulocytose. Certains patients présentent dans ce contexte une splénomégalie. Aucun n'a été splénectomisé. La splénectomie s'avère en générale inefficace et se complique parfois d'une maladie thromboembolique (thrombose porte, thromboses veineuses profondes, AVC). Cependant il semble exister chez les patients mutés V598 une tendance à l'hémolyse moins prononcée et une surcharge en fer plus marquée. Ainsi, on observe surcharge en fer biologique chez 5 patients sur 8 (une ferritinémie n'est pas disponible) avec dans 2 cas une atteinte viscérale nécessitant la mise en place d'une chélation en fer. Ce constat peut être biaisé par l'effectif réduit des patients testés. On note également une tendance à l'hyperkaliémie expliquée par la stase des prélèvements à température ambiante.

Il est intéressant de souligner que la mutation V598 survient de novo chez 3 patients sur 4 familles informatives. Ceci n'a pas été rapporté précédemment, en effet, on observe le plus souvent une transmission autosomique dominante, caractérisé par la description de familles de patients atteints sur plusieurs générations. On peut noter que pour les 2 familles (5 patients) présentant la mutation V598L, une à deux autres mutations de PIEZO1 sont retrouvées. Il s'agit, de mutations faux sens, p.P2510L dans un cas, la ségrégation allélique n'est pas connue, et pour la famille 1, il s'agit de 2 mutations de l'exon 18 en cis. Une hypothèse est que ces mutations, pourraient majorer le phénotype. Néanmoins, leur rôle ne peut être défini dans l'état actuel des connaissances. Enfin, contrairement à la majorité des mutations de PIEZO1 répertoriées, la mutation V598 ne concerne pas le domaine C-terminal ni le pore du canal. La valine 598 est localisée dans le domaine extracellulaire, au niveau des pales de cette molécule hélicoïdale. Ce domaine serait à l'origine de la perception du signal de stress mécanique appliqué à la membrane (13).

Dans la littérature, on retrouve la description d'une patiente présentant la mutation p.V598M qui vient étayer les données de notre cohorte. Ainsi, Radhakrishnan et al. rapportent le cas d'une patiente brésilienne chez qui le diagnostic de XH a été porté à l'âge de 35 ans. En l'absence d'antécédents familiaux, la mutation V598M est considérée de novo (21, 22). L'ekacytométrie montre un profil typique de XH. Cette patiente a présenté des œdèmes importants caractérisés par un état d'anasarque à la naissance résolutif. Elle a également présenté un ictère associé à une anémie hémolytique sévère à la naissance ayant nécessité la réalisation de transfusions de culots globulaires rouges. Une splénectomie a été réalisée, sans complication thrombotique identifiée, puis une cholécystectomie. Des examens complémentaires ont mis en évidence une surcharge en fer compliquée d'une hépatosidérose documentée par biopsie hépatique également associée à une surcharge myocardique compliquée d'une insuffisance cardiaque. Elle bénéficie dans ce contexte d'un traitement chélateur du fer qui est efficace. On note la persistante d'une anémie à l'âge adulte avec une hémoglobinémie à 9.9g/dl. Les analyses fonctionnelles réalisées à partir de GR mutés V598M, dans cette étude, montrent comme dans les autres cas de XH, le rôle de PIEZO1 et GARDOS dans l'homéostasie du GR. On retrouve dans les GR de la patiente une augmentation significative de l'efflux potassique et du courant ionique membranaire sensibles au SENICAPOC, ce qui est cohérent avec une hyperactivité du canal GARDOS suite à l'activation de PIEZO1. On observe aussi une diminution de la pression hydrostatique nécessaire à l'activation de PIEZO1 dans les GR V598M, en accord avec un gain de fonction du canal Piezo1. Ces résultats rejoignent ceux des tests fonctionnels réalisés par Rapetti Mauss et al (13), mettant également en évidence une augmentation de la résistance osmotique des GR V598 mutés, une augmentation du courant ionique transmembranaire et une réversibilité de ces effets en présence de SENICAPOC. De manière inattendue, les études fonctionnelles mettent aussi en évidence, pour les GR V598 mutés, une capacité d'ouverture spontanée du canal ionique sans stimulus mécanique, une activité électrique membranaire basale augmentée et une capacité d'activation en présence d'une pression hydrostatique négative sans nécessité de stimulus mécanique. Ces éléments sont en faveur du rôle du domaine N-terminal constituant les 'pales de l'hélice' de Piezo1 dans la perception et la transmission des forces appliquées à la membrane.

Le Protocole National de Diagnostic et de Soins de 2021, codifie la prise en charge des patients atteints de XH de la naissance à l'âge adulte en ce qui concerne le diagnostic, la surveillance, le traitement des complications ainsi que l'encadrement des grossesses (1). Les thérapeutiques recommandées résident dans une prise en charge symptomatique des OP, de l'anémie avec des transfusions, et d'une prise en charge de la surcharge en fer par la réalisation de phlébotomies lorsque cela est possible ou par des médicaments chélateurs de fer. La gestion des œdèmes fœtaux in utero et des OP se fait au cas par cas après discussion pluridisciplinaire.

La surveillance des grossesses dans le cas où l'un des parents est atteint de XH doit se faire dans une maternité de niveau 3 avec une surveillance échographique mensuelle ou bimensuelle en cas d'anomalie, à partir du 3ème mois. Une surveillance d'emblée rapprochée est nécessaire dans le cas de fœtus potentiellement porteur d'une mutation V598 au vu de la pénétrance complète des OP dans notre cohorte à laquelle s'ajoute la présence de 2 cas de morts fœtales in utero et le recours à une IMG à 28SA dans un contexte d'anasarque. Il pourrait exister dans certains cas, un intérêt à la réalisation d'une procréation médicalement assistée.

Enfin, le SENICAPOC dont l'efficacité sur l'anémie hémolytique dans la drépanocytose a été prouvé avec une bonne tolérance dans essai clinique randomisé contrôlé réalisé par l'équipe américaine de Ataga et al. (23) n'a pas encore pu être utilisé chez les patients atteints de XH. D'après les résultats des essais in vitro, le SENICAPOC pourrait diminuer l'expression de la maladie dans les formes expressives de XH et ainsi diminuer le recours à la transfusion, la surcharge en fer afin d'améliorer la prise en charge de certains patients

5 CONCLUSION

Notre étude permet de mettre en évidence une relation phénotype/génotype dans la xérocytose héréditaire. En effet, les patients porteurs d'une mutation au codon 598, p.V598M ou p.V598L présentent tous des œdèmes périnataux de sévérités variables pouvant nécessiter une intervention médicale pré natale ou péri natale afin de garantir le pronostic vital. Cette particularité est à prendre en compte lors de l'accompagnement des patients, notamment en cas de projet de parentalité.

Il semble y avoir une tendance à l'hémolyse moins prononcée tandis que la surcharge en fer semble plus souvent présente chez les patients V598 en comparaison aux autres patients porteurs d'une PIEZO1. Malgré cette relation phénotype/génotype, il reste une hétérogénéité phénotypique clinique et biologique entre les patients V598 mutés.

6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- (1) PNDS 2021 Sphérocytose héréditaire et autres anémies hémolytiques par anomalies de la membrane érythrocytaire.
- (2) De Meira Oliveira P, Balan A, Muto NH, Cervato MC, Fonseca GHH, Suganuma LM, Gualandro S, Pinho JRR, Mohandas N, Silveira PAA, Sitnik R. Heterogeneous phenotype of Hereditary Xerocytosis in association with PIEZO1 variants. *Blood Cells Mol Dis*. 2020 May;82:102413. doi: 10.1016/j.bcmd.2020.102413.
- (3) Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*. 2016 Nov;101(11):1284-1294. doi: 10.3324/haematol.2016.142463.
- (4) Zarychanski R, Schulz VP, Houston BL, Maksimova Y, Houston DS, Smith B, Rinehart J, Gallagher PG. Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*. 2012 Aug 30;120(9):1908-15. doi:10.1182/blood-2012-04-422253.
- (5) Gnanasambandam R, Rivera A, Vadorpe DH, et al. Increased Red Cell KCNN4 Activity in Sporadic Hereditary Xerocytosis Associated With Enhanced Single Channel Pressure Sensitivity of PIEZO1 Mutant V598M. *Hemasphere*. 2018;2(5):e55. doi:10.1097/HS9.0000000000000055
- (6) Picard V, Guitton C, Thuret I, Rose C, Bendelac L, Ghazal K, Aguilar-Martinez P, Badens C, Barro C, Bénéteau C, Berger C, Cathébras P, Deconinck E, Delaunay J, Durand JM, Firah N, Galactéros F, Godeau B, Jaïs X, de Jaureguiberry JP, Le Stradic C, Lifermann F, Maffre R, Morin G, Perrin J, Proulle V, Ruivard M, Toutain F, Lahary A, Garçon L. Clinical and biological features in *PIEZO1*-hereditary xerocytosis and Gardos channelopathy: a retrospective series of 126 patients. *Haematologica*. 2019 Aug;104(8):1554-1564. doi: 10.3324/haematol.2018.205328.
- (7) Rapetti-Mauss R, Lacoste C, Picard V, Guitton C, Lombard E, Loosveld M, Nivaggioni V, Dasilva N, Salgado D, Desvignes JP, Bérourd C, Viout P, Bernard M, Soriani O, Vinti H, Lacroze V, Feneant-Thibault M, Thuret I, Guizouarn H, Badens C. A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis. *Blood*. 2015 Sep 10;126(11):1273-80. doi: 10.1182/blood-2015-04-642496.

- (8) Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1 [published correction appears in *Nature*. 2022 Jul;607(7919):E10]. *Nature*. 2018;554(7693):481-486. doi:10.1038/nature25453
- (9) Caulier A, Jankovsky N, Demont Y, Ouled-Haddou H, Demagny J, Guitton C, Merlusca L, Lebon D, Vong P, Aubry A, Lahary A, Rose C, Gréaume S, Cardon E, Platon J, Ouadid-Ahidouch H, Rochette J, Marolleau JP, Picard V, Garçon L. PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica*. 2020 Mar ;105(3):610-622. doi:10.3324/haematol.2019.218503.
- (10) Moura PL, Hawley BR, Dobbe JGG, Streekstra GJ, Rab MAE, Bianchi P, van Wijk R, Toye AM, Satchwell TJ. PIEZO1 gain-of-function mutations delay reticulocyte maturation in hereditary xerocytosis. *Haematologica*. 2020 Jun;105(6), doi: 10.3324/haematol.2019.231159.
- (11) Patrick G. Gallagher; Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* 2017; 130 (25): 2699–2708. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-590810>
- (12) Caulier A, Rapetti-Mauss R, Guizouarn H, Picard V, Garçon L, Badens C. Primary red cell hydration disorders: Pathogenesis and diagnosis. *Int J Lab Hematol*. 2018 May;40 Suppl 1:68-73. doi: 10.1111/ijlh.12820.
- (13) Rapetti-Mauss, R., Picard, V., Guitton, C., Ghazal, K., Proulle, V., Badens, C., Soriani, O., Garçon, L., & Guizouarn, H. (2017). Red blood cell Gardos channel (KCNN4): the essential determinant of erythrocyte dehydration in hereditary xerocytosis. *Haematologica*, 102(10), doi.org : 10.3324/haematol.2017.171389
- (14) Delaunay J. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Semin Hematol*. 2004 Apr;41(2):165-72. doi: 10.1053/j.seminhematol.2004.02.005.
- (15) Kiger L, Oliveira L, Guitton C, Bendélac L, Ghazal K, Proulle V, Galacteros F, Junot C, Fenaille F, Roméo PH, Garçon L, Picard V. Piezo1-xerocytosis red cell metabolome shows impaired glycolysis and increased hemoglobin oxygen affinity. *Blood Adv*. 2021 Jan 12;5(1):84-88. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003028.

- (17) Lazarova E, Gulbis B, Oirschot BV, van Wijk R. Next-generation osmotic gradient ektacytometry for the diagnosis of hereditary spherocytosis: interlaboratory method validation and experience. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Mar 1;55(3):394-402. doi: 10.1515/ccm-2016-0290.
- (18) Fotiou E, Martin-Almedina S, Simpson MA, Lin S, Gordon K, Brice G, Atton G, Jeffery I, Rees DC, Mignot C, Vogt J, Homfray T, Snyder MP, Rockson SG, Jeffery S, Mortimer PS, Mansour S, Ostergaard P. Author Correction : Novel mutations in PIEZO1 cause an autosomal recessive generalized lymphatic dysplasia with non-immune hydrops fetalis. *Nat Commun*. 2019 Apr 26 ;10(1):1951. doi: 10.1038/s41467-019-09905-4.
- (19) Lukacs, V., Mathur, J., Mao, R. *et al.* Impaired PIEZO1 function in patients with a novel autosomal recessive congenital lymphatic dysplasia. *Nat Commun* **6**, 8329 (2015). doi.org/10.1038/ncomms9329
- (20) Vignes S, Kaltenbach S, Garçon L, Arrivé L, Asnafi V, Guitton C, Bouligand J, Delarue A, Picard V. PIEZO1-gene gain-of-function mutations with lower limb lymphedema onset in an adult: Clinical, scintigraphic, and noncontrast magnetic resonance lymphography findings. *Am J Med Genet A*. 2022 Jan;188(1):243-248. doi: 10.1002/ajmg.a.62476.
- 21) Assis RA, Kassab C, Seguro FS, Costa FF, Silveira PA, Wood J, Hamerschlak N. Iron overload in a teenager with xerocytosis: the importance of nuclear magnetic resonance imaging. *Einstein (Sao Paulo)*. 2013 Dec;11(4):528-32. doi: 10.1590/s1679-45082013000400022.
- (22) Gnanasambandam, R., Rivera, A., Vandorpe, D. H., Shmukler, B. E., Brugnara, C., Snyder, L. M., Andolfo, I., Iolascon, A., Silveira, P. A., Hamerschlak, N., Gottlieb, P., & Alper, S. L. (2018). Increased Red Cell KCNN4 Activity in Sporadic Hereditary Xerocytosis Associated With Enhanced Single Channel Pressure Sensitivity of PIEZO1 Mutant V598M. *HemaSphere*, 2(5), e55. <https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000005>

SUMMURY

Background:

Hereditary Xerocytosis (HX) is a rare red blood cell membrane disorder characterized by heterogeneous clinical manifestations that evolve with age and can be life threatening. They already shown that 90% of cases is related to gain of function mutations of the gene encoding the mechanotransducer PIEZO1. We studied 8 patients of the CohSto cohort (3 adults, five children) coming from 5 distincts families who are sufering from Hereditary Xerocytosis related to a mutation at V598 PIEZO1 codon. We aimed to make a better XH description and determine the existence of a phénotype/genotype correlations.

Material and method:

This is a non-interventional retrospective study based on clinical and biological datas. We studied the incidence of perinatal edema (PO, primary objective), iron overload, haemolytic anemia, pseudohyperkalemia (secondary objectives) according to genotype.

Résultats

All the patients mutated at codon 598, p.V598M or p.V598L, presented OP compared to 13% in the other mutated PIEZO1 patients. Compensated hemolysis or hemolytic anemia is observed in the patients studied. Reticulocytosis is significantly lower in 598 mutated patients, suggesting a lower degree of hemolysis compared to all XH patients. No significant difference was observed concerning iron overload, present in 5/8 cases or pseudohyperkalaemia present in 5/8 cases.

Conclusion-discussion

We have demonstrated a complete penetrance of OP in PIEZO1 V598 mutated partients, whereas this presentation is rare in others patients with XH related to PIEZO 1. These datas would allow a best management of mutation carriers at PIEZO1 V598 codon.

• **Keywords : Hereditary Xerocytosis- Stomatocytosis- perinatal oedema- pseudo hyperkalemia- hemolysis- iron overload**

RESUME

Introduction :

La Xérocytose héréditaire (XH) est une maladie génétique rare caractérisée par une hémolyse chronique associée à des manifestations cliniques hétérogènes, évolutives avec l'âge pouvant mettre en jeu le pronostic vital. Elle est due, dans la majorité des cas, à des mutations gain de fonction du gène codant le mécano-transducteur PIEZO1. Nous avons étudié 8 patients de la cohorte COHSTO (3 adultes, 5 enfants) issus de 5 familles distinctes, présentant une XH liée à une mutation au codon 598 de Piezo1. Notre objectif était de mieux décrire la XH liée à Piezo1 et d'en préciser les corrélations génotype/phénotype.

Matériel et Méthodes :

Il s'agit d'une étude rétrospective non interventionnelle à partir de données clinico-biologiques. Nous avons étudié l'incidence des œdèmes périnataux (OP, objectif principal), la surcharge martiale, l'anémie hémolytique, la pseudohyperkaliémie (objectifs secondaires) en fonction du génotype.

Résultats :

Tous les patients mutés au codon 598, p.V598M ou p.V598L, ont présenté des OP contre 13% chez les autres patients PIEZO1 mutés. On observe une hémolyse compensée ou une anémie hémolytique chez les patients étudiés. La réticulocytose est significativement plus basse chez les patients 598 mutés, suggérant un degré d'hémolyse moins important par rapport à l'ensemble des patients XH. Aucune différence significative n'a été observée concernant la surcharge martiale, présente chez 5/8 cas ou la pseudohyperkaliémie présente chez 5/8 cas.

Discussion-Conclusion :

Nous avons mis en évidence une pénétrance complète des OP chez les patients Piezo1 V598 mutés, alors que cette présentation est plus rare chez les autres patients présentant une XH. Ces données permettent d'adapter la prise en charge des patients porteurs de la mutation V598 de Piezo1.

Mots clés : Globule rouge -Xérocytose Héréditaire - Stomatocytose - Œdème Périnatal- Pseudohyperkaliémie - Hémolyse - Surcharge en fer

