



**HAL**  
open science

# Facteurs génétiques de surcharge en fer dans la sphérocytose héréditaire

Lucie Donaty

► **To cite this version:**

Lucie Donaty. Facteurs génétiques de surcharge en fer dans la sphérocytose héréditaire. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-04106464

**HAL Id: dumas-04106464**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04106464>**

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 - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

**Thèse**  
**pour l'obtention du**  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Soutenus le 7 octobre 2022

Par

**Lucie DONATY**

Interne en Biologie médicale

**TITRE DU MEMOIRE**

**Facteurs génétiques de surcharge en fer dans la  
sphérocytose héréditaire**

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur Jean Paul BROUILLET  
Directrices : Madame le Docteur Muriel GIANZILY BLAIZOT  
Madame le Professeur Patricia AGUILAR MARTINEZ  
Assesseurs : Monsieur le Docteur Jean Baptiste GAILLARD  
Monsieur le Professeur Thierry LAVABRE BERTRAND



## REMERCIEMENTS

### **Au président du Jury,**

M<sup>r</sup> le Professeur Jean Paul BROUILLET, merci de me faire l'honneur de présider ma thèse, je vous suis reconnaissante pour l'intérêt que vous témoignez à ce travail.

### **A mes deux directrices de thèse,**

M<sup>me</sup> le Docteur Muriel GIANZILY BLAIZOT et M<sup>me</sup> le Professeur Patricia AGUILAR MARTINEZ, merci de m'avoir confié ce sujet de thèse que j'ai eu beaucoup de plaisir à traiter. Je vous remercie également pour votre encadrement précieux tout au long de ce travail.

M<sup>me</sup> le Docteur Muriel GIANZILY BLAIZOT, je tiens également à vous remercier pour votre accueil pendant le semestre que j'ai passé dans votre service, ainsi que pour votre bienveillance tout au long de mon internat.

M<sup>me</sup> le Professeur Patricia AGUILAR MARTINEZ, je vous remercie également de m'avoir accueilli dans le laboratoire d'Hématologie tous ces semestres, ainsi que de m'avoir aidé à plusieurs reprises, notamment pour trouver une équipe d'accueil pour mon stage de Master 2.

### **Aux autres membres du Jury,**

M<sup>r</sup> le Docteur Jean Baptiste GAILLARD, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et surtout d'avoir partagé avec moi ta passion pour la génétique.

M<sup>r</sup> le Professeur Thierry LAVABRE BERTRAND, je vous remercie de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, j'espère que vous apprécierez ce travail.

### **A ma famille,**

A mes parents, je vous remercie d'avoir toujours été là pour moi. A ma Mère, je ne te remercierais jamais assez pour tout le soutien et l'amour que tu m'apportes, tu es une Maman en or !

A ma sœur, merci pour tous les moments que tu as partagés avec moi, de notre chambre d'enfant jusqu'à notre premier appart. Je sais que l'on pourra toujours compter l'une sur l'autre !

A mon frère, merci de me m'avoir toujours fait rire. J'adore retrouver notre complicité à chaque fois que l'on se revoit !

### **A mes amis,**

A toutes les très belles rencontres de mon internat : Florina, Florin, Tristane, Margaux, Victor, Valentin, Delphine, Alexandre R, Etienne, Alexandre J, Vincent, Boris, Charlotte, Mehdi, Maëliiss, Camille, Steven, Nicolas, Léo, Aneta, Maxence, Luna. Merci d'avoir embelli mon internat !

A mes amis de la fac, et particulièrement Aline, Caroline et Ismahane : j'espère que l'on continuera à se voir encore longtemps !

### **A toutes les autres personnes rencontrées pendant mes études,**

A tous les biologistes auprès desquels j'ai beaucoup aimé apprendre : Jennifer Russello, Caroline Bret, David Rizzo et Jasmine Chauzeix : je vous remercie pour tout le temps que vous m'avez accordé.

Aux techniciens du laboratoire d'hématologie du CHU de Montpellier, et tout particulièrement : Christelle, Jérémie, Vanessa et Julien, merci pour votre bonne humeur de jour comme de nuit !

A tout le laboratoire NTVZL qui m'a accueilli pendant mon master 2, et tout particulièrement l'équipe Globule Rouge : Pedro, Sandrina, Axel et Jérémie : je vous remercie pour votre gentillesse.

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	3
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	5
INTRODUCTION .....	6
I. La sphérocytose .....	6
1) Introduction.....	6
2) Diagnostic clinique .....	6
3) Diagnostic biologique .....	7
4) Prise en charge et traitement.....	7
II. Génétique de la sphérocytose.....	8
1) Formes liées au gène <i>ANK1</i> .....	8
2) Formes liées au gène <i>SLC4A1</i> .....	9
3) Formes liées au gène <i>SPTB</i> .....	11
4) Formes liées au gène <i>SPTA1</i> .....	12
5) Formes liées au gène <i>EPB42</i> .....	13
III. Surcharge en fer.....	14
1) Introduction.....	14
2) Surcharges non héréditaires .....	15
a) Iatrogène .....	15
b) Syndrome métabolique .....	15
c) Alcool .....	15
d) Maladie chronique du foie et cirrhose .....	15
e) Maladies hématologiques .....	15
3) Surcharges héréditaires.....	16
a) Hémochromatose héréditaire .....	16
i. Formes liées au gène <i>HFE</i> .....	18
ii. Formes liées au gène <i>HJV</i> .....	20
iii. Formes liées au gène <i>TFR2</i> .....	21
iv. Formes liées au gène <i>SLC40A1</i> .....	22
v. Formes liées au gènes <i>HAMP</i> .....	23
b) Autres causes génétiques.....	24
i. Formes liées au gène <i>BMP6</i> .....	24
ii. Formes liées au gène <i>FTH1</i> .....	24
iii. Formes liées au gènes <i>CYBRD1</i> .....	24
iv. Porphyrie cutanée tardive.....	24
v. Surcharges en fer génétiques associées à une anémie :.....	25
c) Gènes modulateurs .....	26
IV. Sphérocytose et surcharge en fer .....	28
1) Epidémiologie.....	28
2) Etiologie.....	28
3) Diagnostic .....	29
4) Prise en charge .....	29
OBJECTIFS .....	30

MATERIEL ET METHODES .....	30
I. Schéma de l'étude .....	30
II. Population étudiée .....	30
III. Outils bio-informatiques .....	31
1) Seqpilot® .....	31
2) Rstudio® .....	31
3) Seqone® .....	31
IV. Sélection des variants d'intérêt .....	32
1) Gènes d'intérêts .....	32
2) Recherche de variants pathogènes .....	33
3) Recherche de variants modulateurs .....	33
V. Interprétation des variants .....	34
1) Données épidémiologiques .....	34
2) Données prédictives .....	34
RESULTATS .....	36
I. Description de la population d'étude .....	36
1) Données démographiques et cliniques .....	36
2) Données biologiques .....	38
a) Numération et frottis sanguin .....	38
b) Bilan biochimique .....	38
c) Tests de confirmation phénotypique de la sphérocytose héréditaire .....	39
b) Bilan martial et prise en charge de la surcharge en fer .....	40
II. Etudes des gènes impliqués dans des pathologies du globule rouge .....	41
1) Recherche de variants pathogènes .....	41
a) Etude des gènes responsables de sphérocytose héréditaire .....	42
b) Etude des gènes impliqués dans d'autres anomalies du globule rouge .....	43
2) Etude des CNV .....	43
3) Confirmation génotypique du diagnostic de sphérocytose .....	44
4) Etude de l'impact des anomalies moléculaires .....	45
III. Etude des gènes du métabolisme du fer .....	47
1) Recherche de variants pathogènes .....	47
a) Etude des gènes impliqués dans les formes classiques d'hémochromatose .....	47
b) Etude des gènes impliqués dans les formes rares de surcharge en fer .....	48
c) Etude des autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer .....	48
2) Etude des CNV .....	48
IV. Recherche d'autres variants impliqués dans le développement d'une surcharge en fer .....	49
1) Etude des polymorphismes avec un impact sur le phénotype martial .....	49
a) Modificateurs génétiques de la ferritinémie ou du CST : .....	49
b) Modificateurs génétiques de la surcharge hépatique en fer .....	50
2) Recherche de variants non rares sous ou surreprésentés dans notre cohorte .....	51
V. Résumé des anomalies moléculaires retrouvées chez les patients sphérocytaires .....	54
DISCUSSION .....	55
CONCLUSION .....	61
ANNEXES .....	62
BIBLIOGRAPHIE .....	65

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Tableaux :

Tableau 1 : Classement des différentes formes de sphérocytoses héréditaires en fonction du taux d'hémoglobine et de réticulocytes.....	7
Tableau 2 : Classification des Hémochromatoses héréditaires selon la Société internationale de l'étude du fer en biologie et médecine (BIOIRON Society) .....	16
Tableau 3 : Listes des polymorphismes ayant un effet sur les paramètres ferriques sanguins et la sévérité de la surcharge en fer, chez les patients <i>HFE</i> C282Y, $\beta$ -thalassémiques et dans la population générale. ....	27
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et résumé de la prise en charge de la sphérocytose des 14 patients ..	37
Tableau 5 : Numération sanguine et frottis sanguin des 14 patients. ....	38
Tableau 6 : Bilan biochimique et enzymatique érythrocytaire des 14 patients.....	39
Tableau 7 : Tests spécifiques utilisés pour le diagnostic de sphérocytose des 14 patients.....	39
Tableau 8 : Bilan martial, mesure de la CHF, et prise en charge de la surcharge en fer des 14 patients. ....	40
Tableau 9 : Liste des variants pathogènes et des variants de signification incertaine retrouvés chez les 14 patients sur les gènes responsables de sphérocytose héréditaire et d'autres anomalies constitutionnelles du globule rouge.....	41
Tableau 10 : Anomalies moléculaires des gènes impliqués dans des pathologies érythrocytaires retrouvées chez les 14 patients. ....	44
Tableau 11 : Comparaison des gènes mutés entre les patients avec et sans hyperferritinémie.....	45
Tableau 12 : Comparaison des gènes mutés entre les patients avec et sans surcharge hépatique vraie .....	46
Tableau 13 : Variants pathogènes et de signification incertaine retrouvés sur les gènes responsables de surcharges en fer et du métabolisme du fer, chez les 14 patients .....	47
Tableau 14 : Distribution des variants décrits comme ayant un effet sur la ferritinémie ou le CST.....	50
Tableau 15 : Variants pour lesquels le nombre d'allèles diffère significativement chez les patients sphérocytaires par rapport à la population générale et témoin.....	51
Tableau 16 : Variants pour lesquels le nombre de patients homozygotes ou hétérozygotes diffère significativement chez les patients sphérocytaires par rapport à la population générale et témoin .....	52
Tableau 17 : Variants pour lesquels un patient sphérocytaire au moins est porteur d'un génotype rare. ....	52
Tableau 18 : Résumé de l'ensemble des anomalies moléculaires retrouvées chez les 14 patients. ....	54



## Figures :

Figure 1 : Schéma de la membrane érythrocytaire et de son cytosquelette protéique .....	6
Figure 2 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>ANK1</i> .....	9
Figure 3 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>SLC4A1</i> et le phénotype associé .....	10
Figure 4 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>SPTB</i> et le phénotype associé .....	11
Figure 5 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>SPTA1</i> et le phénotype associé ...	13
Figure 6 : Représentation des différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du fer et leur implication au cours de l'hémochromatose.....	17
Figure 7 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>HFE</i> .....	19
Figure 8 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>HJV</i> .....	20
Figure 9 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>TFR2</i> .....	21
Figure 10 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène <i>SLC40A1</i> .....	23
Figure 11 : Description de la population sélectionnée pour l'étude génétique.....	36
Figure 12 : Valeurs de la ferritinémie, du CST et de la CHF en fonction de l'anomalie moléculaire responsable de la sphérocytose héréditaire.....	45
Figure 13 : Variation de la ferritine et du CST en fonction du génotype des patients pour les polymorphismes modificateurs décrits dans la littérature .....	49
Figure 14 : Sélection des variants non rares potentiellement impliqués dans le développement d'une surcharge en fer. ....	51
Figure 15 : Variation de la ferritinémie, du CST et de la CHF en fonction des génotypes <i>HFE</i> H63D. ....	53

## Annexes :

Annexe 1 : Exemple d'algorithme rédigé sur Rstudio® afin de mettre en évidence des variants non rares plus fréquemment retrouvés dans la population sphérocytaire avec hyperferritinémie que dans la population générale.....	62
Annexe 2 : Variants bénins retrouvés chez les 14 patients sur les gènes responsables de sphérocytose héréditaire et d'autres anomalies constitutionnelles du globule rouge.....	63
Annexe 3 : Variants bénins retrouvés chez les 14 patients sur les gènes responsables de surcharges en fer et les autres gènes du métabolisme du fer .....	64

## LISTE DES ABBREVIATIONS

AA : Acide aminé

ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BMP : Bone morphogenetic proteins

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CHF : Charge hépatique en fer

CNV : Copy Number Variation

CST : Coefficient de Saturation de la Transferrine

EMA : Test à l'éosine-5'maléimide

FPN : Ferroportine

GnomAD : Genome Aggregation Database

GPI : GlycosylPhosphatidyInositol

GR : Globule Rouge

HAS : Haute autorité de Santé

HH : Hémochromatose Héritaire

LDH : Lactate deshydrogénase

MPA : Mobic Prioritization Algorithm

NGS : Next Generation Sequencing

PCT : Porphyrie Cutanée Tardive

PNDS : Plan National de Diagnostic et de Soins

SH : Sphérocytose héréditaire

TF : Transferrine

UPD : Uniparental Disomy

VAF : Variant Allele Frequency

VCF : Variant Call Format

VGM : Volume globulaire moyen

## INTRODUCTION

### I. La sphérocytose

#### 1) Introduction

La sphérocytose héréditaire (SH) est la cause la plus fréquente d'hémolyse chronique héréditaire en Europe du Nord, avec une prévalence des formes symptomatiques de 1/5000<sup>1</sup>. Cette pathologie érythrocytaire est causée par des anomalies moléculaires dans les gènes codant pour les protéines impliquées dans les interactions verticales entre le cytosquelette membranaire et la bicouche lipidique des globules rouges (Figure 1). Ces anomalies entraînent la déstabilisation de la membrane, sa microvésiculation et la condensation des globules rouges qui prennent la forme caractéristique de sphérocytes. Ces derniers présentent une déformabilité diminuée, sont séquestrés dans la rate puis détruits prématurément.

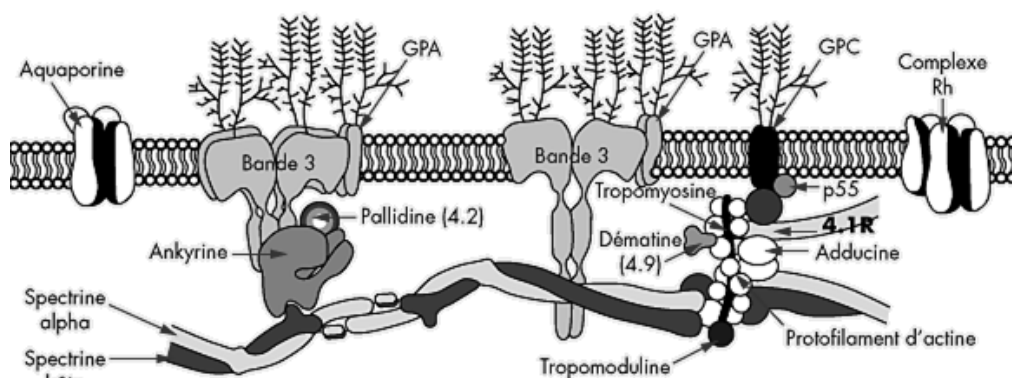


Figure 1 : Schéma de la membrane érythrocytaire et de son cytosquelette protéique<sup>2</sup>

#### 2) Diagnostic clinique

La SH peut se révéler à tout âge et avec un degré de gravité très variable, de l'*hydrops fetalis in utero*<sup>3</sup> au diagnostic dans la neuvième décennie de vie<sup>4</sup>. A la naissance, le diagnostic peut être suspecté devant un ictère néonatal précoce, sévère ou prolongé, qui est présent chez 60 à 90 % de ces nouveau-nés<sup>5</sup>. Le taux d'hémoglobine est généralement normal à la naissance<sup>6</sup> mais diminue rapidement dans les premières semaines de vie et nécessite un soutien transfusionnel dans 40% des cas. L'aggravation de l'hémolyse pendant la période néonatale a été attribuée à la présence d'hémoglobine foetale, qui déstabiliserait le cytosquelette membranaire à cause d'une faible affinité pour le 2,3-DPG<sup>7</sup>. Le diagnostic peut également être posé plus tardivement devant un tableau d'hémolyse intratissulaire chronique associant ictère, anémie régénérative et splénomégalie, ou devant différentes complications. Une primo-infection à parvovirus B19 peut par exemple être révélatrice de la pathologie en diminuant la capacité de la moelle osseuse à compenser l'hémolyse<sup>8</sup>. L'hémolyse chronique peut également provoquer la formation de lithiases vésiculaires, le plus souvent asymptomatiques, qui peuvent être mises en évidence de façon fortuite ou à la suite d'un épisode de cholécystite. Elles apparaissent souvent avant l'âge de 15 ans<sup>9</sup> et sont plus fréquentes chez les patients

porteurs d'un syndrome de Gilbert<sup>10</sup> (anomalie génétique de la glucuroconjugaison de la bilirubine), qui majore l'ictère. On retrouve une histoire familiale dans trois quarts des cas, et la sévérité est habituellement comparable au sein d'une même famille, en l'absence de facteurs surajoutés.

### 3) Diagnostic biologique

On observe classiquement sur la numération une anémie normocytaire normochrome régénérative d'intensité variable qui permet de classer la SH en 4 formes :

Forme	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (%)
Asymptomatique	Normale	Normaux
Minime	11-15	3-6
Modérée	8-11	>6
Sévère	6-8	>10

Tableau 1 : Classement des différentes formes de sphérocytoses héréditaires en fonction du taux d'hémoglobine et de réticulocytes<sup>11</sup>.

Du fait de la perte de surface membranaire des globules rouges, la CCMH est dans les valeurs supérieures de la normale ou supérieure à 36 %, et le frottis sanguin peut révéler la présence de sphérocytes, acanthocytes, hématies en « champignon » (*mushroom cells*) et parfois d'elliptocytes. La baisse de l'haptoglobine est constante et peut être associée ou non à une augmentation de la bilirubine libre et des LDH.

Devant une suspicion de sphérocytose, différents tests peuvent ensuite être réalisés. Les tests de résistances globulaires n'ont qu'une valeur d'orientation diagnostique, par manque de spécificité. Le test EMA est le test de confirmation recommandé en première intention, du fait de sa forte sensibilité (93%) et spécificité (90%)<sup>12</sup>. Il permet de mesurer par cytométrie en flux la liaison du 5'éosine-maléimide à la protéine bande 3 de la membrane érythrocytaire, et ainsi de mettre en évidence son déficit à la surface des globules rouges des patients sphérocytaires. Enfin, l'ektacytométrie est le gold standard, et peut être réalisé lorsqu'un diagnostic précis est nécessaire, notamment lorsque la splénectomie est discutée<sup>13</sup>. En effet, elle permet le diagnostic différentiel avec d'autres anomalies de la membrane érythrocytaire (elliptocytose, stomatocytose, ovalocytose). Le diagnostic étiologique peut être complété par l'étude des gènes impliqués en biologie moléculaire<sup>14</sup>.

### 4) Prise en charge et traitement

La prise en charge est détaillée dans le Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) de la Sphérocytose<sup>5</sup>. Le traitement est symptomatique. Il repose sur la prise en charge de l'ictère (photothérapie), une cholécystectomie (en cas de lithiase symptomatique), et de l'anémie. Les transfusions sont indiquées en cas d'anémie sévère et la splénectomie est réalisée dans les formes sévères, de préférence après l'âge de 5 ans. Elle permet une amélioration de l'anémie et des marqueurs hémolytiques. La supplémentation en acide folique est recommandée dans les formes modérées et sévères pour compenser son utilisation accrue secondaire à l'hémolyse chronique.

## II. Génétique de la sphérocytose

Les 5 principaux gènes impliqués dans la pathologie sont, par ordre de fréquence, les gènes de l'ankyrine (*ANK1*), la protéine Bande 3 (*SLC4A1*), la  $\beta$ -spectrine (*SPTB*), l' $\alpha$ -spectrine (*SPTA1*) et la protéine 4.2 (*EPB42*) (Figure 1). La plupart des anomalies sont privées, c'est-à-dire propres à chaque famille. Environ 70% des sphérocytoses sont héritées de manière autosomique dominante (anomalies des gènes *ANK1*, *SLC4A1* et *SPTB*). Dans 10% des cas, la transmission est autosomique récessive (anomalies homozygotes ou hétérozygotes composites des gènes *SPTA1* et *EPB42*), et dans 20% des cas, la sphérocytose est causée par l'apparition d'anomalies moléculaires *de novo* des gènes *ANK1*, *SPTB* ou *SLC4A1*<sup>15</sup>.

### 1) Formes liées au gène ANK1

Le gène *ANK1*, situé sur le bras court du chromosome 8 (8p11) est composé de 43 exons. Il code pour l'Ankyrine 1, une protéine de 1880 acides aminés répartis en 3 domaines<sup>16</sup> : un domaine de liaison à la membrane lipidique via la protéine bande 3 (exon 1-22) en NH<sub>2</sub>-terminal ; un domaine central de liaison à la spectrine (exon 26-34) et un domaine de régulation COOH-terminal. L'Ankyrine joue un rôle pivot dans la stabilisation de la membrane, en permettant à la  $\beta$ -spectrine de s'y lier, via la protéine bande 3 (Figure 1). Les déficits en ankyrine entraînent donc une diminution secondaire et proportionnelle en  $\beta$ -spectrine, malgré une synthèse normale<sup>17</sup>.

Les anomalies moléculaires de *ANK1* sont les anomalies les plus fréquemment retrouvées chez les patients sphérocytaires en Europe (50 à 60% des cas), mais sont moins fréquentes au Japon (5-10% des cas)<sup>18</sup>. Plus de 88 variants pathogènes ont été décrits<sup>19</sup> (Figure 2). Ce sont principalement des variants décalant le cadre de lecture (39%), non-sens (28%), faux-sens (15%), et des anomalies de l'épissage (14%). Elles sont situées dans toute la région codante du gène et entraînent pour la plupart une diminution voire une absence de synthèse de l'ARNm. Des variants pathogènes dans la région promotrice, des insertions sans décalage du cadre de lecture et de rares délétions du gène de l'ankyrine dues à des anomalies caryotypiques (délétions ou translocations) ont également été décrites<sup>20,21</sup>. Toutes ces anomalies moléculaires sont privées, à quelques exceptions près : le variant pathogène du promoteur c.-108T>C a été identifiée chez 5 patients non apparentés, le variant c.1519\_1520insC, qui entraîne un décalage du cadre de lecture a été retrouvée 3 fois, et le variant c.1717\_1718insC a été décrit deux fois. Ces anomalies moléculaires de *ANK1* sont apparues *de novo* chez 42% des patients, les autres ont été transmises selon un mode autosomique dominant dans 90% des cas et de façon récessive dans 10% des cas. Les anomalies du domaine de liaison à la membrane lipidique sont les plus fréquentes (47%), et les variants pathogènes qui décalent le cadre de lecture sont le plus souvent *de novo*.

La clinique de ces patients est modérée à sévère<sup>22</sup>, la gravité étant corrélée à l'importance du déficit protéique. Il a également été montré que la position des variants pathogènes de *ANK1* aurait un impact sur le taux d'hémoglobine, les patients présentant un taux significativement plus bas lorsque le variant pathogène est situé sur le domaine de liaison à la spectrine<sup>23</sup>. Les frottis de ces patients comportent des sphérocytes sans autre anomalie morphologique, et un taux élevé de réticulocytes peut masquer une diminution de l'ankyrine au niveau des tests biochimiques.

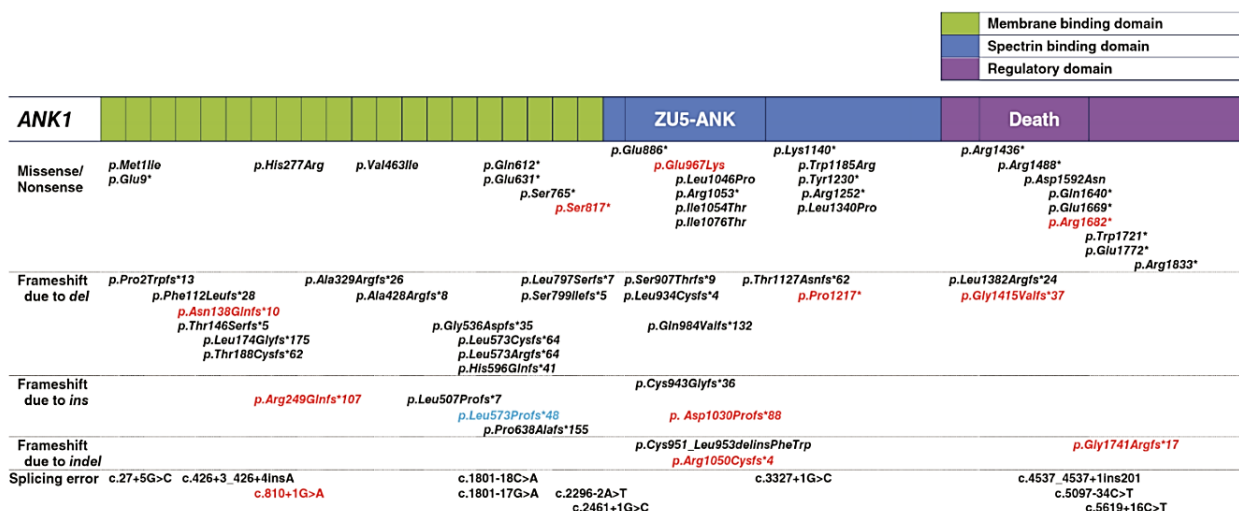


Figure 2 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *ANK1*<sup>23</sup>

## 2) Formes liées au gène *SLC4A1*

Le gène *SLC4A1*, situé sur le bras court du chromosome 17 (17q21), est composé de 20 exons et code pour la protéine Bande 3, longue de 911 acides aminés. Cette glycoprotéine transmembranaire est la principale protéine du cytosquelette du globule rouge, et représente 25% de la masse d'un globule rouge. Elle est composée de 2 domaines qui ont des fonctions biologiques propres. Le domaine cytoplasmique COOH-terminal (résidus 1 à 360) a un rôle structural primordial puisqu'il permet l'interaction entre la bicouche lipidique et le squelette membranaire via l'ankyrine, les protéines 4.1 et 4.2<sup>24</sup> (Figure 1). Il est également impliqué dans le métabolisme érythrocytaire en interagissant avec de nombreuses enzymes glycolytiques telle que la glucose-6-phospho-déshydrogénase (*G6PD*) et l'aldolase. Le domaine NH2-terminal (résidus 361-911), composé de 14 domaines transmembranaires, est impliqué dans l'échange des anions chlorures et bicarbonates à travers la membrane. C'est un phénomène clé qui contribue à augmenter la capacité sanguine de transport du CO<sub>2</sub>, sous la forme de bicarbonate soluble. La protéine joue également un rôle de signal de reconnaissance grâce aux motifs antigéniques qu'elle expose à la surface érythrocytaire.

Ce gène est muté dans 20 à 30% des sphérocytoses en Europe. De nombreux variants pathogènes ont été décrits (Figure 3), avec une transmission autosomique dominante. Les variants non-sens et décalant le cadre de lecture sont les plus fréquents, ils provoquent une diminution de la stabilité de l'ARNm à l'origine d'une diminution de synthèse de la protéine bande 3<sup>25</sup>. Les variants faux sens sont répartis tout le long du gène. Les

variants du domaine cytosolique conduisent à des anomalies de l'interaction de la protéine avec les composants protéiques du cytosquelette<sup>26</sup>, alors que les variants des domaines membranaires altèrent le repliement de la protéine qui est retenue dans le réticulum endothélial et n'est pas adressée à la membrane<sup>27,28</sup>. A noter que quel que soit le gène responsable de la sphérocytose héréditaire, on observe une réduction de 20 à 30 % de la quantité de protéine bande 3 membranaire, car l'instabilité membranaire conduit à la perte de vésicules membranaires. Les protéines bande 3 mutantes peuvent également former des hétérodimères avec la protéine sauvage et la retenir dans le RE, exagérant la perte de bande 3 à la surface de la cellule<sup>24,27</sup>.

Les signes cliniques associés à ces anomalies sont de le plus souvent de sévérité légère à modérée<sup>22</sup>, néanmoins, il existe des allèles asymptomatiques à l'état hétérozygote (Genas<sup>29</sup> et Mondego<sup>30</sup>), qui affectent l'expression de la protéine et aggravent la clinique lorsqu'ils sont situés en *trans* par rapport à un variant pathogène. Des maladies sévères ont également été décrites chez des patients homozygotes ou hétérozygotes composites. Les patients sphérocytaires porteurs d'un déficit en protéine bande 3 répondraient moins bien à la splénectomie que les patients porteurs d'un déficit en spectrine ou ankyrine<sup>31</sup>. Certains patients avec des anomalies moléculaires dans la région du gène codant pour la partie NH2 terminale de la protéine, impliquée dans les échanges ioniques à travers la membrane, ont un déficit en protéine bande 3 mais présentent des caractéristiques de cryohydrocytose ou de stomatocytose héréditaire<sup>32,33</sup>. Les variants pathogènes de ce gène peuvent également provoquer une acidose tubulaire rénale distale avec ou sans sphérocytose héréditaire<sup>34</sup>. Ces différentes maladies sont donc des manifestations phénotypiques différentes de variants génétiques distincts affectant le même gène<sup>35</sup>. On peut de plus observer sur le frottis des patients porteurs de variants de ce gène des hématies en forme de champignons.

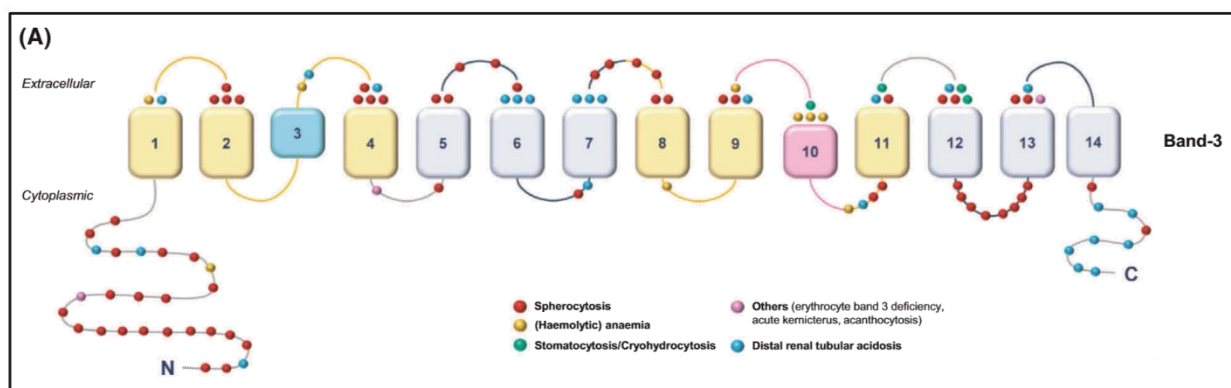


Figure 3 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène SLC4A1 et le phénotype associé<sup>35</sup>

### 3) Formes liées au gène *SPTB*

Le gène *SPTB*, situé sur le bras long du chromosome 14 (14q23) est composé de 36 exons. Il code pour la chaîne  $\beta$  de la spectrine, une protéine longue de 2328 acides aminés, composée de domaines répétés appelés « répétition de spectrine ». De N à C-terminal, elle comprend 2 domaines responsables de la liaison à l'actine, 2 domaines permettant la formation des dimères  $\alpha/\beta$ , 2 domaines de liaison à l'ankyrine et un domaine terminal qui constitue le domaine de tétramérisation<sup>23</sup> (Figure 1).

Le gène *SPTB* est muté dans 15-25% des sphérocytoses en Europe. La plupart des variants pathogènes du gène  $\beta$ -spectrine sont des variants « nuls » (Figure 4). On retrouve principalement des variants décalant le cadre de lecture, non-sens et d'épissage, qui engendrent un ARNm anormal ou une protéine tronquée non fonctionnelle, mais des variants faux sens ont également été retrouvés. La chaîne  $\beta$  spectrine étant synthétisée en quantité limitante par rapport à l' $\alpha$ -spectrine<sup>36</sup>, la transmission est principalement autosomique dominante<sup>37</sup>. Dans certains cas, le profil de transmission au sein d'une famille semble récessif, cependant, la plupart de ces formes seraient finalement dues à des anomalies moléculaires de novo<sup>38</sup>. De très rares anomalies bi-alléliques ont cependant été décrites, elles sont associées à des formes très sévères de découverte néonatale<sup>39</sup>. Les variants pathogènes touchent les domaines de liaison à l'actine, de dimérisation et de liaison à l'ankyrine, sans zones hotspot de mutation, mais elles épargnent le domaine de tétramérisation, qui est retrouvé muté dans l'elliptocytose et la pyropoïkilocytose héréditaire<sup>40,23</sup> (anomalies moléculaires bi-alléliques<sup>41</sup>).

Les patients présentent typiquement une symptomatologie modérée, sans besoin transfusionnel<sup>42</sup>, cependant, la clinique est dépendante de la région de mutation, avec une sévérité augmentée lorsque la région de liaison de la spectrine avec l'ankyrine est mutée<sup>43</sup>. Les frottis sanguins des patients peuvent montrer des acanthocytes ou des sphérocytes spiculés.

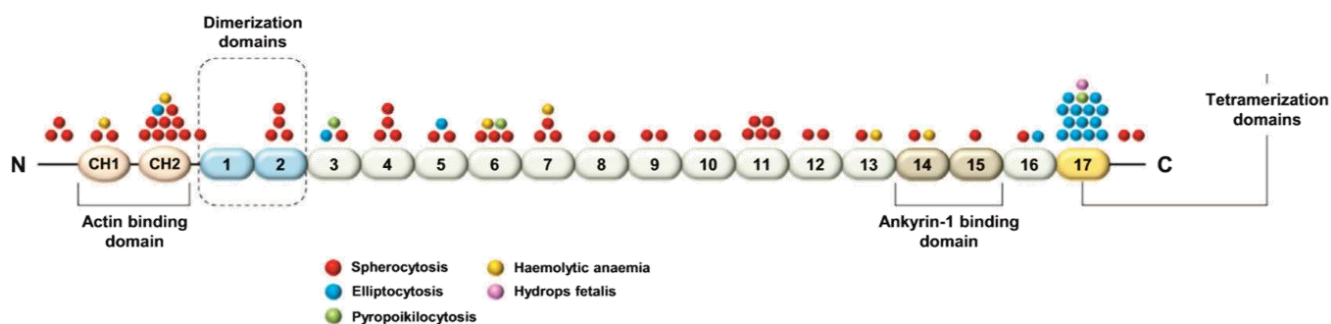


Figure 4 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *SPTB* et le phénotype associé<sup>35</sup>



#### 4) Formes liées au gène *SPTA1*

Le gène *SPTA1*, situé sur le bras long du chromosome 1 (1q23) est composé de 52 exons. Il code pour la chaîne  $\alpha$  de la spectrine, longue de 2419 acides aminés. La structure de la spectrine  $\alpha$  est similaire à celle de la spectrine  $\beta$ , avec des domaines répétés qui forment en C-terminal un domaine de dimérisation et en N terminal un domaine de tétramérisation (Figure 1).

Ce gène est muté dans environ 5% des sphérocytoses en Europe<sup>15</sup>. La sphérocytose héréditaire par déficit en spectrine  $\alpha$  n'apparaît que lorsque les deux allèles présentent une anomalie moléculaire qui affecte significativement la quantité de protéine produite, puisque la production physiologique des chaînes  $\alpha$  se fait en excès<sup>36</sup> (3 à 4 fois la quantité de spectrine  $\beta$ ). La transmission est donc autosomique récessive, et les individus symptomatiques sont le plus souvent hétérozygotes composites. Les variants pathogènes impliqués sont principalement « nuls », d'épissage ou non-sens, mais des variants faux sens ont également été décrits. De la même manière que pour *SPTB*, les variants pathogènes sont retrouvés tout le long du gène, mais ceux proches du domaine de tétramérisation sont plus fréquemment à l'origine d'une elliptocytose<sup>35</sup> (Figure 5). Les patients peuvent également présenter un variant pathogène associé à un allèle de faible expression, l'allèle  $\alpha$ -LEPRA (low-expression allele Prague). Cet allèle, présent dans 0,5% de la population, est un variant intronique profond de *SPTA1* (NM\_003126.4:c.4339-99C>T) qui est 6 fois moins exprimé que l'allèle sauvage<sup>44</sup>. Il active un site accepteur d'épissage alternatif, conduit à un décalage du cadre de lecture et une terminaison précoce de la traduction, induisant une production résiduelle de 16% de la spectrine  $\alpha$ <sup>45,46</sup>. A l'état hétérozygote, il est asymptomatique, mais lorsqu'il est présent en trans d'un allèle muté, il entraîne une sphérocytose<sup>44</sup>.

L'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  (low expression, Lyon), présent chez environ 25% de la population<sup>47</sup>, est également un variant d'expression faible. Il est composé d'une combinaison de 3 variants (c.5572C>G, c.6531-12C>T, c.6549-12G>A). Le variant NM\_003126.4:c.6531-12C>T, situé dans l'intron 45, est à l'origine d'un saut partiel de l'exon 46 dans la moitié des transcrits et induit donc une diminution de 50% de la quantité de spectrine  $\alpha$  produite<sup>48</sup>. L'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  en trans d'un variant *SPTA1* responsable d'elliptocytose aggrave le phénotype en augmentant la quantité de spectrine  $\alpha$  anormale présente dans le cytosquelette<sup>49,50</sup>. Cependant, et à la différence de l'allèle  $\alpha$ -LEPRA, l'impact de l'association en trans de l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  avec un variant nul de *SPTA1* est controversé.

Les anomalies moléculaires homozygotes ou hétérozygotes composites de *SPTA1* sont associées à une sphérocytose de forme sévère, dépendant de la quantité résiduelle de spectrine  $\alpha$ . Il a été démontré qu'un déficit complet en  $\alpha$ -spectrine provoque une anémie létale *in utero*<sup>3</sup>. Plus récemment, deux patients porteurs de variants pathogènes homozygotes de *SPTA1* entraînant des déficits en spectrine  $\alpha$  quasi-complets et complets ont pu survivre à un *hydrops fetalis*, l'un par transfusion *in utero* et l'autre grâce à des transfusions précoces après un accouchement prématuré. Ces patients sont cependant restés transfusion-dépendants après splénectomie<sup>46</sup>.

Les frottis des patients avec déficit en spectrine  $\alpha$  comportent de nombreux microsphérocytes, et dans les cas les plus sévères, des sphérocytes déformés, des globules rouges spiculés et des poïkilocytes.

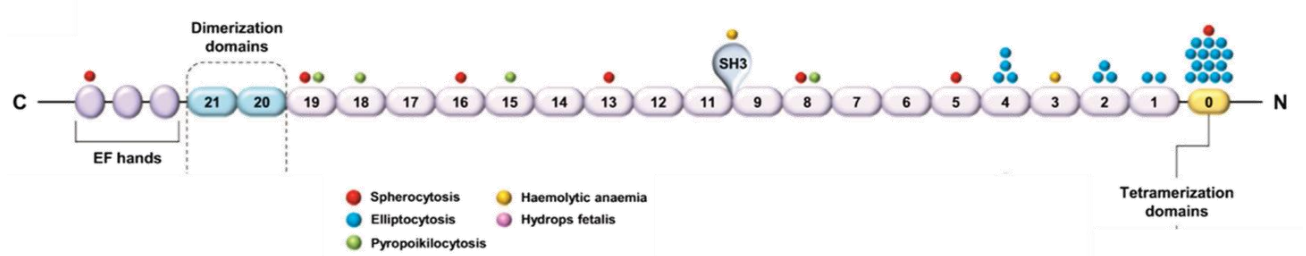


Figure 5 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *SPTA1* et le phénotype associé<sup>35</sup>

### 5) Formes liées au gène *EPB42*

Le gène *EPB42*, situé sur le bras long du chromosome 15 (15q15), est composé de 13 exons et code pour la protéine 4.2, longue de 721 acides aminés. Elle fait partie du complexe Ankyrine et permet de relier la protéine bande 3 avec la protéine CD47. Elle interagit également avec les tétramères de spectrine et permet de relier le cytosquelette à la bicouche phospholipidique.

Ce gène est muté dans environ 5% des sphérocytoses en Europe<sup>15</sup>, mais chez 40 à 50% des patients au Japon<sup>18</sup>. La transmission est autosomique récessive. Au moins 13 anomalies moléculaires ont été décrites, incluant des variants faux-sens, non-sens, décalage du cadre de lecture, d'épissage et de petites délétions, plus de la moitié ayant été retrouvées dans la population Japonaise. La plupart entraînent une terminaison précoce de la traduction et la formation de protéines tronquées qui ne sont pas détectées à la membrane car probablement dégradées rapidement après leur synthèse<sup>51</sup>. Malgré la perte complète de la protéine à la membrane, le développement d'anticorps dirigé contre cette protéine après transfusion n'a été rapporté que chez un seul patient, homozygote pour une variant nul (c.950delG)<sup>52</sup>.

Certains variants faux sens altèrent la liaison de la protéine 4.2 avec la protéine Bande 3<sup>53</sup>, d'autres conduisent à sa protéolyse avant intégration à la membrane, c'est le cas de la mutation Nippon (NM\_000119.3 :c.424G>A (p.Ala142Thr)), présente à l'état hétérozygote chez 3% de la population Japonaise et entraînant une sphérocytose à l'état homozygote et hétérozygote composite<sup>54</sup>.

La clinique des patients porteurs de ces anomalies est légère à modérée, mais peut être plus sévère dans les quatre premiers mois de vie, nécessitant de multiples transfusions, sans corrélation avec le degré de gravité à l'âge adulte. Au niveau biologique, on note donc une absence des protéines 4.2 et CD47 mais pas de diminution de la protéine bande 3. Il est important de noter qu'on peut observer sur les frottis de certains patients des ovalocytes et stomatocytes, rendant primordial le diagnostic différentiel avec une stomatocytose avant splénectomie, devant le risque thrombotique chez les patients stomatocytaires splénectomisés.

### III. Surcharge en fer

#### 1) Introduction

Lorsqu'il est présent en excès, le fer s'accumule dans les cellules parenchymateuses, principalement les hépatocytes, les cardiomyocytes et les cellules pancréatiques, entraînant la production de radicaux libres et l'apparition de lésions tissulaires à l'origine des manifestations cliniques de la maladie<sup>55</sup>.

Au niveau biologique, le diagnostic peut être suspecté chez un patient, symptomatique ou non, présentant un taux de ferritine plasmatique > 300 ng/mL pour un homme et > 200 ng/mL pour une femme et un CST supérieur à 45%. Les enzymes hépatiques peuvent également être légèrement élevées<sup>56</sup>.

La ferritine est la protéine de stockage cellulaire du fer. En condition physiologique, son taux plasmatique reflète les réserves totales de fer, et une hyperferritinémie suggère une surcharge en fer dans l'organisme. Il existe cependant des situations au cours desquelles la ferritinémie ne reflète plus l'état des réserves. C'est le cas au cours de l'inflammation, pendant laquelle sa synthèse augmente ou lors d'une cytolyse, où la ferritine intracellulaire est relarguée en excès. D'autres causes peuvent être citées : les hyperthyroïdies, le syndrome paranéoplasique, et, de façon plus rare, la maladie de Gaucher, la maladie de Still, le syndrome d'activation macrophagique, le syndrome hyperferritinémie-cataracte et l'hyperferritinémie bénigne par mutation *FTL*<sup>57,58</sup>. Dans ces conditions, en l'absence de surcharge, le CST n'est pas augmenté. La découverte d'une hyperferritinémie sans augmentation du CST n'est donc pas un critère de recherche génétique d'hémochromatose en première intention.

## 2) Surcharges non héréditaires

Avant de suspecter une cause génétique à une surcharge en fer, il est nécessaire de vérifier l'absence des causes suivantes :

### a) Iatrogène

Les transfusions répétées peuvent aboutir à une véritable surcharge en fer<sup>59</sup>, un concentré érythrocytaire apportant 200 à 250 mg de fer, de la même façon qu'une supplémentation intraveineuse inappropriée en fer.

### b) Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, qui fait référence à l'association de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires connus (résistance à l'insuline, obésité, dyslipidémie athérogène et l'hypertension)<sup>60</sup>, serait la cause la plus fréquente d'hyperferritinémie dans la population générale<sup>57</sup>. Elle est prédictive de l'apparition d'un syndrome métabolique et peut donc être retrouvée avant l'apparition de ce dernier<sup>61</sup>. Chez ces patients, la ferritine est souvent inférieure à 600 ng/mL, le coefficient de saturation de la transferrine est normal ou très légèrement augmenté et la surcharge en fer est habituellement modérée (CHF < 100 µmol/g).

### c) Alcool

La consommation excessive d'alcool peut être responsable d'une hyperferritinémie par augmentation de sa synthèse<sup>62</sup>, lyse hépatocytaire et inhibition de l'hepcidine et être ainsi responsable d'une surcharge en fer secondaire modérée<sup>63</sup>.

### d) Maladie chronique du foie et cirrhose

La plupart des maladies chroniques du foie entraînent une hyperferritinémie secondaire à l'inflammation et la lyse, ainsi qu'à l'insuffisance hépatocellulaire qui diminue la synthèse d'hepcidine et de transferrine.

### e) Maladies hématologiques

Une surcharge en fer peut se constituer dans toutes les situations chroniques d'érythropoïèse augmentée (érythropoïèse inefficace, hémolyse chronique : thalassémies, hémoglobinopathies, anémies sidéroblastiques, anémie dysérythropoïétique congénitale). En effet, la synthèse d'hepcidine est inhibée à la fois par l'hypoxie induite par l'anémie<sup>64</sup>, mais également par l'augmentation de la synthèse d'érythroferrone par les érythroblastes, majorant l'absorption du fer, nécessaire à l'érythropoïèse. Ce mécanisme explique également que la supplémentation orale en fer sur une longue période sans surveillance biologique chez des patients porteurs d'anémies hémolytiques chroniques peut aboutir au développement d'une surcharge en fer<sup>65</sup>.

### 3) Surcharges héréditaires

#### a) Hémochromatose héréditaire

L'hémochromatose héréditaire (HH) est la maladie génétique la plus fréquente chez les individus Nord-Européens. C'est une maladie hétérogène due à une perturbation de l'homéostasie du fer. On observe chez les patients atteints une absorption intestinale excessive de fer qui s'accumule dans les cellules parenchymateuses. Il n'existe pas de symptôme pathognomonique, de nombreux organes pouvant être touchés. Les symptômes initiaux peuvent être une fatigue chronique marquée ou des douleurs articulaires et abdominales. L'hépatomégalie est souvent le premier signe observable. Non traitée, l'accumulation progressive de fer peut entraîner une hyperpigmentation cutanée, une cardiomyopathie, une hépatopathie allant jusqu'au carcinome hépatocellulaire, et une atteinte des glandes endocrines avec diminution de production des hormones correspondantes (diabète, ...). En raison d'un diagnostic plus précoce, ces symptômes sont de plus en plus rarement observés<sup>66</sup>.

Dans la grande majorité des cas, l'hémochromatose héréditaire est causée par des anomalies moléculaires du gène *HFE*<sup>67</sup>, mais elle peut également être causée par des anomalies d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer : *HJV* ((anciennement *HFE2*), codant pour l'hémojuvéline), *HAMP* (codant pour l'hepcidine), *TFR2* (codant pour le récepteur 2 de la transferrine) et *SLC40A1* (codant pour la ferroportine). La découverte progressive de ces gènes avait abouti à une classification basée sur les sous-types moléculaires, peu adaptée à la pratique clinique. Récemment, la société internationale de l'étude du fer en biologie et médecine (BIOIRON Society) a proposé la classification suivante, qui permet de mieux rendre compte de la complexité génétique connue à ce jour<sup>68</sup> :

Formes	
Liées au gène <i>HFE</i> (ancien type 1)	* Homozygotie pour le variant pathogène p.Cys282Tyr * Hétérozygotie composite p.Cys282Tyr associée à un autre variant pathogène <i>HFE</i> ou une délétion <i>HFE</i>
Non liée au gène <i>HFE</i>	Formes liées aux gènes : <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>HJV</i> (ancien type 2A)</li><li>• <i>HAMP</i> (ancien type 2B)</li><li>• <i>TFR2</i> (ancien type 3)</li><li>• <i>SLC40A1</i> (mutations gains de fonction, ancien type 4B)</li></ul>
Digénique	Double hétérozygotie pour des variants pathogènes dans 2 gènes différents ( <i>HFE</i> et/ou non <i>HFE</i> )
Moléculairement indéfinies	Pas d'anomalies retrouvées sur les gènes précédents

Tableau 2 : Classification des Hémochromatoses héréditaires selon la Société internationale de l'étude du fer en biologie et médecine (BIOIRON Society)

Dans les hémochromatoses héréditaires, quel que soit le gène muté, l'anomalie de la régulation du métabolisme du fer est en lien avec une anomalie de l'hepcidine, une hormone peptidique qui régule l'entrée du fer dans le plasma (Figure 6). Elle est sécrétée principalement par le foie, lorsque les besoins en fer de l'organisme diminuent, puis se lie à la ferroportine, une protéine d'exportation du fer. Cette liaison provoque

l'internalisation et la dégradation de la ferroportine, entraînant une diminution de l'absorption intestinale de fer et de la libération plasmatisque de fer à partir des macrophages spléniques. Chez les patients porteurs d'hémochromatose liée aux gènes *HFE*, *HJV*, *HAMP* et *TFR2*, on retrouve une production inappropriée d'hepcidine<sup>69</sup>, qui n'augmente pas ou pas suffisamment lorsque le fer s'accumule. Les patients ne peuvent donc pas réguler leurs entrées de fer, qui continue à s'accumuler. Il a été démontré que le degré de sévérité et l'âge de début des symptômes est corrélé au degré de déficit en hepcidine<sup>70</sup>. Dans le cas de l'HH par anomalie de *HFE* ou *TFR2*, le déficit en hepcidine est relativement faible et la charge en fer est progressive, le diagnostic est ainsi habituellement posé vers l'âge de 30 à 50 ans, souvent plus tard chez les femmes. A l'inverse, chez les patients porteurs de variants pathogènes de *HJV* ou *HAMP*, la production d'hepcidine est négligeable et la charge en fer est rapide et sévère, conduisant à des formes d'hémochromatose juvénile. Enfin, les patients porteurs d'HH liée au gène *SLC40A1*, ne présentent pas de déficit en hepcidine mais une résistance à son action.

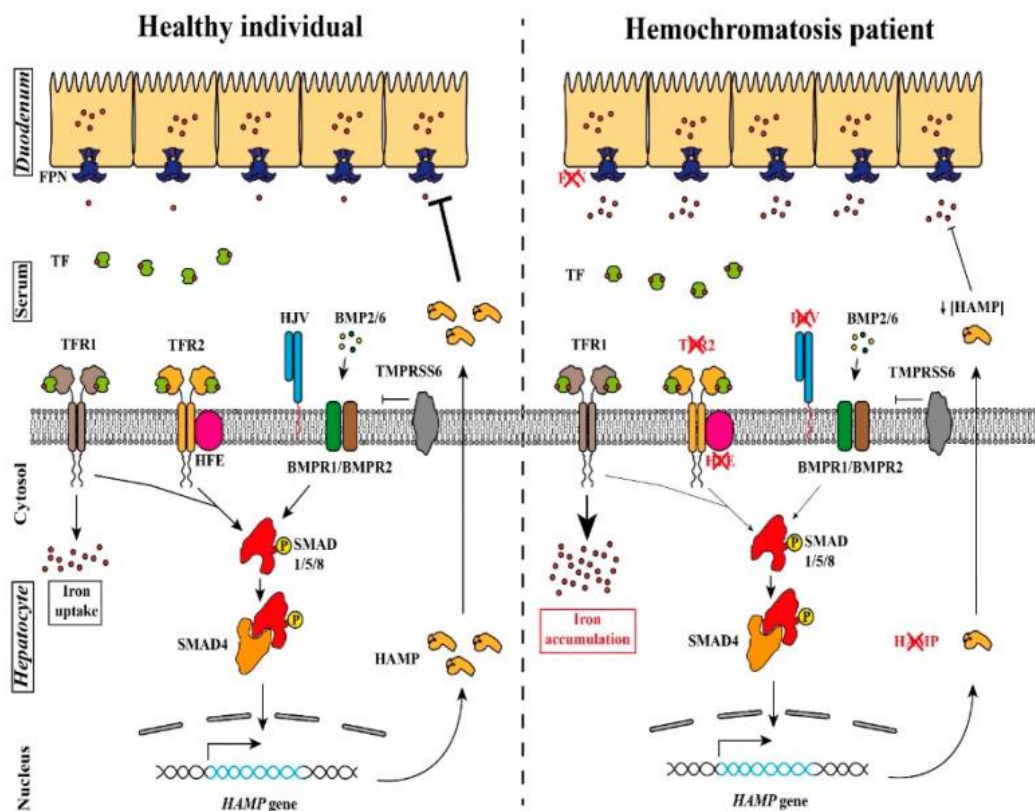


Figure 6 : Représentation des différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du fer et leur implication au cours de l'hémochromatose<sup>71</sup>

La phlébotomie est le principal traitement de cette maladie. Elle permet d'éliminer le fer présent dans les globules rouges en réalisant des saignées itératives. Elle peut aider à améliorer la fonction cardiaque, à réduire la pigmentation anormale de la peau et le risque de complications hépatiques. Elle est à démarrer chez tout patient pour lequel la ferritinémie est supérieure au seuil décrit pour le sexe et chez lequel le coefficient de saturation en transferrine (CST) est supérieur à 45%. Le traitement par chélation du fer n'est indiqué que dans les cas exceptionnels de contre-indication ou de non-faisabilité de la soustraction veineuse<sup>72</sup>.

i. Formes liées au gène *HFE*

Le gène *HFE*, situé sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3), code pour la protéine *HFE*, une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité non classique, exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules sous forme d'hétérodimère lié à la  $\beta$ 2-microglobuline<sup>67</sup>. Au niveau hépatique, elle régule la production d'hepcidine, selon un mécanisme complexe qui n'est pas encore complètement élucidé. Elle se lie au récepteur de la Transferrine (TfR1), en compétition avec le complexe transferrine-fer. Lorsqu'elle se dissocie de TfR1, elle se lie à TfR2, et interagirait avec un complexe comprenant BMP6 et HJV, qui, suite à une cascade intracellulaire, induit la transcription de l'hepcidine<sup>73</sup> (Figure 6).

L'hémochromatose *HFE* est une surcharge en fer de transmission autosomique récessive, de pénétrance incomplète et d'expressivité variable. Les patients symptomatiques ne développent des symptômes que vers l'âge de 30 à 50 ans et l'expression phénotypique est moins grave que celle causée par des variants pathogènes de *HAMP*, car les taux d'hepcidine, bien qu'ils soient inadaptés à l'état en fer, restent détectables.

L'anomalie moléculaire responsable d'hémochromatose la plus répandue dans la population est le variant faux sens C282Y (c.845G>A p.Cys282Tyr, rs1800562) du gène *HFE*, à l'état homozygote. Il est présent chez 0,4% des Caucasiens et est responsable de 90% des hémochromatoses. Ce changement d'acide aminé perturbe la formation d'un des ponts disulfures de la protéine et altère sa capacité à se lier à la  $\beta$ 2-microglobuline, provoquant son agrégation intracellulaire et la rendant incapable d'atteindre la surface cellulaire<sup>74</sup>. La pénétrance biochimique chez ces patients est plus élevée que la pénétrance clinique, estimée en moyenne à 15%<sup>75,76</sup> et elle diffère selon le sexe. En effet, parmi les individus homozygotes C282Y, 80% des hommes et 55% des femmes ont une ferritinémie augmentée, mais seule une minorité accumule suffisamment de fer pour causer des atteintes aux organes. Ainsi, seuls 28% des hommes et 1% des femmes présentent une surcharge réelle en fer<sup>77</sup>. Bien que plusieurs facteurs environnementaux (alcool, diabète, ...) permettent d'expliquer ces variations phénotypiques<sup>78</sup>, des modulateurs génétiques ont également été décrits. Nous les détaillerons dans la partie III- 3) c).

A l'état hétérozygote, le variant C282Y est très répandu, puisqu'il est présent chez 9% de la population en moyenne, mais de façon très variable selon les ethnies<sup>79</sup>. Sa fréquence élevée pourrait être expliquée par l'avantage qu'il a conféré aux porteurs au moment où le régime carnivore, riche en fer, a été remplacé par un régime céréalier pauvre en fer<sup>80</sup>, notamment chez les femmes, pour qui les multiples grossesses entraînaient des pertes en fer importantes. Certaines études ont également montré que ce génotype pourrait augmenter la capacité à résister à certaines infections<sup>73</sup>. Les hétérozygotes C282Y sont asymptomatiques dans la très grande majorité des cas. Cependant, certains développent une surcharge significative en fer, mais il a été montré dans une étude que 33% de ces patients avaient également un autre variant pathogène rare du gène *HFE*<sup>81</sup>. En effet, au moins 20 variants pathogènes *HFE* privés ont été

décrits en association à au variant C282Y<sup>82</sup> (Figure 7), et les patients hétérozygotes composites C282Y/mutations non-sens *HFE*-Brianza ou *HFE*-Ossola seraient même plus nombreux en Italie que les hétérozygotes composites C282Y/H63D<sup>83</sup>. Certains patients présentent également une délétion totale du gène *HFE*<sup>84</sup>, qui serait même la première cause d'hémochromatose *HFE* dans certaines populations<sup>85</sup>. De plus, chez les patients hétérozygotes pour un variant *HFE*, des manifestations peuvent survenir en présence d'anomalies hétérozygotes d'autres gènes, notamment *HAMP*<sup>86</sup>, *HJV*<sup>87</sup>, *TFR2*<sup>88</sup> ou *BMP6*<sup>89</sup>, ce qui suggère que les anomalies de différents gènes impliqués dans le contrôle de la transcription de l'hepcidine ont des effets cumulatifs<sup>78</sup>, pouvant expliquer une partie de la variabilité phénotypique entre les patients, pour lesquels les autres gènes n'ont pas toujours été testés.

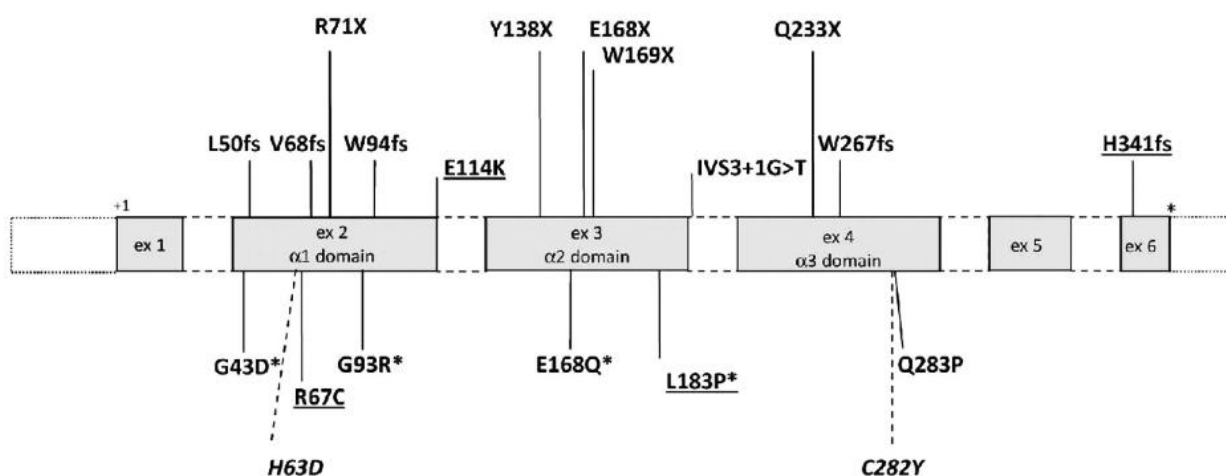


Figure 7 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *HFE*<sup>82</sup>

Le deuxième variant *HFE* le plus fréquent est la substitution H63D (c.187C>G, rs1799945). A l'état isolé, il est présent chez 11% de la population en moyenne, parfois plus fréquemment dans certaines populations, et n'est pas associé à une surcharge en fer<sup>90</sup>. Lorsqu'il est présent *en trans* du variant pathogène C282Y, une augmentation modérée du coefficient de saturation de la transferrine peut être observé, mais une véritable surcharge en fer n'est retrouvée que chez seulement 1 à 2 % des porteurs<sup>91</sup>, souvent lorsqu'une autre comorbidité est présente.

Le variant S65C (NM\_000410.4:c.193A>T), présent chez 1% de la population générale, a également été décrit comme pouvant engendrer des surcharges en fer modérées lorsqu'il est associé au variant C282Y<sup>92</sup>. Il serait de plus présent chez 8% des patients ni C282Y ni H63D. Cependant, l'impact clinique de ce variant controversé reste très faible, sa recherche n'est pas recommandée à visée diagnostique.

En conclusion, il est aujourd'hui admis que lorsqu'un patient non C282Y homozygote présente une surcharge en fer, celui-ci est probablement porteur d'une cause de surcharge en fer non génétique, d'autres anomalies moléculaires *HFE*, ou d'un autre variant d'un gène impliqué dans l'homéostasie du fer.



ii. Formes liées au gène *HJV*

Le gène *HJV*, localisé sur le bras long du chromosome 1 (1q21), code pour la protéine *HJV* (hémoujuvéline), exprimée sur la membrane de l'hépatocyte, où elle joue le rôle de corécepteur des BMP (bone morphogenetic proteins). Elle contribue à la signalisation intracellulaire BMP/SMAD à l'origine de la régulation de l'expression d'hepcidine<sup>93</sup> (Figure 6).

Des anomalies moléculaires homozygotes ou hétérozygotes composites de ce gène sont à l'origine d'hémochromatoses juvéniles sévères, de transmission autosomique récessive, survenant le plus souvent avant 30 ans et fréquemment révélées par un hypopituitarisme ou une insuffisance cardiaque. A la différence des anomalies *HFE*, elles touchent autant les hommes que les femmes.

Parmi les différentes formes d'hémochromatose juvénile, les variants pathogènes du gène *HJV* sont les plus fréquents (90% des cas), mais ces anomalies sont rares. En effet, à ce jour, 98 patients appartenant à 87 familles différentes ont été décrits dans la littérature dans le monde entier, avec plus de 70 variants pathogènes identifiés (Figure 8). Ils sont répartis de façon homogène le long de la protéine<sup>71</sup>, et leur pénétrance est complète. Il semble que les variants pathogènes des exons 2 et 3 soient associés à un début plus précoce de la surcharge en fer, par rapport à ceux de l'exon 4<sup>94</sup>. Les anomalies moléculaires sont privées dans 2/3 des cas, cependant, quelques-unes sont retrouvées de manière plus fréquente : c'est le cas du variant pathogène G320V, le plus fréquent en Europe. Les anomalies retrouvées conduiraient pour la plupart à une perte de l'expression membranaire de la protéine<sup>94</sup>, entraînant une expression anormalement basse de l'hepcidine et une régulation altérée du métabolisme du fer. Des cas d'hémochromatose liée à *HJV* dues à des pertes d'hétérozygotie (délétion génique, disomie uniparentale) ont également été décrits.

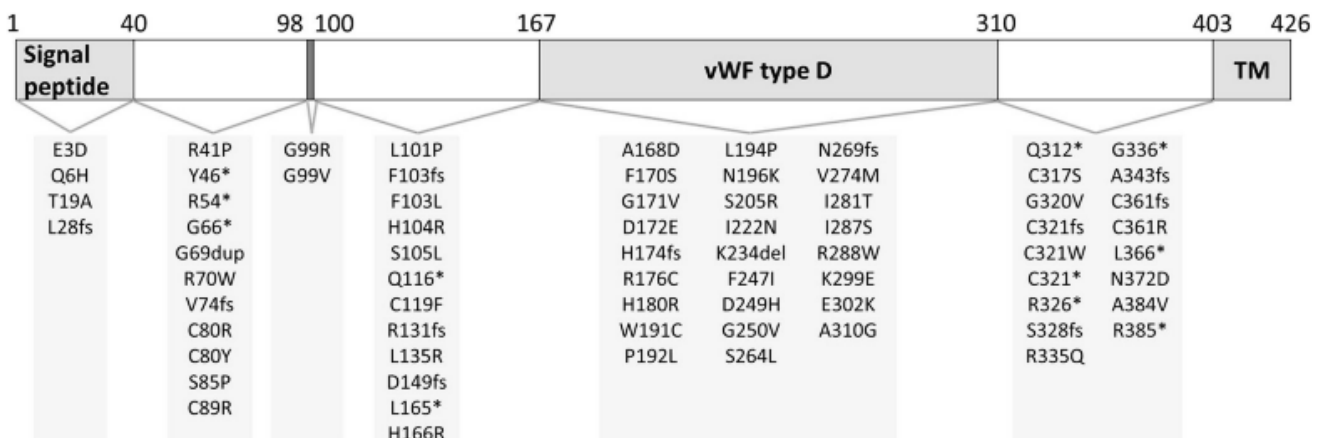


Figure 8 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *HJV*<sup>94</sup>

### iii. Formes liées au gène *TFR2*

Le gène *TFR2*, localisé sur le chromosome 7 (7q22), code pour la protéine TFR2, une glycoprotéine transmembranaire homologue au récepteur classique de la transferrine TFR1. Contrairement à la protéine TFR1, TFR2 a une expression plus restreinte et n'est pas capable d'importer le fer à l'intérieur de la cellule. Elle semble fonctionner comme un capteur de fer circulant, en se liant à la transferrine diférique, mais avec une affinité inférieure à celle de TFR1. Il est fortement exprimé dans les hépatocytes, où il participe à la régulation de l'expression de l'hepcidine (Figure 6). Les patients porteurs de variants pathogènes de *TFR2* ont donc une production d'hepcidine diminuée. L'hémochromatose héréditaire par anomalie moléculaire du gène *TFR2* est une maladie rare héritée selon un mode autosomique récessif. 66 individus ont été décrits dans le monde (45 familles), principalement en Italie, au Japon et au Portugal (Figure 9). Elle serait la première cause d'HH au Japon<sup>97</sup>. Contrairement aux anomalies *HFE*, elle semble affecter les deux sexes de manière équivalente, son apparition est légèrement plus précoce (vers 30 ans), et la clinique est un peu plus sévère, bien que le nombre de cas décrit soit limité. Des cas de débuts précoces, chez 5 enfants de 3 à 13 ans, ont également été décrits<sup>98</sup>, mais la progression serait plus lente que chez les individus atteints d'HH juvénile. Les patients porteurs d'anomalies hétérozygotes sont asymptomatiques, et n'ont pas de modification de leurs paramètres ferriques<sup>99</sup>. Les variants pathogènes sont privés et répartis tout le long de la protéine, sans zone hotspot de mutation.

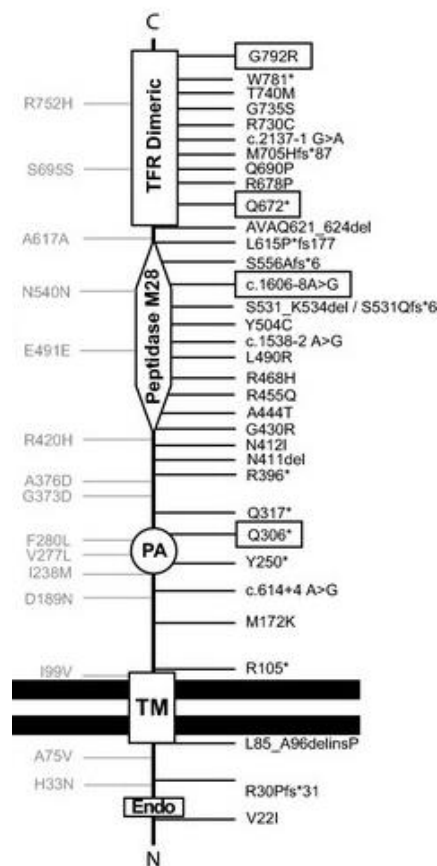


Figure 9 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *TFR2*<sup>100</sup>

#### iv. Formes liées au gène *SLC40A1*

Le gène *SLC40A1* (Solute Carrier Family 40 Member 1 protein), localisé sur le bras long du chromosome 2 (2q32), code pour la ferroportine (FPN), la protéine membranaire de transport du fer principalement exprimée sur les macrophages, les hépatocytes et à la membrane basolatérale des entérocytes. C'est la seule protéine connue capable d'exporter le fer de la cellule. Elle est impliquée dans l'absorption intestinale de fer et dans le recyclage du fer érythrocytaire par les macrophages (Figure 6). C'est la cible moléculaire de l'hepcidine, qui induit son internalisation et sa dégradation, à l'origine d'une réduction de la concentration plasmatique de fer et d'une augmentation de la ferritine intracellulaire<sup>101</sup>.

Des variants pathogènes « gain de fonction » de ce gène sont à l'origine de formes d'hémochromatose cliniquement et biologiquement similaires aux formes liées à *HFE*, avec pour seule différence un taux d'hepcidine élevé. En effet, ces anomalies n'affectent ni l'expression ni la fonction de la protéine, mais perturbent l'interaction entre l'hepcidine et la ferroportine. La ferroportine devient ainsi résistante à l'action de l'hepcidine qui n'est plus capable de la dégrader et de réguler l'absorption du fer. Le premier variant pathogène (p.C326Y) a été décrit en 2004. Il affecte la formation d'un pont disulfure entre l'hepcidine et la ferroportine<sup>102</sup>. A ce jour, plus de 65 variants pathogènes ont été décrits, pour la plupart des variants faux sens, mais 3 variants d'épissage et 2 variants du promoteur ont également été décrits (Figure 10). A la différence des autres formes d'hémochromatose héréditaire, la transmission est autosomique dominante.

Des anomalies moléculaires pertes de fonction du gène *SLC40A1* sont à l'origine de la maladie de la ferroportine (ancien type 4A), qui ne doit plus être considérée comme une forme d'hémochromatose héréditaire mais comme une maladie du métabolisme du fer à part, au vu de son phénotype distinct. Chez les patients atteints, la capacité de la ferroportine à transporter le fer est réduite<sup>103</sup>, empêchant l'absorption efficace du fer alimentaire au niveau intestinal, et diminuant la capacité à recycler le fer au niveau du macrophage. Ainsi, la surcharge en fer s'établit au niveau hépatique et splénique, dans les cellules de Kupffer et les macrophages, et les patients présentent une hyperferritinémie associée à un CST faible à normal<sup>104</sup>. Le diagnostic différentiel avec les autres causes de surcharges en fer, telles que le syndrome métabolique, est donc primordial. De plus, malgré un taux de fer tissulaire élevé, ces patients développent relativement peu de symptômes cliniques<sup>105</sup>. Il a été démontré que la plupart de ces variants perte de fonction entraînent un trouble du trafic intracellulaire : les protéines mutées présentent un défaut de repliement ou ont tendance à s'agréger et sont retenues dans le RE. D'autres entraînent une plus faible capacité de la protéine mutée à exporter le fer lorsqu'elle se trouve à la surface.

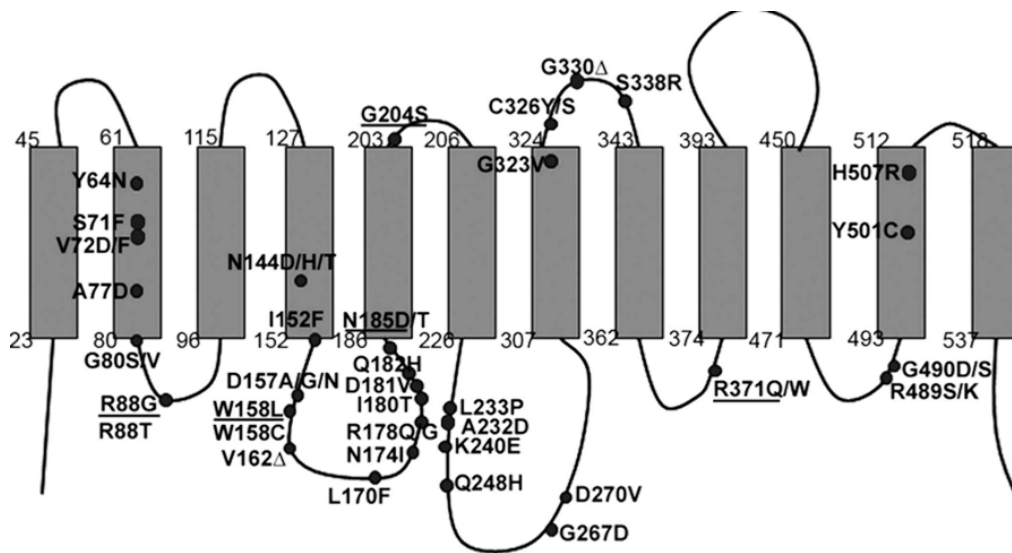


Figure 10 : Localisation des différents variants pathogènes décrits du gène *SLC40A1*<sup>106</sup>

v. Formes liées au gène *HAMP*

Le gène *HAMP* situé sur le bras long du chromosome 19 (19q13), code pour le propeptide *HAMP* (Hepcidin AntiMicrobial Peptide), qui est clivé en hepcidine. Les anomalies de ce gène sont très rares, 16 variants pathogènes ont été décrits à ce jour. Il s'agit de 5 variants faux sens, 3 non-sens, 3 délétions de petite taille et 5 variants de la région 5'UTR du gène<sup>95,96</sup>. Elles sont à l'origine de surcharges en fer juvéniles de transmission autosomique récessive. Il est à noter que des patients hétérozygotes composites pour des variants pathogènes de *HAMP* et *HFE* ont été décrits<sup>86</sup>.

b) Autres causes génétiques

i. Formes liées au gène *BMP6*

La protéine *BMP6* (protéine morphogénétique osseuse 6) est une cytokine de la famille du TGF- $\beta$ , qui se lie aux récepteurs tyrosine kinase BMPR-I et BMPR-II. L'interaction de ces récepteurs et du corécepteur *HJV* conduit à la formation d'un complexe d'effecteurs cytoplasmiques SMAD qui est transloqué dans le noyau et active le promoteur du gène de l'hepcidine<sup>107</sup>(Figure 6). Six variants pathogènes faux-sens hétérozygotes du gène *BMP6* ont été décrits chez des patients présentant une surcharge en fer pour lesquels aucune autre cause n'avait été retrouvée<sup>89,108,109</sup>. Bien que contesté, ils pourraient induire une surcharge modérée d'apparition tardive.

ii. Formes liées au gène *FTH1*

Le gène *FTH1* code pour la sous unité H de la ferritine, protéine majeure de stockage du fer. Le variant faux sens NM\_002032.2 : c.-164A>T, localisée dans le motif de régulation par le fer (IRE) de l'ARNm, a été retrouvée chez plusieurs membres d'une même famille japonaise affectée par une surcharge en fer, héritée sur le mode dominant<sup>110</sup>. Ce variant, également contesté, affecte possiblement l'activité ferroxidase de la protéine.

iii. Formes liées au gènes *CYBRD1*

*CYBRD1* est le gène codant pour la cytochrome b réductase, une protéine impliquée dans la régulation du fer en réduisant le fer au niveau du duodénum, nécessaire à son absorption par DMT1. On sait également que son expression augmente lors d'une carence en fer et diminue lors d'une surcharge en fer<sup>111</sup>. Deux variants pathogènes introniques et faux sens ont été retrouvés chez plusieurs patients atteints d'hémochromatose, chez lesquels aucune autre anomalie génétique n'avait été mise en évidence<sup>112</sup>

iv. Porphyrie cutanée tardive

La porphyrie cutanée tardive (PCT) est un trouble du métabolisme des porphyrines associé à une diminution de l'activité de l'uroporphyrinogène décarboxylase (URO-D) dans le foie, une enzyme de la synthèse de l'hème. Une hépatosidérose mixte peu marquée est trouvée dans 60 % à 70 % des cas<sup>57</sup>. La plupart des PCT semblent être acquises, les principaux facteurs de risque reconnus étant l'hépatite C chronique et la forte consommation d'alcool. Les mécanismes de la surcharge en fer restent très mal compris, mais il existe des cas combinés de sphérocytose et PCT<sup>113</sup>, et des anomalies *HFE* ont été retrouvées de façon fréquente chez les patients, confirmant le lien entre PCT et hémochromatose<sup>114</sup>.

v. Surcharges en fer génétiques associées à une anémie :

Les formes de surcharges en fer suivantes diffèrent des précédentes par la présence d'une anémie, consécutive à un retentissement des anomalies moléculaires sur l'érythropoïèse.

Formes liées au gène *TF* :

L'atransferrinémie est une pathologie héréditaire rare de transmission autosomique récessive, causée par des anomalies moléculaires du gène codant la transferrine (*TF*, chromosome 3 (3q21)). Elle est caractérisée par une diminution sévère de la transferrine sérique, entraînant une absence de transport et de capture du fer par les cellules érythroïdes, aboutissant à une anémie ferriprive sévère. Celle-ci provoque une inhibition sévère de l'hepcidine, une absorption intestinale accrue du fer non lié à la transferrine et une surcharge en fer des autres tissus. Il existe une forme plus modérée causée par des anomalies moins sévères du même gène, connue sous le nom d'hypotransferrinémie<sup>115</sup>.

Formes liées au gène *SLC11A2* :

La protéine transmembranaire DMT1 est localisée sur le pôle apical de la bordure en brosse des entérocytes duodénaux. Elle est impliquée dans l'absorption alimentaire du fer non héminique et dans l'utilisation du fer par les précurseurs érythroïdes. Chez les patients porteurs d'un déficit en DMT1, causé par des anomalies moléculaires du gène *SLC11A2*, seul le fer héminique est absorbé mais les cellules érythroïdes ne parviennent pas à l'utiliser, ce qui aboutit à une anémie microcytaire associée à une surcharge en fer. C'est une pathologie très rare, seuls 10 cas ont été décrits à ce jour<sup>116</sup>.

Formes liées au gène *CP* :

L'acéruplasminémie est une pathologie héréditaire très rare, la prévalence étant estimée à 1/2 000 000<sup>117</sup>. Elle est causée par des anomalies de transmission autosomique récessive du gène codant la céruloplasmine (*CP*). Il existe deux isoformes de cette protéine, une forme sécrétée par le foie et une forme liée au glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la surface des cellules cérébrales, hépatiques, pulmonaires, et rénales<sup>118</sup>. Cette forme membranaire permet la régulation de l'efflux de fer, en stabilisant la ferroportine<sup>119</sup> et en oxydant le fer exporté en Fe<sup>3+</sup>, ce qui permet sa liaison à la transferrine. Des variants perte de fonction conduisent ainsi à une rétention cellulaire du fer, entraînant une surcharge progressive d'une part, et une érythropoïèse restreinte d'autre part. Le phénotype d'acéruplasminémie est donc caractérisé par une anémie microcytaire avec CST abaissé associé à une surcharge en fer notamment hépatique, pancréatique et cardiaque mais également rétinienne et cérébrale.

### c) Gènes modulateurs

Certains polymorphismes de gènes impliqués dans la régulation de l'absorption et du transport du fer pourraient moduler l'expression du phénotype d'hémochromatose, en plus des facteurs acquis précédemment décrits, mais leur rôle dans la pathologie humaine n'est pas encore clair.

La plupart de ces modificateurs génétiques ont été étudiés chez les patients *HFE* C282Y homozygotes, puisqu'ils représentent la grande majorité des patients, et que leur phénotype est très variable. Ainsi, il a été évoqué l'impact de plusieurs polymorphismes sur certains paramètres du bilan martial : le rs884409 (*CYBRD1*) diminuerait la ferritine plasmatique et le CST<sup>120,121</sup>, le rs235756 (*BMP2*) augmenterait la ferritine plasmatique, avec un effet additif en présence des polymorphismes rs4901474 (*BMP4*) ou rs16827043 (*HJV*)<sup>122,123</sup>, les variants *HFE* c.1007-47G>A et c.-467C>G seraient associés à une élévation de la ferritine et du CST<sup>124</sup>, les polymorphismes rs3811647<sup>125</sup> et rs8177240<sup>126</sup> (*TF*) seraient associés à une élévation du fer sérique et de la transferrine, le rs7385804<sup>126</sup> (*TFR2*) serait associé à une élévation du fer sérique et du CST, et le polymorphisme rs41303501 du gène *TFR2* augmenterait la pénétrance des variants pathogènes *HFE*<sup>127</sup>. Enfin, une étude a évoqué l'association possible entre plusieurs autres polymorphismes des gènes *TMPRSS6* et *TF* et différents paramètres ferriques (fer, transferrine, CST, ferritine)<sup>120</sup> (Tableau 3).

D'autres SNP ont été reliés à la sévérité de la maladie : le variant IVS1-24 C>G du gène *SLC40A1* serait associé à la sévérité clinique<sup>128</sup>, les variants p.Phe582Ser et p.Ala588Thr du gène *HIF1A* entraîneraient une surcharge en fer plus sévère, et les cellules transfectées avec ces variants montrent une baisse du taux d'hepcidine<sup>129</sup>. Le polymorphisme p.D519G (rs11558492) du gène *GNPAT* serait associé à un phénotype à haute teneur en fer<sup>130,131</sup>, également chez les hétérozygotes composites *HFE* p.C282Y/p.H63D<sup>132</sup>, bien que ces données soient controversées<sup>133,134</sup>. De la même manière, le variant mitochondrial 16189 a été retrouvé plus fréquemment chez les patients avec surcharge que chez les patients sans surcharge en fer<sup>135</sup>. Il a également été montré chez des souris KO pour le gène *HFE*, que le knockout de l'haptoglobine diminue la surcharge en fer hépatique<sup>136</sup> et que celui de la céruloplasmine augmente la surcharge en fer<sup>137</sup>, ce qui prouve l'interaction entre les produits de ces gènes. Cependant, aucun polymorphisme modifiant le phénotype n'a été retrouvé chez l'homme dans ces 2 gènes.

Certains polymorphismes ont été reliés à une modification du statut martial chez des sujets sans hémochromatose génétique :

- Chez des patients porteurs de  $\beta$ -thalassémie majeure, qui souffrent également d'une surcharge en fer secondaire à la dysérythropoïèse, il a été montré que la présence du polymorphisme rs3833570 du gène *SLC40A1*, codant pour la ferroportine, était associée à une ferritine augmentée<sup>138</sup>. Les patients porteurs des variants de *TMPRSS6* rs855791 ou rs200434923 présentent des taux d'hepcidine significativement plus faibles<sup>139</sup>. Dans une cohorte de sujets sains, ce même effet a été retrouvé chez les porteurs du variant rs855791 à l'état homozygote, les porteurs présentant également un fer sérique et un CST significativement

supérieurs<sup>139</sup>. Ce variant a de plus été retrouvé plus fréquemment chez des patients porteurs d'hémochromatose<sup>140</sup>. Enfin, le variant *HAMP* : c.-582A>G serait possiblement associé à une augmentation de la concentration hépatique en fer chez les patients  $\beta$ -thalassémiques<sup>141</sup> (Tableau 3).

- Les patients déficitaires en alpha-1-antitrypsine, porteurs à l'état homozygote du rs28929474 (*SERPINA1*), peuvent développer une surcharge hépatique en fer sévère en présence de facteurs de risques environnementaux ou d'anomalie moléculaire de *HAMP*. Cette protéine inhibe l'expression de l'hepcidine en bloquant le clivage de *HJV*, ce polymorphisme pourrait donc être impliqué dans les surcharges en fer hépatique en cas de prédisposition génétique ou de facteurs de risque environnementaux<sup>142</sup>.

- Enfin, chez des sujets sains, il a été montré que les porteurs hétérozygotes comme homozygotes du SNP (c.-69C>T) du gène *FTH1* ont une baisse de la transcription de son ARNm<sup>143</sup>. Ce polymorphisme pourrait donc avoir un impact sur le phénotype de surcharge en fer, bien que cela n'ait jamais été démontré. Une étude a également montré que de nombreux autres polymorphismes semblent avoir un effet sur différents paramètres ferriques dans la population générale<sup>126</sup> (Tableau 3).

De nombreux autres gènes sont impliqués dans le métabolisme du fer : *TMPRSS6*, *TFRC*, *FECH*, *ABCB7*, *ABCB8*, *ACO1*, *ERFE*, *GDF15*, *GLRX5*, *HEPH*, *HMOX*, *HP*, *STEAP3*, *TWSG1*, *UROS*, *IRP1* et 2. Cependant, aucun polymorphisme modulant le phénotype de surcharge en fer n'a encore été mis en évidence dans ces gènes.

Population	Polymorphismes	Gène	Fer	TF	CST	Ferritine	Autre	
HFE C282Y homozygotes	rs884409	<i>CYBRD1</i>						
	c.1007-47G>A, c.-467C>G	<i>HFE</i>						
	rs235756	<i>BMP2</i>						
	rs7385804	<i>TFR2</i>						
	rs41303501						Pénétrance	
	rs4820268	<i>TMPRSS6</i>						
	rs3811647, rs8177240	<i>TF</i>						
	rs1049296							
	rs1358024, rs12493168,							
	rs1880669, rs1405023, rs1799852, rs8177215, rs1049296							
	rs3833570	<i>SLC40A1</i>						
	IVS1-24 C>G							
p.Phe582Ser, p.Ala588Thr	<i>HIF1A</i>							
rs11558492	<i>GNPAT</i>							
$\beta$ -thalassémie	rs3833570	<i>SLC40A1</i>						
	rs855791 et rs200434923	<i>TMPRSS6</i>					Hepcidine	
	c.-582A>G	<i>HAMP</i>					CHF	
Population générale	rs744653	<i>SLC40A1</i>						
	rs8177240	<i>TF</i>						
	rs8177179							
	rs1799852							
	rs9990333	<i>TFRC</i>						
	rs7385804	<i>TFR2</i>						
	rs855791	<i>TMPRSS6</i>						
rs228916								

Tableau 3 : Listes des polymorphismes ayant un effet sur les paramètres ferriques sanguins et la sévérité de la surcharge en fer, chez les patients HFE C282Y,  $\beta$ -thalassémiques et dans la population générale.

Les paramètres en rouge sont augmentés en présence du polymorphisme et les paramètres en vert sont diminués.

TF = Transferrine, CST = Coefficient de saturation de la transferrine, CHF = Charge hépatique en fer.



## IV. Sphérocytose et surcharge en fer

### 1) Epidémiologie

Le développement d'une surcharge en fer est fréquent au cours de certaines maladies hémolytiques du globule rouge telles que la stomatocytose héréditaire. Cependant, l'apparition d'une surcharge martiale est peu documentée au cours de la sphérocytose. Une étude réalisée sur 61 patients porteurs de SH a permis d'estimer la fréquence de l'hyperferritinémie, retrouvée chez 22% des patients<sup>144</sup>, cependant, la ferritinémie n'est pas toujours bien corrélée à la surcharge en fer dans la pathologie érythrocytaire.

### 2) Etiologie

Au cours des anémies hémolytiques, la présence d'une surcharge en fer peut être expliquée par l'augmentation de la synthèse de l'EPO qui, en stimulant l'érythropoïèse, entraîne une production accrue d'érythroferrone par les érythroblastes. Cette hormone inhibe la synthèse d'hepcidine, entraînant l'augmentation de l'absorption intestinale de fer<sup>145</sup>. Des taux d'hepcidine abaissés ont effectivement été retrouvés chez des patients atteints d'anémie hémolytique, dont certains étaient sphérocytaires<sup>146</sup>, cependant, l'absorption du fer semble normale au cours de la sphérocytose, malgré la présence de nombreux réticulocytes qui signe la stimulation de l'érythropoïèse<sup>147</sup>.

Chez les patients sphérocytaires, l'hyperferritinémie serait surtout retrouvée à la suite d'un traitement martial inapproprié ou dans les formes sévères ayant nécessité de multiples transfusions. En l'absence de cause évidente, le diagnostic différentiel avec une anémie dysérythropoïétique congénitale doit être systématiquement réévalué.

Toutefois, certains patients porteurs d'une véritable SH développent une surcharge martiale, parfois sévère. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la surcharge serait retrouvée dans les formes modérées de SH, ces patients, très peu symptomatiques, étant rarement splénectomisés et présentant une hémolyse chronique à vie<sup>148</sup>. Cependant, l'étude réalisée sur les 61 patients sphérocytaires a conclu que la plupart des patients non splénectomisés (88%) ne présentent pas de surcharge, et que, parmi les patients avec hyperferritinémie, 85% étaient splénectomisés<sup>144</sup>.

L'association au variant pathogène responsable d'hémochromatose *HFE* : p.C282Y à l'état homozygote<sup>149-152</sup> a été décrite, de même que l'association à ce variant à l'état hétérozygote, en présence du variant H63D<sup>153</sup> ou non<sup>151,154,155</sup>. Cependant, la coexistence chez les patients du variant C282Y n'explique qu'une partie des cas<sup>156</sup>. La présence d'autres variants pathogènes responsables d'hémochromatose a été recherchée chez seulement 5 patients SH avec surcharge, et aucun n'a été retrouvé<sup>148</sup>.

Il est également possible que la présence d'une surcharge soit liée à des formes cliniques particulières de SH, qui présentent une composante dysérythropoïétique<sup>5</sup>. Cette hypothèse est étayée par l'existence de cas décrits d'hyperplasie de la moelle, mises en évidence par la découverte de masses érythropoïétiques extramédullaires<sup>157,158</sup>.

Cependant, les mécanismes physiopathologiques permettant d'expliquer le développement d'une surcharge chez une partie des patients ne sont, à ce jour, pas complètement élucidés. Il est probable que coexistent chez ces patients des facteurs additionnels de surcharge, génétiques ou acquis, encore inconnus.

### 3) Diagnostic

Le PNDS recommande de rechercher de manière systématique une surcharge en fer de chez les patients adultes porteurs d'une SH. La ferritinémie pouvant être modifiée par différents facteurs, son dosage doit être accompagné de l'évaluation du coefficient de saturation de la transferrine (CST) et d'un dosage du fer sérique. Devant une hyperferritinémie > 500 µg/L et/ou un CST > 50 % chez un homme ou 45% chez une femme, en l'absence de facteurs retrouvés, une IRM hépatique avec mesure de la charge hépatique en fer (CHF) doit être réalisée afin de confirmer et de quantifier la surcharge martiale.

### 4) Prise en charge

La prise en charge de la sphérocytose est détaillée dans le Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS)<sup>5</sup>. Une prise en charge spécifique de la surcharge est nécessaire devant une concentration hépatique en fer > 100 µmol/g (7 mg/g) de foie sec. Il est recommandé, dans ce cas, de rechercher des cofacteurs génétiques, en analysant les gènes impliqués dans les surcharges en fer héréditaires et de réaliser une enquête familiale. Une soustraction du fer doit être réalisée, de préférence à l'aide de saignées, si la concentration en hémoglobine le permet ( $\geq 10,5$  g/dL). En cas d'anémie trop marquée ou incontrôlable (crises hémolytiques fréquentes), un traitement chélateur du fer pourra être prescrit (hors AMM). L'objectif est d'obtenir une normalisation de la ferritine et de la charge hépatique en fer.

## OBJECTIFS

Les mécanismes physiopathologiques permettant d'expliquer le développement d'une surcharge en fer chez une partie des patients sphérocytaires n'étant à ce jour pas complètement élucidés, notre étude vise à rechercher des facteurs génétiques additionnels de surcharge par séquençage haut débit. Dans une première partie, nous chercherons à confirmer moléculairement le diagnostic de sphérocytose, et dans une deuxième partie, nous chercherons des cofacteurs génétiques additionnels qui pourraient expliquer le développement de ces surcharges martiales chez une partie des patients.

## MATERIEL ET METHODES

### I. Schéma de l'étude

Mon travail fait suite à une étude préalable de cohorte rétrospective réalisée au CHU de Montpellier par Vincent AZOURY, dans le cadre de sa thèse d'exercice<sup>159</sup>. Cette cohorte comprend 136 patients atteints de sphérocytose héréditaire diagnostiqués entre 1996 et 2020 et recense les données démographiques, cliniques, biologiques et de prise en charge des patients. Nous avons complété ce recueil par les cas diagnostiqués entre 2020 et 2022.

### II. Population étudiée

A partir de cette cohorte, nous nous sommes intéressés aux patients de plus de 18 ans présentant une hyperferritinémie selon les seuils définis par l'HAS, pour lesquels de l'ADN était disponible en banque.

Les patients concernés ont été explorés par séquençage haut débit (NGS), avec un panel de 50 gènes qui comprend entre autres les gènes étudiés en routine dans le cadre des diagnostics de sphérocytose héréditaire et des formes rares de surcharge martiale. La technique de séquençage NGS a été réalisée au laboratoire d'hématologie biologique de Montpellier par les techniciennes de laboratoire dans le cadre du diagnostic. Les gènes ont été enrichis par capture (*Agilent NextSeq SureSelectQXT®*), puis les exons et jonctions intron-exons ont été séquencés sur séquenceur NGS (Illumina MiSeq®). Comme le demande la réglementation en vigueur, les patients ont donné leur consentement écrit pour une étude génétique et la recherche de causes génétiques de surcharges faisant partie des recommandations HAS, aucun protocole particulier n'a été nécessaire.

Les données cliniques et biologiques disponibles pour les patients ont été mises à jour à l'aide du logiciel DxCare et en consultant les dossiers papiers disponibles au sein du Centre de Référence des maladies du Globule rouge et du Fer du CHU de Montpellier. Les données génétiques, lorsqu'elles étaient disponibles, ont été recueillies sur le logiciel de gestion des résultats de biologie moléculaire au CHU de Montpellier (Defgen®).

Nous disposons également des données de séquençage d'un groupe témoin de 14 patients ayant bénéficié d'une analyse NGS pour déficit en facteur VII, ayant donné leur consentement pour l'utilisation de leur ADN pour des études scientifiques anonymisées.

### III. Outils bio-informatiques

#### 1) Seqpilot®

Nous avons utilisé le logiciel SEQPILOT® JSI v4.3.1, module SeqNext v4.1.2, pour réaliser l'alignement des séquences obtenues avec une séquence de référence. Nous avons ainsi pu obtenir, pour chacun des patients, un fichier d'annotation des variants (VCF).

Ce logiciel nous a également permis de vérifier que les variants sélectionnés satisfaisaient aux critères de validation : vérification de la profondeur moyenne de lecture de la base concernée (couverture supérieure à 30x), de la fréquence du variant au sein des reads (VAF >15% (% d'allèles mutés parmi tous les reads), de l'absence de difficultés de séquençage dans la zone concernée et absence d'alignement de pseudogènes.

#### 2) Rstudio®

Le logiciel Rstudio® (R) est un logiciel de programmation informatique, destiné à la science des données et des statistiques. Il nous a permis de coder des scripts (algorithmes) à façon, avec un langage propre (langage R), afin de réaliser les analyses bio-informatiques et statistiques à partir des fichiers VCF obtenus sur Seqpilot®. Un exemple de script est disponible en annexe 1. Les autres sont disponibles sur demande.

#### 3) Segone®

Segone® est une plateforme destinée à l'analyse de données de génomique<sup>160</sup>. Nous avons utilisé son module d'analyse des variations du nombre de copies (CNV), qui permet de mettre en évidence des délétions ou des duplications/triplications de gènes, grâce à une analyse différentielle du nombre d'amplicons détectés chez les patients par rapport à des contrôles.

#### IV. Sélection des variants d'intérêt

##### 1) Gènes d'intérêts

Nous avons tout d'abord sélectionné 35 gènes d'intérêts au sein du panel utilisé.

Afin de confirmer le diagnostic de sphérocytose, nous avons analysé les gènes impliqués dans des pathologies érythrocytaires :

- *EPB42, SLC4A1, ANK1, SPTA1* et *SPTB*, dont les anomalies moléculaires sont responsables de sphérocytose héréditaire.
- *EPB41, PIEZO1, KCNN4, RHAG, STOM, ABCG5, ABCG8* et *ABCB6*, dont les anomalies sont responsables d'autres pathologies de membrane pour lesquelles le diagnostic différentiel phénotypique avec la sphérocytose peut parfois être difficile.
- *CDAN1, SEC23B, KIF23, KLF1, GATA1, C15ORF41* et *PARP4*, dont les anomalies sont responsables de dysérythropoïèses congénitales, ce diagnostic devant être exclu chez les patients sphérocytaires qui présentent une surcharge en fer.
- *ALAS2*, dont les anomalies sont responsables d'anémies sidéroblastiques.
- *PKLR, G6PD*, dont les anomalies, associées à la sphérocytose héréditaire, peuvent en modifier le phénotype.

Nous avons également analysé les gènes impliqués dans le métabolisme du fer :

- *HFE, HJV, HAMP, TFR2* et *SLC40A1*, dont les anomalies sont responsables des formes classiques d'hémochromatose héréditaire.
- *BMP6, FTH1, TF, SLC11A2, CP* et *CYBRD1*, dont les anomalies sont responsables de formes rares de surcharge en fer.
- *FTL*, dont les anomalies sont impliquées dans le développement d'une hyperferritinémie sans surcharge en fer.
- *TMPRSS6, TFR3, FECH, ABCB7, ABCB8, ACO1, ERFE, GDF15, GLRX5, HEPH, HMOX, HP, STEAP3, TWSG1* et *UROS*, impliqués dans le métabolisme du fer mais sans variants pathogènes décrits à ce jour dans le cadre d'hémochromatose.

## 2) Recherche de variants pathogènes

L'écriture d'algorithmes sur le logiciel Rstudio® nous a permis de trier le fichier VCF, contenant les variants annotés grâce au logiciel Seqpilot®, afin de sélectionner les variants pour lesquels une étude approfondie de leur pathogénicité était nécessaire.

Nous avons ainsi conservé les variants rares (fréquence allélique inférieure à 2% dans la population générale), situés sur les gènes d'intérêts, et contenus dans les régions exoniques +/- 30pb.

Nous avons également vérifié l'absence de variants pathogènes décrits sur le site HGMD<sup>161</sup> en dehors des zones d'analyses (zones introniques au-delà des 30pb).

## 3) Recherche de variants modulateurs

Afin de mettre en évidence des variants non rares mais potentiellement impliqués dans le développement d'une surcharge en fer, nous avons écrit un algorithme sur Rstudio® (Annexe 1) qui nous a permis de comparer la fréquence allélique de chaque variant dans notre population de patients avec la fréquence allélique dans la population générale et dans notre groupe témoin (déficit en facteur VII, sans pathologie érythrocytaire ou surcharge en fer connue, séquencé dans les mêmes conditions et issu du même bassin géographique). Etant donné le faible effectif de notre cohorte, nous avons raisonné en nombre d'allèle plutôt qu'en fréquence allélique. Le nombre d'allèle pour chacun des variants a été obtenu comme suit :

Groupe théorique de 14 patients issus de la population générale :

$$\text{Nombre d'allèle} = \text{Fréquence allélique} \times 28$$

Population sphérocytaire et population témoin :

$$\text{Nombre d'allèle} = \text{nombre d'hétérozygotes} \times 1 + \text{nombre d'homozygotes} \times 2$$

Nous avons ensuite comparé ces valeurs pour chaque variant par un test du Chi2 ou un test exact de Fisher lorsque les conditions du test du Chi2 n'étaient pas respectées, grâce à plusieurs lignes de code sur Rstudio®. Afin de trier les variants pour lesquels aucune fréquence allélique n'était disponible dans le fichier VCF, nous avons sélectionné les variants dont le nombre d'allèles différait entre les patients sphérocytaires et la population témoin.

Nous avons également écrit 2 autres scripts afin de comparer, pour chacun des variants, le nombre observé de patients homozygotes et hétérozygotes au nombre attendu dans la population générale et au nombre observé dans la population témoin, calculé selon la loi de Hardy-Weinberg :

$$\text{Nombre attendu de patients homozygotes} = (\text{Fréquence allélique})^2 \times 14$$

$$\text{Nombre attendu de patients hétérozygotes} = (\text{Fréquence allélique}) \times (1 - \text{fréquence allélique}) \times 1$$

Enfin, afin de mettre en évidence des génotypes rares, nous avons rédigé un autre script afin de conserver les variants peu fréquents (fréquence allélique entre 2 et 10%) mais présents à l'état homozygote.

## V. Interprétation des variants

L'interprétation de la pathogénicité des variants repose sur un faisceau d'arguments, qui prend en compte des données cliniques, épidémiologiques, l'existence de variants associés, des données de ségrégation familiale, de bio-informatique et des études fonctionnelles<sup>162</sup>.

### 1) Données épidémiologiques

De manière générale, une fréquence allélique importante dans la population générale est en faveur du caractère bénin du variant. Pour les maladies de transmission autosomique dominante et de pénétrance complète, on considère qu'un variant pathogène ne peut pas avoir une fréquence allélique supérieure à la prévalence de la maladie. Au contraire, pour les maladies de transmission autosomique récessive, la fréquence allélique de certains variants pathogènes peut être >1%.

Afin de connaître les fréquences alléliques des variants sélectionnés dans la population et d'exclure les polymorphismes, nous avons consulté le site dbSNP de NCBI<sup>163</sup> qui recense les informations de plusieurs bases de données, dont gnomAD (Genome Aggregation Database), que nous avons principalement utilisé. GnomAD regroupe les données de séquençage de plus de 125 000 individus non apparentés issus de diverses études de population. Bien qu'elle exclue les individus porteurs de maladies sévères et leurs apparentés, elle peut contenir des données d'individus porteurs de maladies complexes et des variants pathogènes présents à l'état de mosaïque chez des sujets asymptomatiques. Il faut noter également que certains variants de type insertion/délétion peuvent être absents car mal annotés ou mal détectés par séquençage à haut débit.

Nous avons également consulté les bases de données de patients afin de vérifier si les variants d'intérêts avaient déjà été décrits dans la littérature. Les 2 principales que nous avons utilisé sont HGMD<sup>161</sup>, qui recense les publications de variants responsables de maladies héréditaires humaines et Clinvar<sup>164</sup>, qui recense tous les variants décrits dans la littérature, qu'ils aient été considérés comme pathogène ou non.

### 2) Données prédictives

Lorsque la perte de fonction d'un gène est un mécanisme pathogène connu, la mise en évidence d'un variant avec un effet nul (non-sens, frameshift) est un argument fort pour conclure à l'implication du variant dans la pathologie. Au contraire, lorsque le variant étudié est un variant faux sens ou d'épissage, la détermination de son caractère pathogène peut s'avérer plus complexe, d'autant que de très nombreux variants de ce type sont mis en évidence par séquençage haut débit.

Afin de classer les variants, nous avons tout d'abord utilisé le logiciel Alamut afin de recueillir des données sur la conservation de l'acide aminé ou du nucléotide substitué, sur l'écart physico chimique entre l'acide

aminé initial et l'acide aminé substitué, sur la présence du variant dans un domaine spécifique de la protéine ou encore sur la possible création de sites cryptiques et l'abolition de sites d'épissage. A noter que nous avons recherché un éventuel effet sur l'épissage quel que soit le variant, qu'il soit intronique, exonique, synonyme, non-sens, frameshift, faux-sens ou indel.

Afin d'aider à l'interprétation, nous avons également utilisé la plateforme d'annotation Mobidetail<sup>165</sup>, développée au CHU de Montpellier, qui regroupe les informations provenant de multiples sources, notamment les informations de position du variant dans la protéine, la fréquence allélique dans les bases de données de population générale et de patients, et les informations de nombreux logiciels de prédiction de l'effet des variants faux sens et d'épissage, qui prennent en compte un ou plusieurs des paramètres précédemment cités. Cependant, ces logiciels donnent souvent des résultats discordants, c'est pourquoi nous nous sommes également aidés du score MPA (Mobidic Prioritization Algorithm)<sup>166</sup>, qui permet de classer les variants de 0 à 10 selon un algorithme qui interroge différentes bases de données et de nombreux logiciels de prédiction de pathogénicité des variants d'épissage et faux sens. De façon générale, un variant est probablement pathogène lorsque le score est compris entre 8 et 10, et est probablement neutre lorsque le score est compris entre 0 et 5. Une zone grise existe entre 6 et 7.

L'ensemble de ces données nous a permis de classer les différents variants selon la classification ACMG<sup>167</sup> :

Classe	1	2	3	4	5
Variant	Bénin	Probablement bénin	De signification incertaine (VUS)	Probablement pathogène	Pathogène



## I. Description de la population d'étude

Dans la cohorte de 141 patients sphérocytaires, 45 sont âgés de plus de 18 ans au moment du bilan martial. Parmi eux, 29 patients présentent une hyperferritinémie chronique, caractérisée par une ferritinémie persistante supérieure au seuil défini par la HAS (> 200µg/L pour les femmes et >300µg/L pour les hommes). Enfin, 14 patients avaient de l'ADN disponible et donné leur consentement pour une étude génétique par séquençage haut débit et ont pu être conservés pour l'étude finale.

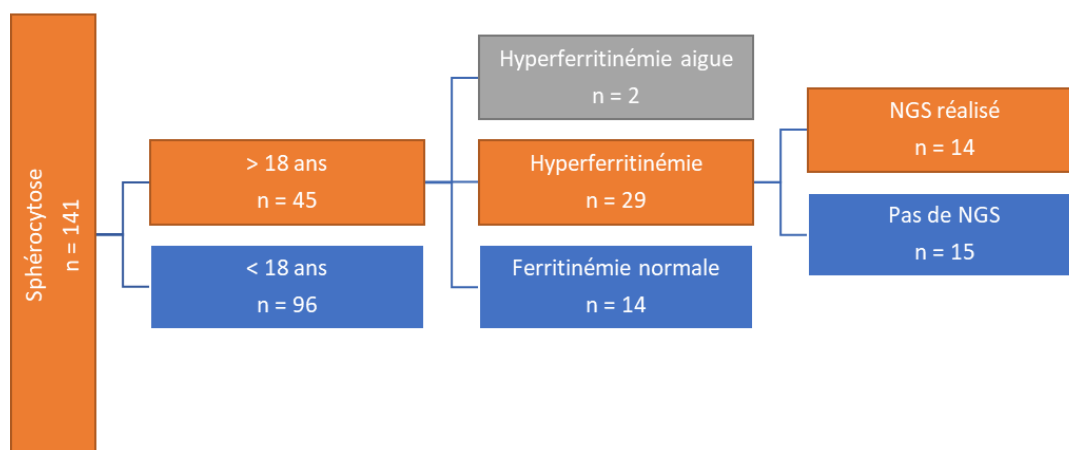


Figure 11 : Description de la population sélectionnée pour l'étude génétique

Dans cette première partie, nous allons présenter les données cliniques, biologiques et de prise en charge des 14 patients sélectionnés pour l'analyse génétique. Les données de 10 des patients avaient été collectées par Vincent AZOURY dans le cadre de sa thèse. Nous avons complété ces données et poursuivi le recueil pour 4 nouveaux patients.

### 1) Données démographiques et cliniques

Notre population d'étude est composée de 5 femmes et 9 hommes, avec un âge moyen au moment du diagnostic de sphérocytose de 31 ans (Tableau 4). Des cas familiaux sont décrits pour 6 d'entre eux. On retrouve un ictère chez 7 patients, une lithiase biliaire chez 7 patients et une splénomégalie chez 9 patients. Sept patients ont été analysés au niveau du promoteur du gène *UGT1A1* : 2 sont porteurs d'un syndrome de Gilbert, et l'un d'eux a présenté un ictère néonatal prolongé. Trois patients ont eu une infection cliniquement symptomatique à parvovirus B19. Plus de la moitié des patients ont décrit de 2 à 5 crises hémolytiques, 2 patients n'ont présenté qu'une crise et 4 patients n'ont jamais eu de crise documentée. De façon intéressante, une reconversion médullaire des genoux a été découverte chez 2 de ces patients<sup>168</sup>. Une cholécystectomie a été pratiquée chez 9 patients et un seul patient (#4) a été splénectomisé. Cinq patients ont été transfusés, de manière épisodique (1 à 2 fois), et la quasi-totalité des patients sont supplémentés par acide folique.

Patient	Sexe	Age Diag (années)	Cas familiaux	Clinique								Prise en charge thérapeutique					
				Ictère	Lithiase biliaire	Splénomé-galie	Taille rate (cm)	Infection symptomatique à parvovirus B19	Crises hémolytiques	Syndrome de Gilbert (Génotype)	Autres	Splénectomie (âge)	Cholécystectomie	Age cholécystectomie	Transfusion	Nbr de transfusion	Acide folique
1	F	10	non	Conjonctival	oui	oui	14,5	oui	2 à 5				oui	20	oui	1	oui
2	F	2	NR	Conjonctival	oui	oui	14		2 à 5	T7T7							oui
3	M	53	oui	Conjonctival + Cutané + Néonatal prolongé		oui				T7T7			oui	30			oui
4	M	27	non	Conjonctival + Cutané		oui	23		2 à 5	T6T6		Totale* (26)					oui
5	M	44	non										oui	47			
6	M	22	NR		oui	oui	14		2 à 5	T6T6	Reconversion médullaire genou droit		oui	23			oui
7	M	24	oui														oui
8	M	4	NR			oui			2 à 5						oui	1	oui
9	M	41	oui	Cutané	oui			oui	1	T6T6			oui	25			oui
10	M	24	NR	Cutané	oui	oui	15	oui	2 à 5	T6T7			oui	39	oui	1	oui
11	F	11	oui			oui	15,5		1	T6T7	Reconversion médullaire bilatérale des genoux		oui	51			oui
12	M	69	NR										oui	57			oui
13	F	69	oui		oui				2 à 5						oui		oui
14	F	?	oui	Cutané	oui	oui			2 à 5				oui	73	oui	2	
Total	M/F	Moyenne	6/14	7/14	7/14	9/14	Moyenne 16	3/14		2/7		1/14	9/14	Moyenne 41	5-14		12/14
	0,6	31															

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et résumé de la prise en charge de la sphérocytose des 14 patients

\* pour splénectomie.

Génotypage UGT1A1 (Gilbert) : T7T7 : allèle T7 [A(TA)7TAA] homozygote (= présence du Syndrome de Gilbert), T6T6 : allèle T6 [A(TA)6TAA] homozygote, T6T7 : hétérozygote T6 et T7

## 2) Données biologiques

Les données biologiques ont été recueillies en dehors d'une éventuelle crise hémolytique et avant toute prise en charge (splénectomie ou prise en charge de la surcharge en fer), à l'exception du patient #13 pour lequel les données n'étaient disponibles qu'après le début d'un traitement par chélateur du fer.

### a) Numération et frottis sanguin

Au niveau de la numération sanguine, on retrouve une anémie chez 2 patients seulement (#13 et #14), et seul un patient (#12) a une CCMH supérieure à la normale. Tous les patients, sauf un (#3), ont des réticulocytes augmentés. Des sphérocytes sont visibles chez tous les patients, en quantité très variable (de très rares à 20%), et 3 patients (#1, #4, #10) ont également des « mushroom cells ». Certains patients présentent également d'autres anomalies des globules rouges, détaillées dans le tableau 5.

Patient	Numération								Frottis sanguin		
	Hg (g/dL)	GR (T/L)	VGM (fL) [80-100]	Ht (%)	CCMH (g/dl)	TCMH (pg)	IDR (%) [<15]	Réticulocytes (G/L) [20-150]	Présence de sphérocytes	Sphérocytes (%)	Autres anomalies des GR
1	12	3,7	92	34	35,1	32,4	17,2	544	oui	20	Mushrooms, acanthocytes
2	12,1	3,54	98	35	35,1	34,2	15,2	566	oui	2	Stomatocytes
3	13,5	4,11	99	41	33,3	32,8	12,3	117	oui	très rares	Dacryocytes, rares elliptocytes
4	13,1	4,04	91	37	35,7	32,4	15,9	339	oui	1	Mushrooms
5	15,2	4,25	106	45	33,6	35,8	13,1	170	non		
6	14,4	4,49	91	41	35,1	32,1	15,2	332	oui	2	
7	12,9	3,8	100	38	34	33,9	14,6	380	oui	5	
8	12,1	3,38	102	34	35	35,7	14,7	395	oui	52	Corps de papenheimer, ponctuations basophiles
9	13,3	3,98	97	39	34,4	33,4	17,5	191	oui		
10	12,8	3,82	94	36	35,5	33,5	15,4	359	non		Mushrooms
11	12,4	4,26	84	36	34,6	29,1	20,4	498	oui	18	
12	15	4,33	93	40	37,2	34,6	17,8	267	oui	8,9	Rares ponctuations basophiles, stomatocytes, corps de Heinz
13	9,5	3,14	93	29	32,5	30,3	16,8	323	oui	12	Ponctuations basophiles
14	9,8	3,6	88	32	31,2	27,3	23,7	330	oui	5	

Tableau 5 : Numération sanguine et frottis sanguin des 14 patients. Les résultats anomaux sont surlignés en rouge.

### b) Bilan biochimique

Tous les patients présentent des stigmates d'hémolyse, caractérisée par une haptoglobine effondrée et/ou une augmentation de la bilirubine libre (Tableau 6). Un dosage enzymatique de la *G6PD* a été effectué chez 6 patients et est revenu normal. A noter qu'un patient (#3) présente aussi un déficit enzymatique en pyruvate kinase.

Patient	Bilan Hémolyse				Enzymes	
	Bilirubine libre (µmol/L) [<21]	LDH (UI/L) [135-225]	Haptoglobine (g/L) [0,3-2]	Test de Coombs	Pyruvate kinase UI/g Hb	G6PD UI/g Hb [7-21]
1	24	206	<0,1			
2	83	206	0,1			
3	43	Normale	0,1	Négatif	6 [11-41]	11,1
4	41	213	Normale			17,5
5	5		0,1	Négatif	13,8 [14-19]	Normal
6	29	210	0,1	Négatif		
7	44	435	0,1			
8	72		0,1			12,1
9	22	214	0,1			7,2
10	28	310	0,1			Normal
11	52	296	0,1			
12	33	262	<0,1	Négatif		
13	11	224	0,1			
14	23		0,1			

Tableau 6 : Bilan biochimique et enzymatique érythrocytaire des 14 patients. Les résultats anormaux sont surlignés en rouge.

### c) Tests de confirmation phénotypique de la sphérocytose héréditaire

Le diagnostic de sphérocytose a été confirmé par des tests phénotypiques pour 12 des 14 patients (Tableau 7). Pour 11 patients devant un Pink test et un test EMA positif et pour un patient (#10) devant un Pink test positif, un test EMA négatif et une éktyctométrie qui confirme le diagnostic de sphérocytose. Le diagnostic est incertain pour 2 patients : l'un (#5) présente un Pink test et un test EMA négatif et l'éktyctométrie n'a pas permis de trancher entre une sphérocytose atypique et une stomatocytose. Le dernier patient (#3) a uniquement un pink test positif.

Patient	Tests spécifiques			
	Pink test (%) [0-28]	EMA (% de diminution)	Test de résistance osmotique	Ektacytométrie
1	92,5	28	Déviaton vers la droite	En faveur d'une sphérocytose
2	47,5	16,7	Déviaton vers la droite	En faveur d'une sphérocytose
3	29,6	8,1	Normale	Normale
4	34,7	27,6	Déviaton vers la droite	En faveur d'une sphérocytose
5	18,5	8	Normale	Sphérocytose atypique ? Stomatocytose
6	37,9	23,7		En faveur d'une sphérocytose
7	64,49	29,9	Déviaton vers la droite	
8	94,08	26,3	Déviaton vers la droite	
9	44,6	36,8		En faveur d'une sphérocytose
10	35	9,6		En faveur d'une sphérocytose
11	86,3	41,9		
12	83,2	34	Déviaton vers la droite	En faveur d'une sphérocytose
13	72,11	25	Déviaton vers la droite	
14	63	16,9	Déviaton vers la droite	

Tableau 7 : Tests spécifiques utilisés pour le diagnostic de sphérocytose des 14 patients. Les résultats anormaux sont surlignés en rouge.

b) Bilan martial et prise en charge de la surcharge en fer

L'ensemble des patients a été sélectionné sur la base d'une ferritinémie supérieure au seuil défini par l'OMS pour l'âge et le sexe. La ferritinémie moyenne est de 824 µg/L [307-2452], et un seul patient rapporte l'existence de cas familiaux de surcharge en fer (Tableau 8). Une IRM hépatique avec mesure de la concentration hépatique en fer (CHF) a été pratiquée chez tous les patients et une surcharge en fer significative, définie par une CHF > 90 µmol/g, a été retrouvée chez 8 patients (57%). Seuls 5 patients ont un CST > 45%, dont un pour lequel on ne retrouve pas de surcharge hépatique significative. Chez ces patients, il n'existe aucune corrélation significative entre la CHF et la ferritinémie ou le CST. Une prise en charge par saignées a été proposée pour 6 patients, et un patient (#5) a été traité par chélateurs du fer.

Patient	Bilan martial					Prise en charge	
	Ferritine (µg/L) [F:13-150] [H:40-300]	CST (%) [23-45]	IRM/ CHF (µmol/g) [<36]	CRP [<5]	Cas familiaux	Saignées	Chélateur du Fer
1	453	67	69	<0,3	Surcharge en fer chez oncles et tantes		
2	315	22	23	0,3			
3	1623	53	183			oui	oui
4	307	43	37	0,3			
5	809	50	90			oui	oui
6	351	44	45				
7	547	44	170			oui	
8	2452	72	99				
9	872	28	100	0,6		oui	
10	557	41	210	0,8		oui	
11	413	30	42				
12	1334	48	131			oui	
13	860		230	2			oui
14	639	36	60				

Tableau 8 : Bilan martial, mesure de la CHF, et prise en charge de la surcharge en fer des 14 patients. Les résultats anormaux sont surlignés en rouge.

## II. Etudes des gènes impliqués dans des pathologies du globule rouge

### 1) Recherche de variants pathogènes

	Gène	Variant	Protéine	Patient(s) n°	Fréquence GnomAD (%)	MPA		Clinvar	Classe ACMG
						Score	Impact		
Gènes responsables de sphérocytose héréditaire	<b>ANK1</b> NM_020476.3 Ankyrine	c.2839A>G	p.Thr947Ala	10	0,001	7	Moderate missense		3
		c.3487G>A	p.Gly1163Arg	2	0,002	5	Low missense		3
		c.2981C>T	p.Pro1035Leu	5		7	Moderate missense	VUS*2	3
		c.5097-33G>A		11		10	High splice		4
		c.3701delC	p.Thr1234Metfs*15	1		10	Frameshift		4
		c.2170C>T	p.Gln724Ter	8		10	Non sens		5
		c.4918C>T	p.Gln1640Ter	14		10	Non sens		5
	<b>SLC4A1</b> NM_000342.4 Bande 3	c.1800G>C	p.Lys600Asn	12		8	Moderate splice		4
		c.2510C>T	p.Thr837Met	9		10	Clinvar pathogenic	Likely pathogenic*1	5
	<b>SPTA1</b> NM_003126.4 Spectrine α	c.4610A>T	p.Lys1537Ile	4		6	Moderate missense		4
		c.1677+1G>C	Alteration of the consensus splice	10		10	High splice		5
	<b>SPTB</b> NM_001024858.3 Spectrine β	c.5402G>A	p.Arg1801His	2	0,01	7	Moderate missense		3
		c.4885C>T	p.Gln1629Ter	7		10	Non sens		4
		c.5474_5486del	p.Gly1825Alafs*71	13		10	Frameshift		4
c.4010delA		p.Lys1337Serfs*3	6		10	Frameshift, STOP 3pb en aval		5	
Autres gènes impliqués dans des anomalies du globule rouge	<b>ABCG5</b> NM_022436.3	c.1762+1G>T	Alteration of the consensus splice site	7		6	Low splice		3
	<b>PIEZO1</b> NM_001142864.4	c.3052C>T	p.His1018Tyr	10		6	Moderate missense		3
	<b>KIF23</b> NM_138555.4	c.1823G>A	p.Arg608His	6		6	Moderate missense		3
	<b>PKLR</b> NM_000298.6	c.1516G>A	p.Val506Ile	9	0,42	6	Moderate missense	Conflicting : VUS*6, likely benign*2	3
		c.1010G>A	p.Arg337Gln	3		10	High missense		5

Tableau 9 : Liste des variants pathogènes (ACMG 4 et 5) et des variants de signification incertaine (ACMG 3) retrouvés chez les 14 patients sur les gènes responsables de sphérocytose héréditaire et d'autres anomalies constitutionnelles du globule rouge

#### a) Etude des gènes responsables de sphérocytose héréditaire

Nous avons tout d'abord recherché chez les patients la présence de variants pathogènes des 5 principaux gènes impliqués dans la pathologie : *ANK1*, *SLC4A1*, *SPTB*, *SPTA1* et *EPB42*. Au total, 38 variants rares (fréquence allélique <2%) compris dans les zones exoniques +/- 30pb ont été analysés. On retrouve 11 variants pathogènes à l'état hétérozygote, 4 variants de signification incertaine (Tableau 9) et 23 variants bénins (Annexe 1). Aucun variant pathogène décrit dans la littérature en dehors de notre zone d'étude (exon +/- 30 pb) n'a été retrouvé.

*ANK1* : On retrouve 7 anomalies moléculaires, dont :

- **4 variants pathogènes** : Deux variants (c.2170C>T et c.4918C>T) aboutissent à la formation d'un codon stop, le variant c.3701delC entraîne un décalage du cadre de lecture, et le variant c.5097-33G>A, déjà décrit<sup>15</sup>, est prédit pour avoir un effet hautement pathogène sur l'épissage. De plus, une étude des transcrits in vitro a confirmé son effet sur l'altération de l'épissage (données non publiées).

- **3 variants de signification incertaine**, jamais décrits : les variants *ANK1* : c.2839A>G, c.3487G>A et c.2981C>T, présents sur des AA très conservés, sont classés pathogènes par plusieurs logiciels de prédiction.

*SLC4A1* : On retrouve **2 variants pathogènes** : un variant affectant l'épissage (c.1800G>C), présent sur la dernière base de l'exon 14 et un variant faux sens (c.2510C>T) considéré pathogène par l'ensemble des logiciels de prédiction.

*SPTA1* : On retrouve **2 variants pathogènes** : un variant affectant l'épissage (c.1677+1G>C), localisé sur la première base d'un intron et un variant faux sens (c.4610A>T) considéré comme pathogène par de nombreux logiciels de prédiction.

*SPTB* : On retrouve 4 anomalies moléculaires :

- **3 variants pathogènes** : un variant non-sens (c.4885C>T) et 2 variants entraînant un décalage du cadre de lecture (c.5474\_5486del), dont l'un (c.4010delA) entraîne la formation d'un codon stop 3 AA en aval.

- **1 variant de signification incertaine**, jamais décrit : c.5402G>A, mais considéré pathogène par certains logiciels de prédiction.

## b) Etude des gènes impliqués dans d'autres anomalies du globule rouge

Les gènes *EPB41*, *PIEZO1*, *KCNN4*, *RHAG*, *STOM*, *ABCG5*, *ABCG8*, *ABCB6* et *EPB41* ont été étudiés afin d'écarter les autres anomalies de la membrane érythrocytaire, notamment la stomatocytose héréditaire chez laquelle la surcharge en fer est plus fréquente. Les gènes *PKLR*, et *G6PD* ont été analysés afin de vérifier l'absence d'anomalies enzymatiques pouvant majorer l'hémolyse. Le gène *ALAS2* a été analysé à cause de son implication dans des formes d'anémies sidéroblastiques non syndromiques s'accompagnant de surcharges en fer. Enfin, les gènes *CDAN1*, *SEC23B*, *KIF23*, *KLF1*, *GATA1*, *C15ORF41* et *PARP4*, ont également été analysés afin d'écarter un diagnostic de dysérythropoïèse congénitale, au cours de laquelle une surcharge en fer est décrite. Sur les 25 variants rares (<2%) présents dans les zones exoniques +/- 30pb, 20 ont été considérés bénins (Annexe 2), 4 de signification incertaine et 1 pathogène (Tableau 9).

On retrouve **un seul variant pathogène** : le variant faux sens *PKLR* : c.1010G>A, qui est retrouvé chez un patient pour lequel le dosage enzymatique de la pyruvate kinase est abaissé.

**4 autres variants très rares de signification incertaine** sont retrouvés :

- Le variant *PKLR* : c.1516G>A, dont les interprétations dans la littérature diffèrent, est présent chez un patient pour lequel le dosage enzymatique n'a jamais été réalisé.
- Le variant *PIEZO1* : c.3052C>T, dont les anomalies sont responsables de stomatocytose, est présent chez le patient #10. Plusieurs logiciels de prédiction de pathogénicité le considèrent pathogène, cependant, les variants pathogènes de ce gène sont des variants gains de fonction, or tous les logiciels de prédiction proposent d'évaluer des pertes de fonction.
- Le variant *ABCG5* : c.1762+1G>T a déjà été décrite chez un patient atteint de sitostérolémie, mais en présence d'un autre variant en trans. Le patient #7 qui la porte possède par ailleurs un variant pathogène sur le gène *SPTB*, et présente une forte surcharge hépatique en fer.
- Le variant *KIF23* : c.1823G>A, dont les anomalies sont responsables de dysérythropoïèses congénitales, est présent chez l'un des 2 patients (#6) qui présente une reconversion médullaire.

## 2) Etude des CNV

Après étude des variations du nombre de copies (CNV) sur SeqOne®, nous avons mis en évidence une large délétion de *ANK1*, emportant au minimum les exons 5 à 7 chez le patient #2.



### 3) Confirmation génotypique du diagnostic de sphérocytose

Au total, le diagnostic de sphérocytose est confirmé pour 11 patients (Tableau 10). Cinq sont porteurs d'anomalies moléculaires hétérozygotes du gène *ANK1* : 2 patients (#8 et #14) portent des variants non-sens, un patient (#1) un variant entraînant un décalage du cadre de lecture, un patient (#2) une délétion de plusieurs exons et un patient (#11) un variant d'épissage. Une anomalie hétérozygote de *SLC4A1* a été retrouvée chez 2 patients : un variant faux sens (#9) et un variant d'épissage (#12). Trois patients ont une anomalie moléculaire de *SPTB* : 2 variants décalant le cadre de lecture (#6 et #13) et 1 variant non-sens (#7). Enfin, un patient (#4) présente une anomalie moléculaire du gène *SPTA1* à l'état hétérozygote, associé à l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  homozygote.

Patient	Globule Rouge							Gènes impliqués dans d'autres pathologies du globule rouge
	Génétique de la sphérocytose héréditaire						Conclusion	
	<i>ANK1</i>	<i>SLC4A1</i>	<i>SPTB</i>	<i>SPTA1</i>	$\alpha$ - <i>lely</i>	<i>EPB42</i>		
1	c.3701delC						Sphérocytose confirmée	
2	Large délétion c.3487G>A		c.5402G>A htz				Sphérocytose confirmée	
3							Pas de mutation expliquant clairement le phénotype	<i>PKLR</i> : c.1010G>A
4				c.4610A>T			Sphérocytose confirmée	
5	c.2981C>T						Variant potentiellement pathogène	
6			c.4010delA				Sphérocytose confirmée	<i>KIF23</i> : c.1823G>A
7			c.4885C>T				Sphérocytose confirmée	<i>ABCG5</i> : c.1762+1G>T
8	c.2170C>T						Sphérocytose confirmée	
9		c.2510C>T					Sphérocytose confirmée	<i>PKLR</i> : c.1516G>A
10	c.2839A>G			c.1677+1G>C			Impossible d'affirmer la participation de ces variants	<i>PIEZO</i> : c.3052 C>T
11	c.5097-33G>A						Sphérocytose confirmée	
12		c.1800G>C					Sphérocytose confirmée	
13			c.5474_5486del				Sphérocytose confirmée	
14	c.4918C>T						Sphérocytose confirmée	

Tableau 10 : Anomalies moléculaires des gènes impliqués dans des pathologies érythrocytaires retrouvées chez les 14 patients. Les anomalies très probablement pathogènes sont en rouge et les variants de signification incertaine en noir. L'ensemble des variants sont retrouvés à l'état hétérozygote. La présence de l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  est schématisé par une case grise (état hétérozygote) ou noire (état homozygote).

#### 4) Etude de l'impact des anomalies moléculaires

Afin de déterminer si l'anomalie moléculaire en elle-même peut avoir un impact sur le phénotype de surcharge martiale chez les patients sphérocytaires, nous avons comparé les valeurs de la ferritinémie, du CST et de la CHF en fonction du type d'anomalie retrouvée ou du gène muté. Nous ne mettons pas en évidence de différences significatives (Figure 12), cependant, le nombre de patients dans chacune des catégories reste relativement faible pour permettre de statuer.

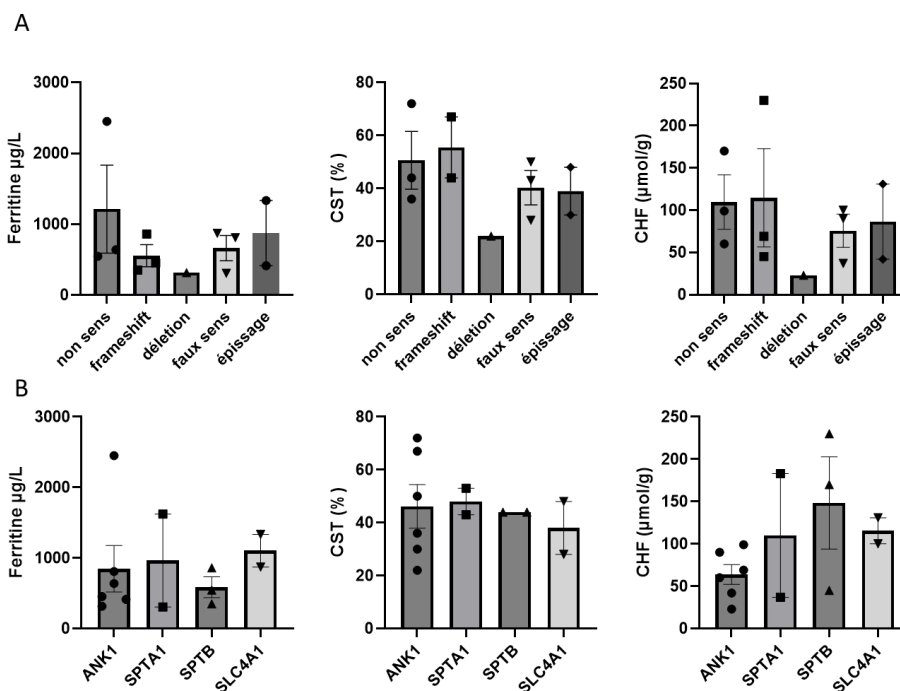


Figure 12 : Valeurs de la ferritinémie, du CST et de la CHF en fonction de l'anomalie moléculaire responsable de la sphérocytose héréditaire : type d'anomalie (A) et gène impliqué (B). A noter que les patients #3 (aucune anomalie retrouvée) et #10 (une anomalie SPTA1 et une anomalie ANK1 n'apparaissent pas dans ces figures).

Nous avons également comparé les gènes mutés chez les patients avec et sans hyperferritinémie (Tableau 11). Les patients sans hyperferritinémie ont été sélectionnés dans la cohorte initiale de 141 patients sphérocytaires lorsque l'anomalie moléculaire responsable de la sphérocytose avait été identifiée par séquençage. Du fait des faibles effectifs, le test du Chi<sup>2</sup> n'est pas applicable (effectifs théoriques <5). Nous avons donc regroupé les données pour savoir s'il pourrait y avoir plus d'anomalies de ANK1 chez les patients avec hyperferritinémie, et avons appliqué le test exact de Fisher. Nous ne mettons pas en évidence de différence significative (p=0.128).

	ANK1	SPTA1	SPTB	SLC4A1	EPB42	Total
Hyperferritinémie	6	1	3	2	0	12
Ferritinémie normale	0	1	4	1	0	6
Total	6	2	7	3	0	18

Tableau 11 : Comparaison des gènes mutés entre les patients avec et sans hyperferritinémie. A noter que les patients #3 (aucune anomalie retrouvée) et #10 (une anomalie SPTA1 et une anomalie ANK1) n'apparaissent pas dans ce tableau.

Nous avons ensuite cherché à comparer les gènes mutés entre les patients avec surcharge hépatique vraie et les patients sans surcharge (Tableau 12). Le tableau suivant résume la répartition des variants pathogènes retrouvés dans ces 2 catégories. Le test du Chi<sup>2</sup> n'était pas applicable du fait des faibles effectifs. Cependant, il ne semble pas y avoir de différence de répartition entre les 2 populations.

	ANK1	SPTA1	SPTB	SLC4A1	EPB42	Total
Surcharge	2	0	2	2	0	6
Pas de surcharge	4	1	1	0	0	6
Total	6	1	3	2	0	12

*Tableau 12 : Comparaison des gènes mutés entre les patients avec et sans surcharge hépatique vraie. A noter que les patients #3 (aucune anomalie retrouvée) et #10 (une anomalie SPTA1 et une anomalie ANK1), qui présentent une surcharge hépatique avérée, n'apparaissent pas dans ce tableau.*

### III. Etude des gènes du métabolisme du fer

#### 1) Recherche de variants pathogènes

	Gène	Variant	Protéine	Patient(s) n°	Fréquence GnomAD (%)	MPA		Clinvar	ACMG
						Score	Impact		
Gènes impliqués dans des surcharges en fer	<b>HFE</b> NM_000410.3	c.187C>G	p.His63Asp	3 * et 10* 4, 5, 7 et 8	10,8	4,0	Low missense	Conflicting : pathogenic*22, VUS*1, Likely benign*1, benign*1	3
	<b>HJV</b> NM_213653.3	c.863G>A	p.Arg288Gln	5	0,001	10,0	High missense		4
	<b>SLC40A1</b> NM_014585.5	c.744G>T	p.Gln248His	6	0,49	4,0	Low missense	Benign*1, Likely benign*1	4
	<b>CP</b> NM_000096.4	c.347C>A	p.Pro116His	6	0,19	7,5	Moderate Missense	Benign*2, Likely benign*1	3
Autres gènes du métabolisme du fer	<b>FECH</b> NM_001012515.3	c.163G>A	p.Gly55Ser	6	0,086	2,0	Low missense	Benign*1	3
		c.333-48T>C	<b>Complex alteration of the splicing process</b>	11	11,2	0,0		Conflicting : pathogenic*5, likely pathogenic*3, VUS*2, Likely benign*3, benign*1	3
	<b>ABC8</b> NM_007188.5	c.931G>A	p.Ala311Thr	10		8	High missense		3

Tableau 13 : Variants pathogènes et de signification incertaine retrouvés sur les gènes responsables de surcharges en fer et sur les autres gènes impliqués du métabolisme du fer, chez les 14 patients.

#### a) Etude des gènes impliqués dans les formes classiques d'hémochromatose

Nous avons tout d'abord recherché des anomalies moléculaires dans les gènes *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* et *SLC40A1*, dont les anomalies sont responsables des formes classiques d'hémochromatose héréditaire.

Nous n'avons retrouvé aucun variant pathogène du gène *HFE*, dont les anomalies moléculaires sont à l'origine de la plupart des formes d'hémochromatose héréditaire, et notamment, aucun patient ne porte le variant C282Y, ni le variant S65C (NM\_000410.4 : c.193A>T).

Nous avons ensuite analysé les gènes responsables d'hémochromatose non-*HFE* : *HJV*, *HAMP*, *TFR2* et *SLC40A1*. Nous avons retrouvé 2 variants potentiellement pathogènes (Tableau 13) :

- Le variant *HJV* : c.863G>A (p.Arg288Gln) n'a jamais été décrit, cependant, un autre variant sur le même acide aminé (p.Arg288Trp) est pathogène à l'état homozygote ou hétérozygote composite. Bien que l'écart physico-chimique entre l'arginine et le tryptophane soit plus grand que celui entre l'arginine et la glutamine, les logiciels de prédiction lui attribuent un effet délétère. En effet, l'acide aminé 288 semble très important dans la protéine. Il est très conservé et est situé dans le domaine vWD de la protéine, impliqué dans l'autoprotéolyse, un processus primordial pour l'adressage membranaire de la protéine hétérodimérique. Il est donc possible que ce variant perde son activité de corécepteur de BMP<sup>169</sup>.

- Le variant *SLC40A1* NM\_014585.6 : c.744G>T (p.Gln248His) est impliqué dans la sidérose des Bantous, également appelée hémochromatose Africaine. Cette pathologie, qui ressemble à l'hémochromatose liée à *SLC40A1*, est retrouvée dans certaines populations Africaines.

Les variants bénins retrouvés sont listés en Annexe 3.

#### b) Etude des gènes impliqués dans les formes rares de surcharge en fer

Des variants pathogènes sur les gènes *BMP6*, *FTH1*, *TF*, *SLC11A2*, *CP* et *CYBRD1* ont également été retrouvés de façon rare chez des patients avec surcharge en fer. Nous retrouvons un seul variant, de signification incertaine, localisé sur le gène *CP* (Tableau 13). Il n'a jamais été décrit, est localisé sur un AA moyennement conservé et l'écart physico-chimique entre l'AA muté et l'AA sauvage est important. Cinq des 7 logiciels de prédiction de pathogénicité lui attribuent un effet délétère, cependant, certaines équipes l'ont classé en bénin.

#### c) Etude des autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer

Aucun variant pathogène n'a été retrouvé sur le gène *FTL*, dont les anomalies moléculaires sont impliquées dans le développement d'une hyperferritinémie sans surcharge en fer.

Nous avons également analysé les gènes *TMPRSS6*, *TFRC*, *FECH*, *ABCB7*, *ABCB8*, *ACO1*, *ERFE*, *GDF15*, *GLRX5*, *HEPH*, *HMOX*, *HP*, *STEAP3*, *TWSG1* et *UROS*, impliqués dans le métabolisme du fer mais sans variant pathogène décrit à ce jour dans le cadre d'hémochromatose.

Nous avons retrouvé 3 variants de signification incertaine (Tableau 13) :

- Le variant *FECH* : c.333-48T>C est fréquent, mais on sait qu'il entraîne un épissage aberrant et conduit à la dégradation de l'ARNm. Ce variant, dit de faible expression, contribue à expliquer la faible pénétrance de la protoporphyrie érythropoïétique, qui ne se manifeste que lorsque ce variant est présent en *trans* d'un variant pathogène de *FECH*<sup>170</sup>.

- Le variant *FECH* : c.163G>A (p.(Gly55Ser) n'a jamais été décrit. Cependant, un autre variant (p.Gly55Cys) situé sur le même AA est rapporté pathogène lorsqu'il est associé à l'allèle de faible expression précédemment décrit. Cependant, l'écart entre l'acide aminé muté et l'acide aminé sauvage est peu important à la différence du variant déjà décrit. De plus, peu de logiciels de prédiction lui accordent un effet pathogène.

- Le variant *ABCB8* : c.931G>A, n'a jamais été décrit, cependant, les logiciels de prédiction s'accordent sur son effet pathogène.

## 2) Etude des CNV

De la même manière que pour les gènes impliqués dans les anomalies des globules rouges, nous avons recherché des délétions ou des duplications/triplications des gènes. Nous n'en avons pas mis en évidence.

#### IV. Recherche d'autres variants impliqués dans le développement d'une surcharge en fer

##### 1) Etude des polymorphismes avec un impact sur le phénotype martial

Parmi les polymorphismes retrouvés dans la littérature comme pouvant affecter les paramètres ferriques dans la population générale ou faire varier les phénotypes chez les patients porteurs d'hémochromatose héréditaire ou de  $\beta$ -thalassémie, que nous avons décrits dans l'introduction (partie III.3c)), 7 étaient localisés dans des zones du panel ayant une couverture suffisante et donc analysables. Aucun n'est présent en quantité significativement différente chez nos patients par rapport à la population générale.

##### a) Modificateurs génétiques de la ferritinémie ou du CST :

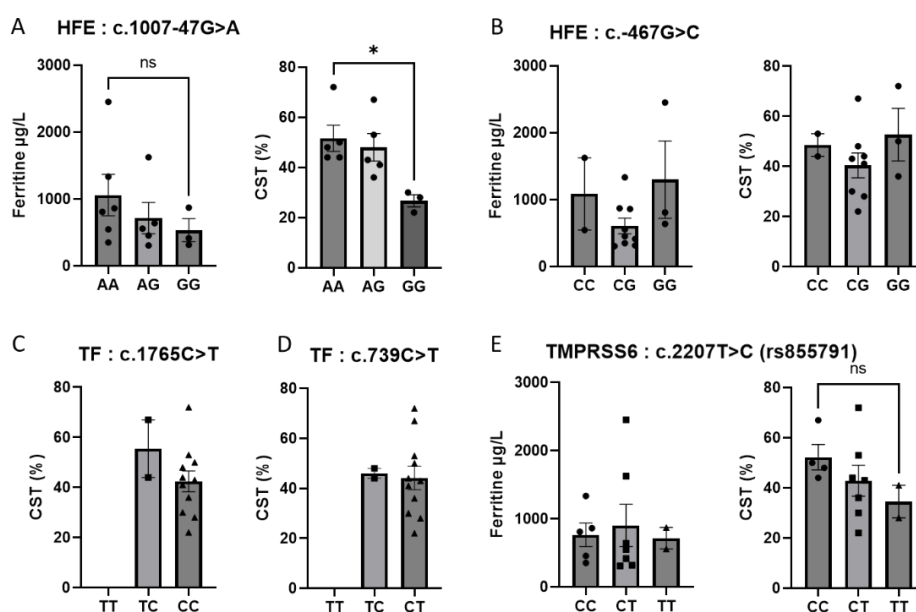


Figure 13 : Variation de la ferritine et du CST en fonction du génotype des patients pour les polymorphismes modificateurs décrits dans la littérature

Le variant *HFE* c.1007-47G>A qui serait associé à une élévation des paramètres ferriques chez les patients *HFE* C282Y homozygotes<sup>124</sup>, est retrouvé chez 5 patients à l'état homozygote et chez 6 à l'état hétérozygote. Nous ne mettons pas en évidence de différence significative au niveau de la ferritinémie, cependant, le CST est significativement plus haut chez les patients homozygotes pour ce variant par rapport aux patients homozygotes sauvages ( $p=0.013$ ) (Figure 13A).

Le variant *HFE* : c.-467C>G serait également associé à une élévation des paramètres ferriques chez ces mêmes patients<sup>124</sup>. Il a été retrouvé chez 2 patients à l'état homozygote et 9 à l'état hétérozygote, mais nous ne mettons pas en évidence de différence significative, que ce soit pour la ferritine comme pour le CST (Figure 13B).

Le variant *TF* : c.1765C>T (rs1049296) augmenterait le CST chez les patients C282Y<sup>120</sup>. Il a été retrouvé chez 2 patients à l'état hétérozygote, sans différence significative au niveau du CST (Figure 13C).

Le variant *TF* : c.739C>T (rs1799852) augmenterait le CST dans la population générale<sup>126</sup>. Il a été retrouvé chez 2 patients à l'état hétérozygote, les 2 patients ayant un CST de 44 et 48, avec une surcharge hépatique vraie. Nous ne mettons cependant pas de différence significative du CST entre les patients porteurs de ce polymorphisme et les autres (Figure 13D).

Le variant rs855791 de *TMPRSS6* à l'état homozygote abaisserait le taux d'hepcidine, le rapport hepcidine/ferritine et augmenterait les paramètres ferriques (CST, ferritine) chez patients  $\beta$ -thalassémiques majeurs<sup>139</sup>. Il a été retrouvé chez 5 patients à l'état homozygote et 7 patients hétérozygotes. La ferritine ne diffère pas dans notre population entre les patients homozygotes mutés et sauvages, cependant, bien que non significatif, on note une tendance à l'augmentation du CST chez les patients homozygotes pour ce variant (Figure 13E).

Le génotype des patients pour ces polymorphismes est résumé dans le tableau 14.

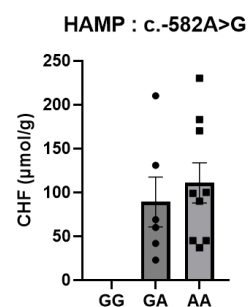
Patient n°	Ferritine ( $\mu\text{g/L}$ )	CST (%)	Polymorphisme				
			$\nearrow$ Ferritine		$\nearrow$ CST		
			HFE c.1007-47G>A	HFE c.-467C>G	TMPRSS6 rs855791	TF c.1765C>T	TF c.739C>T
4	307	43					
2	315	22					
6	351	44					
11	413	30					
1	453	67					
7	547	44					
10	557	41					
14	639	36					
5	809	50					
13	860						
9	872	28					
12	1334	48					
3	1623	53					
8	2452	72					

Tableau 14 : Distribution des variants décrits comme ayant un effet sur la ferritinémie ou le CST.

#### b) Modificateurs génétiques de la surcharge hépatique en fer

Le variant *HIF1A* : c.1744C>T (Phe582Ser ; rs11549465) entraînerait une surcharge en fer plus sévère chez les patients C282Y homozygotes, et les cellules transfectées avec ces variants montrent une baisse du taux d'hepcidine<sup>129</sup>. Il a été retrouvé chez un seul patient (#9), qui a une surcharge hépatique en fer avérée (CHF = 100 $\mu\text{mol/g}$ ). Le variant p.Ala588Thr (rs11549467) du même gène n'a été retrouvé chez aucun patient, il est cependant très rare.

Le variant *HAMP* : c.-582A>G serait possiblement associé à une augmentation de la concentration hépatique en fer chez les patients  $\beta$ -thalassémiques<sup>141</sup>. Il a été retrouvé chez 6 patients à l'état hétérozygote. Parmi eux, la moitié présente une surcharge en fer hépatique, mais nous ne mettons pas en évidence de différence significative de la CHF entre les patients hétérozygotes et homozygotes sauvages.



## 2) Recherche de variants non rares sous ou surreprésentés dans notre cohorte

Afin de mettre en évidence des variants non rares mais potentiellement impliqués dans le développement d'une surcharge en fer, nous avons écrit un script sur Rstudio® (Annexe 1) qui nous a permis d'obtenir une liste de 973 variants présents sur les gènes d'intérêts, avec, pour chaque variant :

- Le nombre de fois où l'allèle est retrouvé :
  - dans la population de patients sphérocytaires
  - dans la population témoin
  - dans la population générale (nombre théorique)
- La valeur de la p-value des différents tests statistiques :
  - Population sphérocytaire versus population générale
  - Population témoin versus population générale
  - Population sphérocytaire versus population témoin

Nous avons ensuite trié les variants d'intérêt selon le schéma suivant :

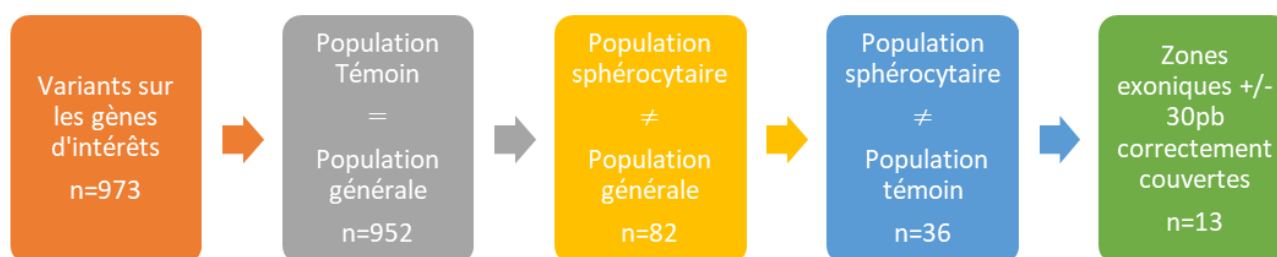


Figure 14 : Sélection des variants non rares potentiellement impliqués dans le développement d'une surcharge en fer. Elimination des artéfacts (gris), conservation des variants dont le nombre d'allèle diffère entre les patients sphérocytaires et la population générale (jaune) et la population témoin (bleu) (p-value <0.1), puis sélection des variants exoniques +/- 30 pb qui satisfont aux critères de validation.

Nous obtenons la liste des 13 variants suivants :

						p-value (Chi <sup>2</sup> ou Test de Fisher)		
		Fréquence allélique dans la population	Nombre d'allèles sphérocytaires	Nombre d'allèles (témoins)	Nombre d'allèles attendus	Sphérocytaires vs attendu	Sphérocytaires vs Témoins	Commentaires
GLRX5	c.436G>A	0,083	9	1	2	0,044	0,015	Score MPA = 5 (low missense)
HFE	c.187C>G	0,073	8	1	2	0,081	0,025	H63D
SPTA1	c.5572C>G	0,228	14	7	6	0,051	0,098	α-lely
	c.6531-12C>T	0,228	14	7	6	0,051	0,098	
	c.6549-12G>A	0,491	24	16	14	0,010	0,038	
	c.6794T>C	0,506	24	16	14	0,010	0,038	
	c.7095A>G	0,505	24	17	14	0,010	0,070	
SPTB	c.1316G>A	0,467	6	15	13	0,090	0,027	Score MPA = 0
	c.3451A>G	0,469	4	11	13	0,020	0,070	
	c.4860T>C	0,478	4	11	13	0,020	0,070	
	c.4002+26T>C	0,631	4	14	18	0,000	0,010	
	c.1269G>A	0,281	2	12	8	0,081	0,005	

Tableau 15 : Variants pour lesquels le nombre d'allèles diffère significativement chez les patients sphérocytaires par rapport à la population générale et témoin



Grâce à 2 autres scripts écrits sur Rstudio®, nous avons également comparé pour chacun des variants le nombre observé de patients homozygotes et hétérozygotes au nombre attendu dans la population générale et observé dans la population témoin, en suivant la même procédure de sélection des variants.

Nous retrouvons les 4 variants suivants : (1 homozygote et 3 hétérozygotes)

							p-value (Chi² ou Test de Fisher)		Commentaires
			Fréquence allélique dans la population	Nombre de patients sphérocytaires	Nombre de Témoins	Nombre attendu	Sphérocytaires vs attendus	Sphérocytaires vs témoins	
SPTA1	c.6549-12G>A	Homozygotes	0,491014	10	4	3	0,021	0,057	α-lely
GLRX5	c.436G>A	Hétérozygotes	0,0830671	7	1	1	0,033	0,033	Score MPA = 5 (low missense)
TMPRSS6	c.1083G>A		0,312899	9	3	3	0,054	0,054	Score MPA = 0
KIF23	c.152C>T		0,0259585	4	0	0	0,098	0,098	Score MPA = 7 (moderate missense)

Tableau 16 : Variants pour lesquels le nombre de patients homozygotes ou hétérozygotes diffère significativement chez les patients sphérocytaires par rapport à la population générale et témoin

#### Recherche de génotypes rares :

Enfin, nous avons recherché chez nos patients sphérocytaires des génotypes rares, c'est-à-dire des variants pour lesquels le nombre attendu de patients homozygotes dans la population générale est proche de 0. Nous obtenons la liste des 8 variants suivants :

				Fréquence allélique dans la population	Nombre de patients sphérocytaires	Nombre de Témoins	Nombre attendu	Interprétation
BMP6	c.1062C>T	Homozygotes		0,039	1	0	0	Score MPA = 0
HEPH	c.1875+12G>T			0,000	1	0	0	
PIEZO1	c.1297-14T>C			0,091	1	0	0	
	c.6678C>T			0,023	1	0	0	#11 : disomie uniparentale ?
	c.6390G>A			0,036	1	0	0	
	c.1013C>A			0,038	1	0	0	
HFE	c.187C>G			0,073	2	0	0	H63D
GLRX5	c.436G>A			0,083	1	0	0	Score MPA = 5 (low missense)

Tableau 17 : Variants pour lesquels un patient sphérocytaire au moins est porteur d'un génotype rare.

#### Au total :

- 2 variants connus sont significativement plus représentés chez nos patients par rapport à la population générale et témoin :

- 2 des 3 allèles de l'haplotype α<sup>LELY</sup>, (c.5572C>G et c.6531-12C>T) sont retrouvés 14 fois contre 6 attendus. Le 3ème variant de cet haplotype (c.6549-12G>A) est retrouvé encore plus fréquemment (24 fois), et semble appartenir au même haplotype que les 2 derniers variants retrouvés (c.6794T>C et c.7095A>C).

- Le variant *HFE* : (c.187C>G) H63D est retrouvé 8 fois, contre 2 attendu, et chez 2 patients à l'état homozygote contre aucun attendu. On ne retrouve cependant pas de différence significative concernant la ferritinémie, le CST et la CHF entre les patients homozygotes sauvages, hétérozygotes et homozygotes mutés.

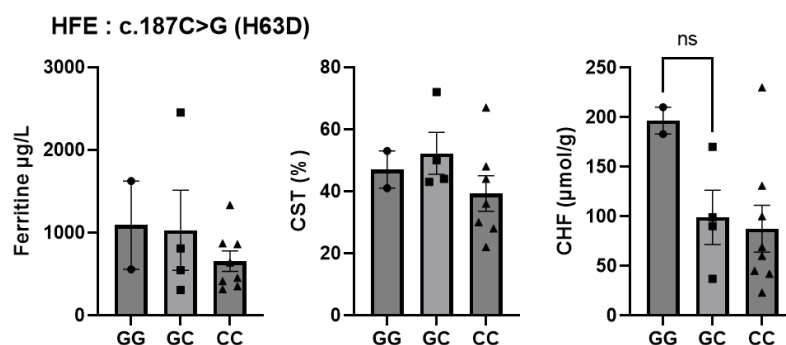


Figure 15 : Variation de la ferritinémie, du CST et de la CHF en fonction des génotypes *HFE* H63D.

- Des variants significativement plus exprimés dans notre échantillon de patients que dans la population générale et témoin ont également été retrouvés dans 3 autres gènes :

- GLRX5* : le variant c.436G>A est présent sur un acide aminé très conservé et, bien que l'écart physico-chimique entre l'AA muté et sauvage soit faible, certains logiciels de prédiction lui attribuent un effet pathogène. On retrouve 9 fois cet allèle dans notre population, contre 2 attendus, et on retrouve un patient homozygote (#1), porteur d'un génotype rare.

- TMPRSS6* : le variant c.1083G>A, est un variant synonyme, présent sur un nucléotide non conservé, sans effet prédit sur l'épissage et donc probablement bénin.

- KIF23* : le variant c.152C>T est retrouvé chez 4 patients à l'état hétérozygote, soit significativement plus que le nombre attendu, et il pourrait potentiellement avoir un effet. En effet, il est présent sur un acide aminé très conservé, l'écart physico-chimique entre l'AA muté et sauvage est modéré et 4 des 9 logiciels de prédiction lui attribuent un effet pathogène.

- Plusieurs variants du gène *SPTB* sont moins fréquents chez nos patients, mais ils semblent n'avoir aucun impact sur la protéine selon les logiciels de prédiction.

Nous avons également retrouvé d'autres variants pour lesquels l'un des patients présente un génotype rare :

- Les variants *ALAS2* : c.1438-16T>G, *BMP6* : c.1062C>T, *HEPH* : c.1875+12G>T et *PIEZO1* : c.1297-14T>C ne sont considérés pathogènes par aucun des logiciels de prédiction (MPA=0). Ils ne devraient donc pas modifier le phénotype des patients qui les portent à l'état homozygote.
- Les variants rares *PIEZO1* : c.6678C>T, c.6390G>A et c.1013C>A sont retrouvés à l'état homozygote chez un même patient (#11). Ces résultats nous ont fait suspecter une délétion de *PIEZO1*, qui n'a pas été retrouvée lors de l'analyse de CNV. Il est probable que ce patient soit porteur d'une disomie uniparentale de ce gène.

## V. Résumé des anomalies moléculaires retrouvées chez les patients sphérocytaires

Patient	Age au moment de la CHF (sexe)	CHF (μmol/g)	Globules rouges					Fer			Autre	
			Variants rares		Variants + fréquents			Variants rares	Variants fréquents			
			Gène causal	Autres	α-lely	GLRX5 c.436G>A	KIF23 c.152C>T		+ fréquent HFE (H63D)	Aggravant la CHF		
										HIF1A c.1744C>T		HAMP c.-582A>G
2	34 (F)	23	<i>ANK1</i>	<i>ANK1 + SPTB</i>								
4	27 (M)	37	<i>SPTA1</i>									
11	59 (F)	42	<i>ANK1</i>	UPD de <i>PIEZO1</i> ?							Reconversion médullaire	
6	23 (M)	45	<i>SPTB</i>	<i>KIF23</i>				<i>SLC40A1 + CP</i>			Reconversion médullaire	
14	75 (F)	60	<i>ANK1</i>									
1	41 (F)	69	<i>ANK1</i>								Surcharge en fer (oncles)	
5	50 (M)	90	<i>ANK1</i> ?					<i>HJV</i>				
8	39 (M)	99	<i>ANK1</i>									
9	41 (M)	100	<i>SLC4A1</i>	<i>PKLR</i>								
12	68 (M)	131	<i>SLC4A1</i>									
7	25 (M)	170	<i>SPTB</i>	<i>ABCG5</i>								
3	54 (M)	183		<i>PKLR</i>								
10	48 (M)	210	<i>SPTA1</i> ?	<i>PIEZO1 + ANK1</i>				<i>ABCB8</i>				
13	69 (F)	230	<i>SPTB</i>									

Tableau 18 : Résumé de l'ensemble des anomalies moléculaires retrouvées chez les 14 patients.

Les femmes sont notées (F) et les hommes (M). Les anomalies très probablement pathogènes sont en rouge et les variants de signification incertaine en noir. L'ensemble des variants rares sont retrouvés à l'état hétérozygote. La case correspondant aux variants fréquents est colorée en grise si le variant est retrouvé à l'état hétérozygote et en noir lorsqu'il est présent à l'état homozygote.

## DISCUSSION

Notre travail fait suite à une étude de cohorte rétrospective réalisée au CHU de Montpellier, qui comprend 141 patients atteints de sphérocytose héréditaire. Nous avons sélectionné 14 patients sphérocytaires de plus de 18 ans qui présentent une hyperferritinémie chronique et pour lesquels de l'ADN était disponible, afin de rechercher des facteurs génétiques de surcharge en fer par séquençage haut débit.

Le développement d'une surcharge martiale chez certains patients sphérocytaires pourrait avoir plusieurs explications génétiques : elle pourrait être reliée à des formes cliniques particulières de SH, ou bien être causée par un déséquilibre du métabolisme du fer. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié à la fois les gènes impliqués dans des anomalies du globule rouge et les gènes impliqués dans le métabolisme du fer.

***La première partie de notre travail a donc consisté à étudier les gènes impliqués dans des anomalies du globule rouge.***

***Nous avons tout d'abord cherché à confirmer d'un point de vue moléculaire le diagnostic de sphérocytose.***

En effet, le diagnostic différentiel phénotypique avec d'autres pathologies érythrocytaires peut parfois être difficile, et certaines de ces autres pathologies sont plus fréquemment associées à une hyperferritinémie voire à une surcharge en fer.

Ainsi, le diagnostic de sphérocytose a été confirmé formellement chez 11 des 14 patients (Tableau 10), pour lesquels le diagnostic phénotypique était déjà fortement en faveur d'une sphérocytose. En revanche, les anomalies moléculaires retrouvées sur 2 des patients n'ont pas permis de confirmer le diagnostic : le patient #5, chez lequel l'ektacytométrie n'avait pas permis de conclure à une sphérocytose, présente un variant faux sens de *ANK1*. Cependant, ce type de variant étant plus rarement responsable de sphérocytose héréditaire, une étude de la ségrégation devra être réalisée avant de conclure au caractère pathogène du variant. Le patient #10 possède quant à lui un variant pathogène sur *SPTA1* associé à l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  hétérozygote, sans que l'on puisse affirmer s'il est présent en trans ou en cis, ainsi qu'un variant de signification incertaine sur le gène *ANK1*. Enfin, aucune anomalie moléculaire des gènes impliqués dans la sphérocytose héréditaire n'a été retrouvé chez le patient #3, pour lequel seul le pink test était positif.

L'association de l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  en trans d'un variant situé en N-terminal de *SPTA1* est associée à un diagnostic d'elliptocytose sévère. En revanche, lorsque l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  est associé à un variant localisé sur le reste de la protéine, comme c'est le cas chez le patient #4, il a longtemps été considéré que ce génotype n'induisait pas de sphérocytose. En effet, la présence résiduelle de 25% de spectrine  $\alpha$  suffirait à la formation correcte du cytosquelette érythrocytaire<sup>171</sup>. Cependant, une étude récente portant sur 2 familles contredit cette affirmation, et suggère que la présence de l'allèle  $\alpha^{\text{LELY}}$  pourrait aggraver légèrement le phénotype des patients

porteurs d'un variant unique de *SPTA1*, en augmentant le taux de réticulocytes, la fragilité osmotique et en diminuant le taux d'hémoglobine<sup>172</sup>. Notre étude semble également confirmer l'implication de cet allèle chez un patient au moins. A noter que nous retrouvons également cet allèle de façon plus fréquente chez nos patients que dans la population générale.

Bien que l'objectif premier de notre étude soit l'étude des facteurs génétiques pouvant expliquer le développement d'une surcharge chez les patients, les résultats obtenus nous ont également permis de **comparer les données de la littérature concernant le lien entre le génotype et le phénotype des patients**.

Par exemple, plusieurs études affirment qu'il existe un lien entre les anomalies morphologiques retrouvées sur le frottis et le gène muté<sup>173</sup>. Ainsi, la présence de *mushroom cells* serait associée à des anomalies moléculaires du gène *SLC4A1*, cependant, les trois patients chez lesquels ils ont été retrouvés dans notre série portent des anomalies des gènes *ANK1* et *SPTA1*, et il n'en a pas été décrit chez les 2 patients porteurs d'anomalies de *SLC4A1*. D'autres études stipulent que la seule anomalie morphologique retrouvée chez les patients porteurs d'anomalies moléculaires de *ANK1* sont des sphérocytes. Chez nos patients, certains présentent également des stomatocytes et des *mushroom cells*. Les acanthocytes sont quant à eux décrits en présence d'anomalies moléculaires du gène *SPTB*, or nous en retrouvons chez un patient qui porte une anomalie de *ANK1*. Il faudrait cependant réaliser une nouvelle étude du frottis sanguin chez ce patient afin de s'assurer que les conditions pré-analytiques avaient été respectées. En effet, des acanthocytes peuvent être retrouvés chez un individu sain si l'étude du frottis sanguin a été réalisée trop longtemps après le prélèvement. Enfin, les stomatocytes sont décrits en présence d'anomalies *EPB42*, et nous en avons retrouvé chez des patients porteurs d'anomalies moléculaires de *ANK1* et *SLC4A1*. Au vu de ces résultats, les anomalies morphologiques des globules rouges ne semblent pas pouvoir orienter vers une anomalie moléculaire spécifique.

Un lien entre la position du variant pathogène *ANK1* dans la protéine et le taux d'hémoglobine a également été décrit. Les patients présenteraient un taux significativement plus bas lorsque le variant pathogène est localisé sur le domaine de liaison à la spectrine<sup>23</sup>, cependant, 3 de nos patients ont des anomalies de *ANK1* dans ce domaine et aucun ne présente d'anémie.

Enfin, il existerait un lien la négativité du test à l'EMA et la présence d'anomalies de *ANK1*<sup>174</sup> : les 2 patients ayant un diagnostic de sphérocytose et un test EMA négatif avaient effectivement des anomalies moléculaires sur le gène *ANK1*, l'un étant porteur d'un variant potentiellement pathogène sur *ANK1* et l'autre d'un variant de signification incertaine de *ANK1* et un variant pathogène de *SPTA1*.

Ainsi, nos résultats suggèrent que les relations entre le génotype et le phénotype ne sont pas toujours aussi évidentes que rapporté dans la littérature. D'autres facteurs, tels que des facteurs pré-analytiques ou acquis, doivent jouer un rôle.

Une fois les anomalies moléculaires responsables de la sphérocytose identifiées chez nos patients, ***nous avons cherché à savoir s'il pouvait y avoir un lien entre l'anomalie moléculaire responsable de la SH et le développement d'une surcharge en fer.*** En effet, certains auteurs ont supposé que le développement d'une telle surcharge pourrait être liée à des formes particulières de sphérocytose, qui présentent une composante dysérythroïétique<sup>5</sup>. Cette hypothèse est étayée par l'existence de cas décrits d'hyperplasie de la moelle, mises en évidence par la découverte de masses érythroïétiques extramédullaires<sup>157,158</sup>. Nous avons cherché à savoir si la présence d'anomalies moléculaires dans certains gènes en particulier pouvait expliquer le développement d'une hyperferritinémie ou d'une surcharge en fer chez les patients. Nous n'avons pas mis en évidence de surreprésentation d'un type particulier d'anomalie moléculaire chez les patients avec hyperferritinémie, ni chez les patients avec surcharge en fer. Ainsi, bien que nos effectifs soient faibles, nos résultats suggèrent que le développement d'une surcharge en fer chez une partie des patients sphérocytaires n'est pas dépendante de l'anomalie responsable de la sphérocytose.

***Dans un deuxième temps, il a été nécessaire d'exclure d'autres pathologies du globule rouge*** au cours desquelles des anomalies du métabolisme du fer sont également retrouvées, telles que les dysérythroïèses congénitales ou les anémies sidéroblastiques. Aucun variant retrouvé dans les gènes impliqués dans le développement de ces pathologies n'a permis de reclasser les 3 patients pour lequel le diagnostic moléculaire était incertain. Cependant, nous avons retrouvé dans notre cohorte deux variants possiblement pathogènes qui pourraient moduler le phénotype des patients.

En effet, nous retrouvons chez le patient #7 un variant pathogène de *ABCG5*, déjà décrit chez un patient atteint de sitostérolémie en présence d'un autre variant en trans. La sitostérolémie, de transmission autosomique récessive, est caractérisée par une hémolyse et des troubles hépatiques. Dans la littérature, aucun cas de patient sphérocytaire porteur d'un variant pathogène hétérozygote de *ABCG5* n'a été décrit, cependant, on peut émettre l'hypothèse que la présence de ce variant puisse jouer un rôle dans le développement d'une surcharge en fer chez notre patient, qui présente une forte surcharge hépatique en fer (CHF = 170 µmol/g).

De plus, et de façon intéressante, nous avons retrouvé un variant potentiellement pathogène de *KIF23* chez le patient #6, qui présente une reconversion médullaire. Les anomalies de *KIF23*, qui peuvent être dominantes ou récessives, sont à l'origine d'anémies dysérythroïétiques congénitales de type III, dont les manifestations cliniques sont très variables en fonction des individus, mais peuvent comprendre une anémie, un ictère ou une hyperplasie érythroïde. On peut émettre l'hypothèse que ce variant puisse être impliqué dans la manifestation clinique, relativement rare, retrouvée chez ce patient. A noter également que le polymorphisme *KIF23* : c.152C>T, présent chez 2% de la population générale, est un des rares polymorphismes à avoir été retrouvé significativement plus fréquemment dans notre échantillon de patients par rapport à la population générale. Ce variant semble potentiellement pathogène (score MPA à 7), et nous pouvons suggérer que sa présence modifie le phénotype chez les patients sphérocytaires.

Pour finir, un polymorphisme de *GLRX5*, présent chez 8 % de la population, a été retrouvé de façon plus fréquente chez nos patients sphérocytaires avec hyperferritinémie par rapport à la population générale. Ce gène code pour une protéine mitochondriale impliquée dans l'homéostasie du fer, et est retrouvé muté dans des formes rares d'anémies sidéoblastiques, au cours desquelles une surcharge en fer hépatique est souvent retrouvée. Bien que la fréquence de ce variant soit élevée, certains logiciels de prédiction de pathogénicité lui attribuent un effet pathogène. De façon intéressante, un patient (#1) porte ce variant à l'état homozygote (génotype rare) et des surcharges en fer ont été décrites dans sa famille, sans que l'on ne retrouve chez lui d'anomalie moléculaire responsable de surcharge en fer. De la même manière que le polymorphisme retrouvé sur *KIF23*, il est possible qu'il participe au développement d'une hyperferritinémie chez nos patients. Pour le vérifier, il serait intéressant de réaliser une étude de la ségrégation familiale ainsi que de comparer la fréquence de ces polymorphismes entre les patients avec et sans hyperferritinémie.

**Enfin, nous avons également recherché chez les patients la présence d'une enzymopathie associée.** En effet, les dosages enzymatiques n'ont pas été effectués pour la grande majorité des patients, et l'association de ces anomalies peut majorer l'hémolyse et ainsi modifier le phénotype des patients, notamment l'apparition d'une surcharge en fer. Nous ne retrouvons aucun variant pouvant entraîner un déficit en *G6PD*, mais nous retrouvons 2 variants de *PKLR*. Le premier, considéré pathogène, est retrouvé chez le patient #3 à l'état hétérozygote, et, bien que les anomalies hétérozygotes de ce gène ne soient pas classiquement associées à des déficits, le dosage enzymatique chez ce patient retrouvait une diminution du dosage de la pyruvate kinase. On sait que les réticulocytes déficients en pyruvate kinase sont séquestrés dans la rate<sup>175</sup>, tout comme les globules rouges sphérocytaires. Il est possible que ces 2 mécanismes s'additionnent, aggravant l'hémolyse, la stimulation de l'érythropoïèse et l'absorption intestinale de fer<sup>145</sup>. Cependant, aucune anomalie moléculaire n'ayant été retrouvée sur les gènes impliqués dans la sphérocytose chez ce patient, qui présente de plus un phénotype particulier, il serait intéressant de réaliser une étude de son exome pour mieux comprendre son phénotype. Le deuxième variant de *PKLR* que nous avons retrouvé est classé de signification incertaine. Il a été retrouvé chez le patient #9, chez lequel le dosage enzymatique n'a pas été réalisé. Dans la littérature, la présence de ce même variant chez un patient sphérocytaire a déjà été décrite, et les auteurs ont conclu qu'il ne modulait pas l'expression clinique de la sphérocytose<sup>176</sup>. Cependant, l'association d'un variant de *PKLR* à une sphérocytose a été décrite chez d'autres patients, et, bien que plusieurs auteurs soient arrivés à la même conclusion<sup>177</sup>, d'autres ont conclu que la présence d'un variant *PKLR* hétérozygote pourrait aggraver l'expression phénotypique lorsqu'il est associé à un déficit en protéine Bande 3, par aggravation du déficit en ATP<sup>178</sup>. Notre patient est effectivement porteur d'une anomalie moléculaire de *SLC4A1*, codant pour la protéine bande 3, à la différence du patient décrit dans la littérature avec le même variant, pour lequel l'anomalie génétique responsable n'avait pas été recherchée mais chez lequel un déficit en protéine 4.2 avait été mis en évidence. Ces résultats suggèrent que l'association d'un variant pathogène hétérozygote de *PKLR* pourrait aggraver le phénotype des patients sphérocytaires de façon proportionnelle au déficit en bande 3. Les 2 patients concernés présentent en effet une surcharge en fer significative (CHF = 183 et 100  $\mu\text{mol/g}$ ).

**La deuxième partie de notre travail a consisté à rechercher des anomalies moléculaires sur les gènes impliqués dans le métabolisme du fer.**

**Nous avons tout d'abord étudié les gènes impliqués dans des formes classiques d'hémochromatose héréditaire.** Notre étude est à ce jour la plus grande réalisée sur des patients sphérocytaires avec surcharge, une seule étude sur 5 patients ayant été réalisée auparavant, sans retrouver d'anomalie<sup>148</sup>. **Nous avons également étudié les gènes impliqués dans des surcharges en fer rares,** qui n'ont encore jamais été étudiés chez ces patients.

Nous ne retrouvons aucun variant pathogène sur le gène *HFE*, qui est le gène le plus souvent responsable d'hémochromatose héréditaire. En revanche, nous retrouvons dans notre population le variant H63D de façon plus fréquente que dans la population générale et témoin, et, bien que ce variant soit légèrement plus fréquent dans le sud de la France, nous retrouvons 2 patients homozygotes sur 14 (14%) alors que seuls 3% de la population générale dans notre région est porteuse de ce génotype<sup>179</sup>. Ces deux patients homozygotes ont de plus une surcharge hépatique significative. La pathogénicité de ce variant a longtemps été discuté, et on sait aujourd'hui qu'il est rarement associé à une surcharge en fer à l'état isolé<sup>90</sup>, cependant, il a été démontré que la protéine *HFE* H63D mutée diminuerait moins l'affinité du récepteur Tfr1 pour la transferrine que la protéine sauvage<sup>180</sup>. Bien que la présence de ce variant ne semble pas à elle seule pouvoir expliquer la variabilité des taux de ferritine et de CST chez nos patients, on peut penser que sa présence chez les patients sphérocytaires pourrait aggraver le développement d'une surcharge martiale.

En revanche, nous avons retrouvé trois variants potentiellement pathogènes sur les autres gènes impliqués des formes de surcharge en fer.

Tout d'abord, nous retrouvons un variant potentiellement pathogène sur *HJV*, chez le patient #5. Le mode de transmission des surcharges en fer liées au gène *HJV* est autosomique récessif : la présence de ce variant à l'état hétérozygote n'explique pas la survenue d'une surcharge en fer. Mais, chez notre patient, il est associé à une sphérocytose et au variant *HFE* H63D à l'état hétérozygote. Ainsi, on peut s'interroger sur son implication dans le développement d'une surcharge en fer chez ce patient (CHF = 90µmol/g).

Ensuite, nous avons également retrouvé chez le patient #6 un variant sur le gène *SLC40A1*, impliqué dans la sidérose des Bantous, également appelée « hémochromatose africaine »<sup>181</sup>. Cette pathologie a été initialement reliée à la consommation d'une bière traditionnelle très riche en fer, cependant, un terrain génétique de susceptibilité était probable. Le variant responsable est fréquent dans la population Africaine et Africano-américaine (8%), mais il a été démontré que les individus porteurs de ce polymorphisme à l'état hétérozygote, et principalement les hommes, ont une ferritine sérique significativement plus élevée que les autres. Certaines études ont également montré une réduction de la capacité d'efflux de fer de la protéine mutée<sup>182</sup>. D'autres ont démontré que ce mutant aurait une sensibilité diminuée à l'action de l'hepcidine<sup>183</sup>. Il en a été conclu que ce variant pourrait avoir un léger effet sur la fonction de la ferroportine et conduire à une



surcharge en fer en présence de facteurs modificateurs. On peut raisonnablement penser que sa présence chez un patient porteur de sphérocytose héréditaire puisse participer à l'augmentation de la ferritinémie. Le patient concerné n'a pas de surcharge hépatique significative, bien qu'il soit encore jeune (23 ans). Nous avons de plus retrouvé chez ce même patient un variant potentiellement pathogène du gène *CP*. Dans la littérature, on retrouve que les variants perte de fonction de ce gène pourraient induire une rétention cellulaire du fer, entraînant une surcharge progressive d'une part et une érythropoïèse restreinte d'autre part<sup>184</sup>. Bien que les formes liées à ce gène soient récessives, la découverte de ce variant est intéressante car, tout comme le variant mis en évidence sur *KIF23*, et bien qu'hypothétique, il pourrait jouer un rôle dans le développement de la reconversion médullaire des genoux présente chez ce patient.

Enfin, cette étude est la seule à s'être appliquée à ***rechercher des anomalies moléculaires dans des gènes du métabolisme du fer jamais décrits mutés chez l'homme***, mais pour lesquels des effets sur la surcharge en fer ont été montrés, notamment chez les animaux. Ainsi, nous avons retrouvé un variant probablement pathogène de *ABCB8* chez le patient #10, qui présente la deuxième plus forte surcharge en fer de notre cohorte. Ce gène code pour un transporteur présent à la surface de la membrane interne des mitochondries et impliqué dans l'export du fer. Il a été démontré chez la souris que la perte de fonction de ce gène entraîne une accumulation de fer<sup>185</sup>, cependant, aucun variant pathogène n'a été décrit chez l'homme. On peut émettre l'hypothèse que sa présence, associée au variant H63D à l'état homozygote, puisse expliquer la surcharge en fer importante développée par ce patient (CHF = 210µmol/g).

## CONCLUSION

Notre étude est la première à s'être intéressée à la fois aux gènes impliqués dans les anomalies des globules rouges et à ceux impliqués dans le métabolisme du fer pour rechercher une explication génétique au développement d'une surcharge en fer chez certains patients sphérocytaires.

Ainsi, nous avons tout d'abord pu écarter la présence d'un lien direct entre le gène et ou les variants responsables de la sphérocytose et le développement d'une telle surcharge. Ensuite, nous avons montré que ce phénotype de surcharge en fer n'est pas lié dans notre série à la présence des anomalies génétiques classiquement à l'origine d'une hémochromatose génétique. En revanche, nous avons mis en évidence des facteurs génétiques qui pourraient possiblement contribuer au développement d'une surcharge hépatique en fer chez 5 des 8 patients concernés (63%). Nous retrouvons chez 3 patients la présence d'anomalies moléculaires qui pourraient majorer l'hémolyse et conduire à l'apparition d'une surcharge en fer (2 variants du gène *PKLR*, et un variant du gène *ABCG5*). Les 2 autres patients portent des anomalies moléculaires sur des gènes du métabolisme du fer, qui pourraient conduire à son déséquilibre (un variant du gène *ABCB8*, et un du gène *HJV*). Cependant, nous ne retrouvons pas d'explication pour 3 des 8 patients avec surcharge en fer (37%), ce qui suggère la coexistence probable d'autres causes de surcharges chez ces patients. L'utilisation croissante des techniques NGS élargira probablement nos connaissances et permettra une meilleure caractérisation de l'hétérogénéité clinique observée chez ces patients.

## ANNEXES

```

setwd(dir="C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/All")
dir()
liste_dossier <- dir("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/All")
tb1 <- read.delim("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/1.txt",header=TRUE,sep="\t",stringsAsFactors = FALSE, row.names = NULL)
ligne <- tb1[1,]
tableaufiltre2 <- ligne[,""]
i <- NULL
for (i in 1:length(liste_dossier))
{tableaufiltre <- read.delim(sprintf("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/All/%s",liste_dossier[i]),header=TRUE,sep="\t", stringsAsFactors = FALSE)
tableaufiltre[,1] <- liste_dossier[i]
tableaufiltre[,1] <- sub("(O.txt)", "\\1",liste_dossier[i])
tableaufiltre2 <- merge.data.frame(tableaufiltre2,tableaufiltre, all = TRUE)
write.table(tableaufiltre2,"C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/Touslespatientsphero",sep="\t")
tableaufiltre2$VAF <- sub("(.)%(.*)" "\\1",tableaufiltre2$Coverage)
tableaufiltre2$VAF <- sub("(.)%(.*)" "\\1",tableaufiltre2$VAF)
tableaufiltre2$VAF <- sub("(.)%(.*)" "\\1",tableaufiltre2$VAF)
tableaufiltre2$VAF <- as.numeric(tableaufiltre2$VAF)
tableaufiltre2 <- subset(tableaufiltre2,tableaufiltre2$VAF > 30)
tableaufiltre2$Index <- sub("(.)h", "\\2",tableaufiltre2$Nuc.Change)
homozygotes <- subset(tableaufiltre2,tableaufiltre2$Index != "et")
tableaufiltre3 <- rbind(tableaufiltre2,homozygotes, all = TRUE)
dd <- tableaufiltre3[,c(2,14,51)]
dd[is.na(dd)] <- ""
tttt <- aggregate(1:nrow(dd),dd,length)
write.table(tttt,"C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/nombredefoischaquevariantsphero",sep="\t")
setwd(dir="C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/All_VII")
dir()
liste_dossier <- dir("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/All_VII")
tb1 <- read.delim("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/1.txt",header=TRUE,sep="\t",stringsAsFactors = FALSE, row.names = NULL)
ligne <- tb1[1,]
tableaufiltre2 <- ligne[,""]
i <- NULL
for (i in 1:length(liste_dossier))
{tableaufiltre <- read.delim(sprintf("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/All_VII/%s",liste_dossier[i]),header=TRUE,sep="\t", stringsAsFactors = FALSE)
tableaufiltre[,1] <- liste_dossier[i]
tableaufiltre[,1] <- sub("(O.txt)", "\\1",liste_dossier[i])
tableaufiltre2 <- merge.data.frame(tableaufiltre2,tableaufiltre, all = TRUE)
write.table(tableaufiltre2,"C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/TouslespatientsVII",sep="\t")
tableaufiltre2$VAF <- sub("(.)%(.*)" "\\1",tableaufiltre2$Coverage)
tableaufiltre2$VAF <- sub("(.)%(.*)" "\\1",tableaufiltre2$VAF)
tableaufiltre2$VAF <- sub("(.)%(.*)" "\\1",tableaufiltre2$VAF)
tableaufiltre2$VAF <- as.numeric(tableaufiltre2$VAF)
tableaufiltre2 <- subset(tableaufiltre2,tableaufiltre2$VAF > 30)
tableaufiltre2$Index <- sub("(.)h", "\\2",tableaufiltre2$Nuc.Change)
homozygotes <- subset(tableaufiltre2,tableaufiltre2$Index != "et")
tableaufiltre3 <- rbind(tableaufiltre2,homozygotes, all = TRUE)
dd <- tableaufiltre3[,c(2,14,51)]
dd[is.na(dd)] <- ""
tttt <- aggregate(1:nrow(dd),dd,length)
write.table(tttt,"C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/nombredefoischaquevariantVII",sep="\t")
tb1 <- read.delim("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/nombredefoischaquevariantsphero",header=FALSE,sep="\t",stringsAsFactors = FALSE, row.names = NULL)
tb2 <- read.delim("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/nombredefoischaquevariantVII",header=FALSE,sep="\t",stringsAsFactors = FALSE, row.names = NULL)
www <- merge(tb1,tb2,by=c("V2","V3","V4"),all.x = TRUE,all.y = TRUE)
write.table(www,"C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/commun",sep="\t")
table <- read.delim("C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/commun",header=TRUE,sep="\t",stringsAsFactors = FALSE, row.names = NULL)
i <- NULL
for (i in 1:nrow(table))
{ x <- table$NOMBRE.CHEZ.SPHERO[i]
x <- as.numeric(x)
y <- 28-x
w <- table$nombre.chez.VII[i]
w <- as.numeric(w)
z <- 28-w
mytable <- as.table(rbind(c(x,y), c(w,z)))
mytable2 <- as.table(rbind(c(x,y), c(w,z)))
test <- chisq.test(mytable)
testf <- fisher.test(mytable)
mytable2 <- test$expected
if(mytable2[1,1]>=5 & mytable2[2,1]>=5 & mytable2[1,2]>=5 & mytable2[2,2]>=5)
{table$DIFFERENCE.VII.et.sphero[i] <- test$p.value } else { table$DIFFERENCE.VII.et.sphero[i] <- testf$p.value}
i <- NULL
for (i in 1:nrow(table))
{ x <- table$NOMBRE.CHEZ.SPHERO[i]
x <- as.numeric(x)
y <- 28-x
w <- table$nombre.theorique.arrondi[i]
w <- as.numeric(w)
z <- 28-w
mytable <- as.table(rbind(c(x,y), c(w,z)))
mytable2 <- as.table(rbind(c(x,y), c(w,z)))
test <- chisq.test(mytable)
testf <- fisher.test(mytable)
mytable2 <- test$expected
if(mytable2[1,1]>=5 & mytable2[2,1]>=5 & mytable2[1,2]>=5 & mytable2[2,2]>=5)
{table$DIFFERENCE.SPHERO.THEORIE[i] <- test$p.value } else { table$DIFFERENCE.SPHERO.THEORIE[i] <- testf$p.value}
i <- NULL
for (i in 1:nrow(table))
{ x <- table$nombre.chez.VII[i]
x <- as.numeric(x)
y <- 28-x
w <- table$nombre.theorique.arrondi[i]
w <- as.numeric(w)
z <- 28-w
mytable <- as.table(rbind(c(x,y), c(w,z)))
mytable2 <- as.table(rbind(c(x,y), c(w,z)))
test <- chisq.test(mytable)
testf <- fisher.test(mytable)
mytable2 <- test$expected
if(mytable2[1,1]>=5 & mytable2[2,1]>=5 & mytable2[1,2]>=5 & mytable2[2,2]>=5)
{table$DIFFERENCE.VII.thA.orie[i] <- test$p.value } else { table$DIFFERENCE.VII.thA.orie[i] <- testf$p.value}
write.table(table,"C:/Users/lu_ci/OneDrive/Bureau/genes/stathiomozethzregroupe",sep="\t")

```

**Annexe 1 :** Exemple d’algorithme rédigé sur Rstudio® afin de mettre en évidence des variants non rares plus fréquemment retrouvés dans la population sphérocytaire avec hyperferritinémie que dans la population générale

	Variant	Protéine	Patient(s)	Fréquence GnomAD (%)	MPA		Clinvar	ACMG	
					Score	Impact			
Gènes responsables de sphérocytose héréditaire	ANK1 NM_020476.3	c.-99132G>T	1	0,3	0			1	
		c.1506C>T	p.=	12	0,38	0		Conflicting : VUS*1, likely benign*3, benign*1	2
		c.2830G>A	p.Ala944Thr	6	0,09	3	Low missense	Conflicting : VUS*1, likely benign*1	2
		c.3045C>T	p.=	8	0,01	0		Likely benign*1	1
		c.4385C>T	p.Ala1462Val	7 et 5	2,24	8	Moderate splice	Benign*5, likely benign*1	2
		c.4390+25C>G		8	0,01	0			1
		c.4506C>T	p.=	7 et 5	3	0		Benign*5, likely benign*1	1
	EPB42 NM_000119.3	c.744+7G>A		3 et 8	1,94	0		Benign*3; Likely benign*1	1
		c.1408+4C>T		2	1,64	0		Benign*3; Likely benign*1	1
		c.2009G>A	p.Arg670His	12	0,002	0		VUS*1	2
		c.2055G>A	p.=	6	0,03	0			1
	SPTA1 NM_003126.4	c.679G>A	p.Glu227/Lys Alteration of the consensus splice site	3	0,31	4	Low missense	Conflicting : VUS*2 likely benign*3, benign*1	2
		c.793A>G	p.Asn265Asp	3	0,31	0		Conflicting : VUS*2, Likely benign*3, Benign*1	2
		c.1351-4A>G		12	0,03	0		Conflicting : VUS*3, Likely benign*1	2
		c.2909C>A	p.Ala970Asp	9	3,29	2	Low missense	Conflicting : pathogenic*1, likely benign*2, benign*4	2
		c.3742C>T	p.Arg1248Trp	6	0,17	4	Low missense	VUS*2	2
		c.4453C>T	p.Leu1485Phe	2, 4, et 11	1,95	8	High missense	Conflicting : VUS*2, Benign*1	2
		c.4490G>A	p.Gly1497Glu	8	1,42	2	Low missense	Conflicting : VUS*3, Likely benign*1, Benign*3	2
		c.5118C>T	p.=	3	0,14	0		Conflicting : VUS*2, Likely benign*2, Benign*1	2
		c.5665-24T>C		8	0,92	0		VUS*1	2
c.6672A>C		p.Glu2224Asp	6	0,15	5,71	Low missense	Conflicting : VUS*2, likely pathogenic*1, likely benign*1	2	
c.7068A>C		p.Glu2356Asp	9	0,06	2,86	Low missense	VUS*4	3	
c.*13C>T			11	0	0			1	
Autres gènes impliqués dans des anomalies du globule rouge	ABCB6 NM_005689.4	c.2351+12C>T	6	0,04	0			1	
	ALAS2 NM_000032.5	c.1438-16T>G	4*	1,6	0		Benign*2	1	
	PIEZO1 NM_001142864.4	c.2344G>A	p.Gly782Ser	2	0,41	5	Low missense	Conflicting : VUS*3, Likely benign*2	2
		c.2423G>A	p.Arg808Gln	2	0,41	5	Low missense	Conflicting : VUS*2, Likely benign*3	2
		c.4336-29C>T		13 et 11	0,23	0		Likely benign*2	1
		c.4997C>T	p.Ala1666Val	8	0,08	0		Likely benign*2	1
		c.5195C>T	p.Thr1732Met	4 et 10	1,00	6	Moderate missense	Benign*3; Likely benign*3	2
		c.6219C>T	p.=	14	0,3	6	Low splice	Benign*2, likely benign*1	1
		c.6651C>A	p.=	9	0,64	0		Benign*4	1
		c.7332C>T	p.=	1	1,4	0		Benign*3	1
	c.7041C>T	p.=	5	0,57	0		Benign*3	1	
	PKLR NM_000298.6	c.375+10G>T	14	0,6	0		Benign*3; Likely benign*1	1	
	STOM NM_004099.6	c.716T>C	p.Met239Thr	13	0,14	5	Low missense		2
	CDAN1 NM_138477.4	c.943+29G>C		6	0,05	0			1
		c.1567G>A	p.Val523Ile	6	0,08	1	Low missense	VUS*1	2
		c.157C>T	p.=	1 et 3	0,4	0		Benign*3	1
		c.2948-13C>T		1 et 3	1,2	0		Benign*4	1
KLF1 NM_006563.5	c.115A>C	p.Met39Leu	2	1,4	0		Benign*2	1	
SEC23B NM_032985.6	c.1276G>A	p.Val426Ile	13	1,6	2	Low missense	Benign*6, likely benign*2	1	

Annexe 2 : Liste des variants bénins (ACMG 1 et 2) retrouvés chez les 14 patients sur les gènes responsables de sphérocytose héréditaire et d'autres anomalies constitutionnelles du globule rouge.

\*Homozygote

	Variant	Protéine	Patient(s)	Fréquence GnomAD (%)	MPA		Clinvar	ACMG	
					Score	Impact			
Gènes impliqués dans des surcharges en fer	<b>HJV</b> NM_213653.3	c.98-6C>G		3	1,800	0		Benin*4	1
	<b>TFR2</b> NM_003227.4	c.829G>T	p.Val277Leu	3	0,040	0		VUS*2	2
		c.1770C>T	p.=	12	0,590	6	Low splice	Benin*4	1
		c.2085G>C	p.=	13	0,740	0		Benin*1, Likely bénin*1	1
		c.2255G>A	p.Arg752His	8 et 1	2,140	5	Low missense	Benin*3, Likely bénin*3	1
	<b>BMP6</b> NM_001718.6	c.1029C>T	p.=	1*	1,800	0			1
	<b>CP</b> NM_000096.4	c.1714-20C>T		13	0,005	0		Likely benin*1	1
		c.2925C>T	p.=	11	0,003	0			1
	<b>FTH1</b> NM_002032.3	c.161A>G	p.Lys54Arg	3	0,180	3	Low missense	Benin*1, Likely bénin*5	2
	<b>SLC11A2</b> NM_001174125.2	c.919-3T>C		6	0,200	0		Likely benin*1	1
c.1109A>C		p.His370Pro	1	0,000	3	Low missense		1	
Autres gènes du métabolisme du fer	<b>TFRC</b> NM_003234.4	c.312C>T	p.=	8	0,600	0		Benin*1, Likely bénin*1	1
		c.900+3G>A		13	0,000	0			1
	<b>TF</b> NM_001063	c.1027C>T	p.Arg343Trp	5	0,086	5,0	Low missense	VUS*1	2
	<b>FECH</b> NM_001012515.3	c.723+19G>C		6	0,056	0		Benin*1	1
	<b>ABCB7</b> NM_004299.6	c.1323T>C	p.=	D2475	1	0		Bénin*1, likely bénin*1	1
	<b>ABCB8</b> NM_007188.5	c.564+4C>T		D1466	1,7	0		Bénin*1	1
		c.766-19C>T		D804	1,7	0			1
	<b>ACO1</b> NM_002197.3	c.85G>T	p.Asp29Tyr	HG7984	0,1	5	Low missense		2
		c.1929C>A	p.=	HG7984	0,07	0			1
	<b>HEPH</b> NM_138737.5	c.1875+12G>T		H1878*	0,1	0			1
	<b>HP</b> NM_005143.5	c.112G>A	p.Glu38Lys	D2256	0,3	0		Bénin*1	1
		c.289G>A	p.Glu97Lys	D2256		0			1
	<b>STEAP3</b> NM_182915.3	c.522+28G>A		D1466	0,1	0			1
	<b>TWSG1</b> NM_020648.6	c.485A>G	p.Asp162Gly	D1479		4,44	Low missense		2
c.144G>A		p.=	D804	0,4	0			1	
<b>UROS</b> NM_001324036.2	c.338A>T	p.Asp113Val	D1174	0,4	6	Low splice	Bénin*2	2	

Annexe 3 : Variants bénins (ACMG 1 et 2) retrouvés sur les gènes responsables de surcharges en fer et du métabolisme du fer, chez les 14 patients

## BIBLIOGRAPHIE

1. RESERVED, I. U.-A. R. Orphanet: Hereditary spherocytosis. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=822](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=822).
2. Gascard, P., Choquet, S. & Mohandas, N. Protéine 4.1 : la famille s'agrandit. *Hématologie* **5**, 439–46 (2000).
3. Whitfield, C. F., Follweiler, J. B., Lopresti-Morrow, L. & Miller, B. A. Deficiency of  $\alpha$ -Spectrin Synthesis in Burst-Forming Units-Erythroid in Lethal Hereditary Spherocytosis. *Blood* **78**, 3043–3051 (1991).
4. Friedman, E. W., Williams, J. C. & Van Hook, L. Hereditary spherocytosis in the elderly. *Am J Med* **84**, 513–516 (1988).
5. Haute Autorité de Santé - Sphérocytose héréditaire et autres anémies hémolytiques par anomalie de la membrane érythrocytaire. [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3280228/fr/spheroctose-hereditaire-et-autres-anemies-hemolytiques-par-anomalie-de-la-membrane-erythrocytaire](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3280228/fr/spheroctose-hereditaire-et-autres-anemies-hemolytiques-par-anomalie-de-la-membrane-erythrocytaire).
6. Christensen, R. D., Yaish, H. M. & Gallagher, P. G. A pediatrician's practical guide to diagnosing and treating hereditary spherocytosis in neonates. *Pediatrics* **135**, 1107–1114 (2015).
7. Mentzer, W. C. *et al.* Modulation of erythrocyte membrane mechanical stability by 2,3-diphosphoglycerate in the neonatal poikilocytosis/elliptocytosis syndrome. *J Clin Invest* **79**, 943–949 (1987).
8. Kobayashi, Y., Hatta, Y., Ishiwatari, Y., Kanno, H. & Takei, M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes* **7**, 137 (2014).
9. Tamary, H. *et al.* High incidence of early cholelithiasis detected by ultrasonography in children and young adults with hereditary spherocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* **25**, 952–954 (2003).
10. del Giudice, E. M. *et al.* Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. *Blood* **94**, 2259–2262 (1999).
11. pnds\_spheroctose\_hereditaire\_et\_autres\_anemies\_hemol\_par\_anomalie\_mb\_gr.pdf.
12. Bianchi, P. *et al.* Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica* **97**, 516–523 (2012).
13. Llaudet-Planas, E. *et al.* Osmotic gradient ektacytometry: A valuable screening test for hereditary spherocytosis and other red blood cell membrane disorders. *International Journal of Laboratory Hematology* **40**, 94–102 (2018).
14. Russo, R. *et al.* Multi-gene panel testing improves diagnosis and management of patients with hereditary anemias. *Am J Hematol* **93**, 672–682 (2018).
15. Tole, S. *et al.* Genotype–phenotype correlation in children with hereditary spherocytosis. *British Journal of Haematology* **191**, 486–496 (2020).
16. Peters, L. L. & Lux, S. E. Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. *Semin Hematol* **30**, 85–118 (1993).
17. Savvides, P., Shalev, O., John, K. M. & Lux, S. E. Combined spectrin and ankyrin deficiency is common in autosomal dominant hereditary spherocytosis. *Blood* **82**, 2953–2960 (1993).
18. Yawata, Y. *et al.* Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol* **71**, 118–135 (2000).
19. Luo, Y. *et al.* Spectrum of Ankyrin Mutations in Hereditary Spherocytosis: A Case Report and Review of the Literature. *Acta Haematol* **140**, 77–86 (2018).
20. Lux, S. E. *et al.* Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* **345**, 736–739 (1990).
21. Miya, K. *et al.* A de novo interstitial deletion of 8p11.2 including ANK1 identified in a patient with spherocytosis, psychomotor developmental delay, and distinctive facial features. *Gene* **506**, 146–149 (2012).

22. Perrotta, S., Gallagher, P. G. & Mohandas, N. Hereditary spherocytosis. **372**, 16 (2008).
23. Park, J. *et al.* Mutational characteristics of ANK1 and SPTB genes in hereditary spherocytosis. *Clinical Genetics* **90**, 69–78 (2016).
24. Dhermy, D. *et al.* Heterogenous band 3 deficiency in hereditary spherocytosis related to different band 3 gene defects. *British Journal of Haematology* **98**, 32–40 (1997).
25. Jarolim, P. *et al.* Characterization of 13 Novel Band 3 Gene Defects in Hereditary Spherocytosis With Band 3 Deficiency. *Blood* **88**, 4366–4374 (1996).
26. Bustos, S. P. & Reithmeier, R. A. F. Structure and Stability of Hereditary Spherocytosis Mutants of the Cytosolic Domain of the Erythrocyte Anion Exchanger 1 Protein. *Biochemistry* **45**, 1026–1034 (2006).
27. Reithmeier, R. A. F. *et al.* Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858**, 1507–1532 (2016).
28. Quilty, J. A. & Reithmeier, R. A. F. Trafficking and Folding Defects in Hereditary Spherocytosis Mutants of the Human Red Cell Anion Exchanger. *Traffic* **1**, 987–998 (2000).
29. Alloisio, N. *et al.* Hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Association with a nonsense mutation of the band 3 gene (allele Lyon), and aggravation by a low-expression allele occurring in trans (allele Genas). *Blood* **88**, 1062–1069 (1996).
30. Alloisio, N. *et al.* Modulation of Clinical Expression and Band 3 Deficiency in Hereditary Spherocytosis. *Blood* **90**, 414–420 (1997).
31. Reliene, R. *et al.* Splenectomy prolongs in vivo survival of erythrocytes differently in spectrin/ankyrin- and band 3-deficient hereditary spherocytosis. *Blood* **100**, 2208–2215 (2002).
32. Delaunay, J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Reviews* **21**, 1–20 (2007).
33. Bruce, L. J. *et al.* Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. *Nat Genet* **37**, 1258–1263 (2005).
34. Tanner, M. J. A. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. *Curr Opin Hematol* **9**, 133–139 (2002).
35. Iolascon, A., Andolfo, I. & Russo, R. Advances in understanding the pathogenesis of red cell membrane disorders. *Br J Haematol* **187**, 13–24 (2019).
36. Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors. *J Cell Biol* **105**, 1417–1424 (1987).
37. Hassoun, H. *et al.* Characterization of the Underlying Molecular Defect in Hereditary Spherocytosis Associated With Spectrin Deficiency. *Blood* **90**, 398–406 (1997).
38. Miraglia del Giudice, E. *et al.* Frequent de novo monoallelic expression of beta-spectrin gene (SPTB) in children with hereditary spherocytosis and isolated spectrin deficiency. *Br J Haematol* **101**, 251–254 (1998).
39. Richmond, C. M. *et al.* Rapid Identification of Biallelic SPTB Mutation in a Neonate with Severe Congenital Hemolytic Anemia and Liver Failure. *MSY* **11**, 50–55 (2020).
40. Maillet, P., Alloisio, N., Morlé, L. & Delaunay, J. Spectrin mutations in hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis. *Human Mutation* **8**, 97–107 (1996).
41. Ittiwut, C. *et al.* Novel mutations in SPTA1 and SPTB identified by whole exome sequencing in eight Thai families with hereditary pyropoikilocytosis presenting with severe fetal and neonatal anaemia. *British Journal of Haematology* **185**, 578–582 (2019).
42. Eber, S. & Lux, S. E. Hereditary spherocytosis—defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Seminars in Hematology* **41**, 118–141 (2004).
43. Fan, J. *et al.* The updated beta-spectrin mutations in patients with hereditary spherocytosis by targeted next-generation sequencing. *J Hum Genet* **66**, 1153–1158 (2021).

44. Wichterle, H., Hanspal, M., Palek, J. & Jarolim, P. Combination of two mutant alpha spectrin alleles underlies a severe spherocytic hemolytic anemia. *J Clin Invest* **98**, 2300–2307 (1996).
45. Gallagher, P. G. *et al.* Aberrant splicing contributes to severe  $\alpha$ -spectrin–linked congenital hemolytic anemia. *J Clin Invest* **129**, 2878–2887.
46. Chonat, S. *et al.* The Spectrum of SPTA1-Associated Hereditary Spherocytosis. *Frontiers in Physiology* **10**, (2019).
47. Maréchal, J. *et al.* Ethnic distribution of allele alpha LELY, a low-expression allele of red-cell spectrin alpha-gene. *Br J Haematol* **90**, 553–556 (1995).
48. Wilmotte, R. *et al.* Low expression allele alpha LELY of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 (alpha V/41 polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J Clin Invest* **91**, 2091–2096 (1993).
49. Randon, J. *et al.* A variant of spectrin low-expression allele alpha LELY carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *Br J Haematol* **88**, 534–540 (1994).
50. Niss, O. *et al.* Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **61**, 4–9 (2016).
51. Satchwell, T. J., Shoemark, D. K., Sessions, R. B. & Toye, A. M. Protein 4.2: a complex linker. *Blood Cells Mol Dis* **42**, 201–210 (2009).
52. Beauchamp-Nicoud, A. *et al.* Heavy transfusions and presence of an anti-protein 4.2 antibody in 4. 2(-) hereditary spherocytosis (949delG). *Haematologica* **85**, 19–24 (2000).
53. Toye, A. M. *et al.* Protein-4.2 association with band 3 (AE1, SLCA4) in *Xenopus* oocytes: effects of three natural protein-4.2 mutations associated with hemolytic anemia. *Blood* **105**, 4088–4095 (2005).
54. Bouhassira, E. E. *et al.* An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (protein 4.2NIPPON). *Blood* **79**, 1846–1854 (1992).
55. Kohgo, Y., Ikuta, K., Ohtake, T., Torimoto, Y. & Kato, J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* **88**, 7–15 (2008).
56. Witte, D. L. Mild liver enzyme abnormalities: eliminating hemochromatosis as cause. *Clinical Chemistry* **43**, 1535–1538 (1997).
57. Hyperferritinémie non hémochromatosique : diagnostic et prise en charge. *FMC-HGE* <https://www.fmcgastro.org/texte-postu/postu-2020-paris/hyperferritinemie-non-hemochromatosique-diagnostic-et-prise-en-charge/>.
58. Lorcerie, B. *et al.* Démarche diagnostique devant une hyperferritinémie. *La Revue de Médecine Interne* **36**, 522–529 (2015).
59. Hollán, S. R. Transfusion-associated iron overload. *Curr Opin Hematol* **4**, 436–441 (1997).
60. Huang, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech* **2**, 231–237 (2009).
61. Association of serum ferritin and the development of metabolic syndrome in middle-aged Korean men: a 5-year follow-up study - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22933431/>.
62. 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.
63. Harrison-Findik DD, Klein E, Crist C *et al.* Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology* 2007;46:1979.
64. Mastrogiannaki M, Matak P, Delga S *et al.* Deletion of HIF-2alpha in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood* 2012;119:587-90.
65. Wallerstein, R. O. & Robbins, S. L. Hemochromatosis after prolonged oral iron therapy in a patient with chronic hemolytic anemia. *The American Journal of Medicine* **14**, 256–260 (1953).
66. Radford-Smith, D. E., Powell, E. E. & Powell, L. W. Haemochromatosis: a clinical update for the practising physician: Haemochromatosis: an update. *Intern Med J* **48**, 509–516 (2018).
67. Feder, J. N. *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* **13**, 399–408 (1996).



68. Girelli, D. *et al.* Hemochromatosis classification: update and recommendations by the BIOIRON Society. *Blood* **139**, 3018–3029 (2022).
69. Bridle, K. R. *et al.* Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* **361**, 669–673 (2003).
70. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).
71. Hernández, G. *et al.* New Mutations in HFE2 and TFR2 Genes Causing Non HFE-Related Hereditary Hemochromatosis. *Genes (Basel)* **12**, 1980 (2021).
72. fiche\_de\_synth\_350se\_hfe-1\_finale.pdf.
73. Hollerer, I., Bachmann, A. & Muckenthaler, M. U. Pathophysiological consequences and benefits of HFE mutations: 20 years of research. *Haematologica* **102**, 809–817 (2017).
74. Feder, J. N. *et al.* The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* **272**, 14025–14028 (1997).
75. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* **53**, 3–22 (2010).
76. Aguilar-Martinez, P. *et al.* The Southern French registry of genetic hemochromatosis: a tool for determining clinical prevalence of the disorder and genotype penetrance. *Haematologica* **95**, 551–556 (2010).
77. Allen, K. J. *et al.* Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* **358**, 221–230 (2008).
78. Brissot, P. *et al.* Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 18016 (2018).
79. Hanson, E. H., Imperatore, G. & Burke, W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol* **154**, 193–206 (2001).
80. Naugler, C. Hemochromatosis: a Neolithic adaptation to cereal grain diets. *Med Hypotheses* **70**, 691–692 (2008).
81. Mariani, R. *et al.* Genetic and metabolic factors are associated with increased hepatic iron stores in a selected population of p.Cys282Tyr heterozygotes. *Blood Cells Mol Dis* **44**, 159–163 (2010).
82. Aguilar-Martinez, P. *et al.* Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants. *Haematologica* **96**, 507–514 (2011).
83. Piperno, A. *et al.* Two novel nonsense mutations of HFE gene in five unrelated Italian patients with hemochromatosis. *Gastroenterology* **119**, 441–445 (2000).
84. Le Gac, G. *et al.* Homozygous deletion of HFE produces a phenotype similar to the HFE p.C282Y/p.C282Y genotype. *Blood* **112**, 5238–5240 (2008).
85. Le Gac, G. *et al.* Homozygous deletion of HFE is the common cause of hemochromatosis in Sardinia. *Haematologica* **95**, 685–687 (2010).
86. Merryweather-Clarke, A. T. *et al.* Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet* **12**, 2241–2247 (2003).
87. Pietrangelo, A. *et al.* Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. *Gastroenterology* **128**, 470–479 (2005).
88. Biasotto, G. *et al.* Identification of new mutations of hepcidin and hemojuvelin in patients with HFE C282Y allele. *Blood Cells Mol Dis* **33**, 338–343 (2004).
89. Tchernitchko, D. & Lamoril, J. Novel BMP6 gene mutation in patient with iron overload. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **33**, 1029–1030 (2021).
90. Zaloumis, S. G. *et al.* Natural history of HFE simple heterozygosity for C282Y and H63D: a prospective 12-year study. *J Gastroenterol Hepatol* **30**, 719–725 (2015).
91. Gurrin, L. C. *et al.* HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology* **50**, 94–101 (2009).

92. Mura, C., Raguene, O. & Férec, C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* **93**, 2502–2505 (1999).
93. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression | Nature Genetics. <https://www.nature.com/articles/ng1777>.
94. Kong, X. *et al.* Genotypic and phenotypic spectra of hemojuvelin mutations in primary hemochromatosis patients: a systematic review. *Orphanet J Rare Dis* **14**, 171 (2019).
95. Matthes, T. *et al.* Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene. *Blood* **104**, 2181–2183 (2004).
96. Pf, F. *et al.* HAMP Gene Mutation Associated with Juvenile Hemochromatosis in Brazilian Patients. *Acta haematologica* **135**, (2016).
97. Hayashi, H. *et al.* Genetic background of primary iron overload syndromes in Japan. *Intern Med* **45**, 1107–1111 (2006).
98. De Gobbi, M. & Roetto, A. TFR2-Related Hereditary Hemochromatosis. in *GeneReviews*<sup>®</sup> (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
99. Roetto, A. *et al.* New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* **97**, 2555–2560 (2001).
100. Joshi, R. *et al.* Functional consequences of transferrin receptor-2 mutations causing hereditary hemochromatosis type 3. *Mol Genet Genomic Med* **3**, 221–232 (2015).
101. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1104742>.
102. Viprakasit, V. *et al.* Molecular Diagnosis of the First Ferroportin Mutation (C326Y) in the Far East Causing a Dominant Form of Inherited Iron Overload. *Blood* **104**, 3204 (2004).
103. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations | Elsevier Enhanced Reader.
104. Drakesmith, H. *et al.* Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* **106**, 1092–1097 (2005).
105. Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6789780/>.
106. Liu, X.-B., Nguyen, N.-B. H., Marquess, K. D., Yang, F. & Haile, D. J. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**, 47–56 (2005).
107. Roth, M.-P. & Coppin, H. BMP6, un acteur clé dans la régulation du métabolisme du fer. *Med Sci (Paris)* **25**, 678–680 (2009).
108. Daher, R. *et al.* Heterozygous Mutations in BMP6 Pro-peptide Lead to Inappropriate Hepcidin Synthesis and Moderate Iron Overload in Humans. *Gastroenterology* **150**, 672-683.e4 (2016).
109. Piubelli, C. *et al.* Identification of new BMP6 pro-peptide mutations in patients with iron overload. *Am J Hematol* **92**, 562–568 (2017).
110. Kato, J. *et al.* A Mutation, in the Iron-Responsive Element of H Ferritin mRNA, Causing Autosomal Dominant Iron Overload. *The American Journal of Human Genetics* **69**, 191–197 (2001).
111. McKie, A. T. *et al.* Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochem Soc Trans* **30**, 722–724 (2002).
112. Zaahl, M. G. *et al.* Analysis of genes implicated in iron regulation in individuals presenting with primary iron overload. *Hum Genet* **115**, 409–417 (2004).
113. Thanh, A. *et al.* Porphyria Cutanea Tarda and Spherocytosis: A Non-random Association? *Acta Derm Venereol* **93**, 377–378 (2013).
114. Alla, V. & Bonkovsky, H. L. Iron in Nonhemochromatotic Liver Disorders. *Semin Liver Dis* **25**, 461–472 (2005).

115. Atransferrinemia - NORD (National Organization for Rare Disorders). <https://rarediseases.org/rare-diseases/atransferrinemia/>.
116. Romero-Cortadellas, L. *et al.* New Cases of Hypochromic Microcytic Anemia Due to Mutations in the SLC11A2 Gene and Functional Characterization of the G75R Mutation. *Int J Mol Sci* **23**, 4406 (2022).
117. Estimation of the gene frequency of aceruloplasminemia in Japan - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10449129/>.
118. Patel, B. N., Dunn, R. J. & David, S. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem* **275**, 4305–4310 (2000).
119. Jeong, S. Y. & David, S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* **278**, 27144–27148 (2003).
120. Constantine, C. C. *et al.* A novel association between a SNP in CYBRD1 and serum ferritin levels in a cohort study of HFE hereditary haemochromatosis. *Br J Haematol* **147**, 140–149 (2009).
121. Pelucchi, S. *et al.* CYBRD1 as a modifier gene that modulates iron phenotype in HFE p.C282Y homozygous patients. *Haematologica* **97**, 1818–1825 (2012).
122. Milet, J. *et al.* Common Variants in the BMP2, BMP4, and HJV Genes of the Hfeidin Regulation Pathway Modulate HFE Hemochromatosis Penetrance. *Am J Hum Genet* **81**, 799–807 (2007).
123. Milet, J. *et al.* A common SNP near BMP2 is associated with severity of the iron burden in HFE p.C282Y homozygous patients: A follow-up study. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **44**, 34–37 (2010).
124. Yang, Y., Férec, C. & Mura, C. SNP and haplotype analysis reveals new HFE variants associated with iron overload trait. *Hum Mutat* **32**, E2104–2117 (2011).
125. de Tayrac, M. *et al.* Genome-wide association study identifies TF as a significant modifier gene of iron metabolism in HFE hemochromatosis. *J Hepatol* **62**, 664–672 (2015).
126. Benyamin, B. *et al.* Novel loci affecting iron homeostasis and their effects in individuals at risk for hemochromatosis. *Nat Commun* **5**, 4926 (2014).
127. Hofmann, W.-K., Tong, X.-J., Ajioka, R. S., Kushner, J. P. & Koeffler, H. P. Mutation analysis of transferrin-receptor 2 in patients with atypical hemochromatosis. *Blood* **100**, 1099–1100 (2002).
128. Altès, A. *et al.* Does the SLC40A1 gene modify HFE-related haemochromatosis phenotypes? *Ann Hematol* **88**, 341–345 (2009).
129. Pelucchi, S. *et al.* HIF1A: A Putative Modifier of Hemochromatosis. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1245 (2021).
130. McLaren, C. E. *et al.* Exome sequencing in HFE C282Y homozygous men with extreme phenotypes identifies a GNPAT variant associated with severe iron overload. *Hepatology* **62**, 429–439 (2015).
131. Barton, J. C. *et al.* GNPAT p.D519G is independently associated with markedly increased iron stores in HFE p.C282Y homozygotes. *Blood Cells Mol Dis* **63**, 15–20 (2017).
132. Secondes, E. S. *et al.* Increased frequency of GNPAT p.D519G in compound HFE p.C282Y/p.H63D heterozygotes with elevated serum ferritin levels. *Blood Cells Mol Dis* **85**, 102463 (2020).
133. Greni, F. *et al.* GNPAT rs11558492 is not a Major Modifier of Iron Status: Study of Italian Hemochromatosis Patients and Blood Donors. *Annals of Hepatology* **16**, 451–456 (2017).
134. Ryan, E., Russell, J., Ryan, J. D., Crowe, J. & Stewart, S. GNPAT variant is not associated with severe iron overload in Irish C282Y homozygotes. *Hepatology* **63**, 2055–2056 (2016).
135. Livesey, K. *et al.* The 16189 variant of mitochondrial DNA occurs more frequently in C282Y homozygotes with haemochromatosis than those without iron loading. *J Med Genet* **41**, 6–10 (2004).
136. Tolosano, E. *et al.* Haptoglobin modifies the hemochromatosis phenotype in mice. *Blood* **105**, 3353–3355 (2005).
137. Gouya, L. *et al.* Genetic study of variation in normal mouse iron homeostasis reveals ceruloplasmin as an HFE-hemochromatosis modifier gene. *Gastroenterology* **132**, 679–686 (2007).
138. Athiyarath, R. *et al.* Genetic modifiers of secondary iron overload in beta thalassemia major. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **54**, 242–243 (2015).

139. Nai, A. *et al.* TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood* **118**, 4459–4462 (2011).
140. Valenti, L. *et al.* Effect of the A736V TMPRSS6 polymorphism on the penetrance and clinical expression of hereditary hemochromatosis. *Journal of Hepatology* **57**, 1319–1325 (2012).
141. Andreani, M. *et al.* Association of hepcidin promoter c.-582 A>G variant and iron overload in thalassemia major. *Haematologica* **94**, 1293–1296 (2009).
142. Schaefer, B. *et al.* Impaired hepcidin expression in alpha-1-antitrypsin deficiency associated with iron overload and progressive liver disease. *Hum Mol Genet* **24**, 6254–6263 (2015).
143. Faniello, M. C. *et al.* Detection and functional analysis of an SNP in the promoter of the human ferritin H gene that modulates the gene expression. *Gene* **377**, 1–5 (2006).
144. Blacklock, H. A. & Meerkin, M. Serum Ferritin in Patients with Hereditary Spherocytosis. *Br J Haematol* **49**, 117–122 (1981).
145. Kautz, L. L'érythroferrone, un régulateur érythroïde du métabolisme du fer. *Med Sci (Paris)* **30**, 834–836 (2014).
146. El Beshlawy, A., Alaraby, I., Abdel Kader, M. S. E. M., Ahmed, D. H. & Abdelrahman, H. E. M. Study of serum hepcidin in hereditary hemolytic anemias. *Hemoglobin* **36**, 555–570 (2012).
147. Erlandson, M *et al.* Studies on Congenital Hemolytic Syndromes. Gastrointestinal Absorption of Iron. *BLOOD*, VOL. 19, No. 3 (1962).
148. Tole, S. *et al.* Mild Hereditary Spherocytosis without Accompanying Hereditary Haemochromatosis: An Unrecognised Cause of Iron Overload. *Acta Haematol* **141**, 256–260 (2019).
149. Edwards, C. Q., Skolnick, M. H., Dadone, M. M. & Kushner, J. P. Iron overload in hereditary spherocytosis: association with HLA-linked hemochromatosis. *Am J Hematol* **13**, 101–109 (1982).
150. O'Mahony, S., O'Brien, P. A. & Whelton, M. J. GENETIC HAEMOCHROMATOSIS AND CONGENITAL SPHEROCYTOSIS. *The Lancet* **329**, 282 (1987).
151. Brandenburg, J. B., Demarmels Biasiutti, F., Lutz, H. U. & Wuillemin, W. A. Hereditary spherocytosis and hemochromatosis. *Ann Hematol* **81**, 202–209 (2002).
152. Höblinger, A., Erdmann, C., Strassburg, C., Sauerbruch, T. & Lammert, F. Coinheritance of hereditary spherocytosis and reversibility of cirrhosis in a young female patient with hereditary hemochromatosis. *Eur J Med Res* **14**, 182–184 (2009).
153. Montes-Cano, M. A., Rodríguez-Muñoz, F., Franco-Osorio, R., Núñez-Roldán, A. & González-Escribano, M. F. Hereditary spherocytosis associated with mutations in HFE gene. *Ann Hematol* **82**, 769–772 (2003).
154. Mohler, D. N. & Wheby, M. S. Patients with hereditary spherocytosis may have clinically significant iron overload when they are also heterozygous for hemochromatosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **96**, 34–40 (1985).
155. Fargion, S. *et al.* Association of hereditary spherocytosis and idiopathic hemochromatosis. A synergistic effect in determining iron overload. *Am J Clin Pathol* **86**, 645–649 (1986).
156. Ichiche, M. *et al.* Congenital spherocytosis with hereditary hemochromatosis without pathogenic mutations in the HFE gene. *Eur J Intern Med* **15**, 460–462 (2004).
157. Gogia, P., Goel, R. & Nayar, S. Extramedullary paraspinal hematopoiesis in hereditary spherocytosis. *Ann Thorac Med* **3**, 64–66 (2008).
158. Granjo, E. *et al.* Extramedullary hematopoiesis in hereditary spherocytosis deficient in ankyrin: a case report. *Int J Hematol* **76**, 153–156 (2002).
159. AZOURY, V. Surcharge en fer dans les pathologies héréditaires de la membrane érythrocytaire : données d'une cohorte de 159 patients. (2021).
160. Home. *SeqOne Genomics* <https://seqone.com/>.
161. HGMD® home page. <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
162. BP-NGSDiag\_001\_Interpretation\_Variants\_v2.pdf.
163. Home - SNP - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.

164. ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
165. Homepage - MobiDetails. <https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>.
166. MPA: MoBiDiC Prioritization Algorithm. (2022).
167. Richards, S. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **17**, 405–424 (2015).
168. Inc, M. G. SYMPTOMATIC BONE MARROW RECONVERSION: A COMMON FEATURE IN... by Camille Pochard.
169. Rausa, M. *et al.* Identification of TMPRSS6 cleavage sites of hemojuvelin. *J Cell Mol Med* **19**, 879–888 (2015).
170. Gouya, L. *et al.* Contribution of a Common Single-Nucleotide Polymorphism to the Genetic Predisposition for Erythropoietic Protoporphyria. *Am J Hum Genet* **78**, 2–14 (2006).
171. Delaunay, J. *et al.* Different impacts of alleles  $\alpha$ LEPRA and  $\alpha$ LELY as assessed versus a novel, virtually null allele of the SPTA1 gene in trans. *British Journal of Haematology* **127**, 118–122 (2004).
172. Svidnicki, M. C. C. M., Zanetta, G. K., Congrains-Castillo, A., Costa, F. F. & Saad, S. T. O. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations associated with hereditary anemias in Brazil. *Ann Hematol* **99**, 955–962 (2020).
173. Da Costa, L., Galimand, J., Fenneteau, O. & Mohandas, N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Reviews* **27**, 167–178 (2013).
174. Wada, H., Suemori, S.-I., Nakanishi, H. & Sugihara, T. [Band 3 deficiency as a cause of hereditary spherocytosis]. *Rinsho Ketsueki* **56**, 837–845 (2015).
175. Sequestration and destruction of reticulocyte in the spleen in pyruvate kinase deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4676844/>.
176. Zarza, R. *et al.* Co-existence of hereditary spherocytosis and a new red cell pyruvate kinase variant: PK mallorca. *Haematologica* **85**, 227–232 (2000).
177. Corrons, J.-L. V., Krishnevskaya, E., Montllor, L., Leguizamon, V. & Bernal, M. G. Concomitant Hereditary Spherocytosis and Pyruvate Kinase Deficiency in a Spanish Family with Chronic Hemolytic Anemia: Contribution of Laser Ektacytometry to Clinical Diagnosis. *Cells* **11**, (2022).
178. R, van Z. *et al.* Partial pyruvate kinase deficiency aggravates the phenotypic expression of band 3 deficiency in a family with hereditary spherocytosis. *American journal of hematology* **90**, (2015).
179. Aguilar-Martinez, P. *et al.* Prevalence of HFE mutations in people from North Africa living in southern France. *British Journal of Haematology* **114**, 914–916 (2001).
180. Feder, J. N. *et al.* The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1472–1477 (1998).
181. RESERVES, I. U.-T. D. Orphanet: Hémochromatose africaine. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=FR&Expert=139507](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=139507).
182. McGregor, J. A. *et al.* Impaired Iron Transport Activity of Ferroportin 1 in Hereditary Iron Overload. *J Membrane Biol* **206**, 3–7 (2005).
183. Reduced sensitivity of the ferroportin Q248H mutant to physiological concentrations of hepcidin | Haematologica. <https://www.haematologica.org/article/view/6601>.
184. Piperno, A., Pelucchi, S. & Mariani, R. Inherited iron overload disorders. *Transl Gastroenterol Hepatol* **5**, 25 (2020).
185. Ichikawa, Y. *et al.* Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4152–4157 (2012).

# Facteurs génétiques de surcharge en fer dans la sphérocytose héréditaire

## Genetic factors of iron overload during hereditary spherocytosis

**Auteur :** Lucie Donaty

### **Résumé :**

Au cours de la sphérocytose héréditaire, le développement d'une surcharge en fer, parfois sévère, a été décrite, bien que peu documentée par rapport à d'autres pathologies de la membrane érythrocytaire. Très peu d'études se sont intéressées à étudier ce phénomène, et les mécanismes physiopathologiques sous-jacents ne sont à ce jour pas complètement élucidés.

Une cohorte de 14 patients sphérocytaires présentant une hyperferritinémie a été analysée par séquençage haut débit. Parmi eux, 8 avaient une réelle surcharge en fer, objectivée par une charge hépatique en fer supérieure à 90  $\mu\text{mol/g}$ . Nous avons recherché la présence de cofacteurs génétiques qui pourraient expliquer le développement d'un tel phénotype.

Notre étude a permis de montrer que le développement d'une surcharge en fer chez certains patients sphérocytaires n'a pas de lien direct avec le gène ou les variants responsables de la sphérocytose, et qu'il n'est pas lié à la présence des anomalies génétiques classiquement à l'origine d'une hémochromatose génétique. En revanche, nous avons mis en évidence des facteurs génétiques qui pourraient possiblement contribuer au développement d'une surcharge hépatique en fer chez 5 des 8 patients concernés (63%).

Nous retrouvons chez 3 patients la présence de variants probablement pathogènes qui pourraient majorer l'hémolyse et conduire à l'apparition d'une surcharge en fer : 2 patients portent des variants du gène *PKLR*, et un patient un variant du gène *ABCG5*. Les 2 autres patients portent des variants probablement pathogènes sur des gènes du métabolisme du fer, qui pourraient conduire à son déséquilibre. L'un est porteur d'un variant du gène *ABCB8*, et l'autre du gène *HJV*.

Pour terminer, 3 polymorphismes sur les gènes *HFE*, *KIF23* et *GLRX5* sont retrouvés de façon plus fréquente dans notre population de patients sphérocytaires avec hyperferritinémie par rapport à la population générale. Leur présence pourrait potentiellement expliquer l'élévation de la ferritinémie chez ces patients.

Cette étude, qui porte sur un faible effectif de patients, encourage à la réalisation d'études plus larges qui permettront de mieux caractériser l'hétérogénéité clinique observée chez ces patients.

**Mots clefs :** Sphérocytose héréditaire, NGS, hyperferritinémie, surcharge martiale, facteurs génétiques